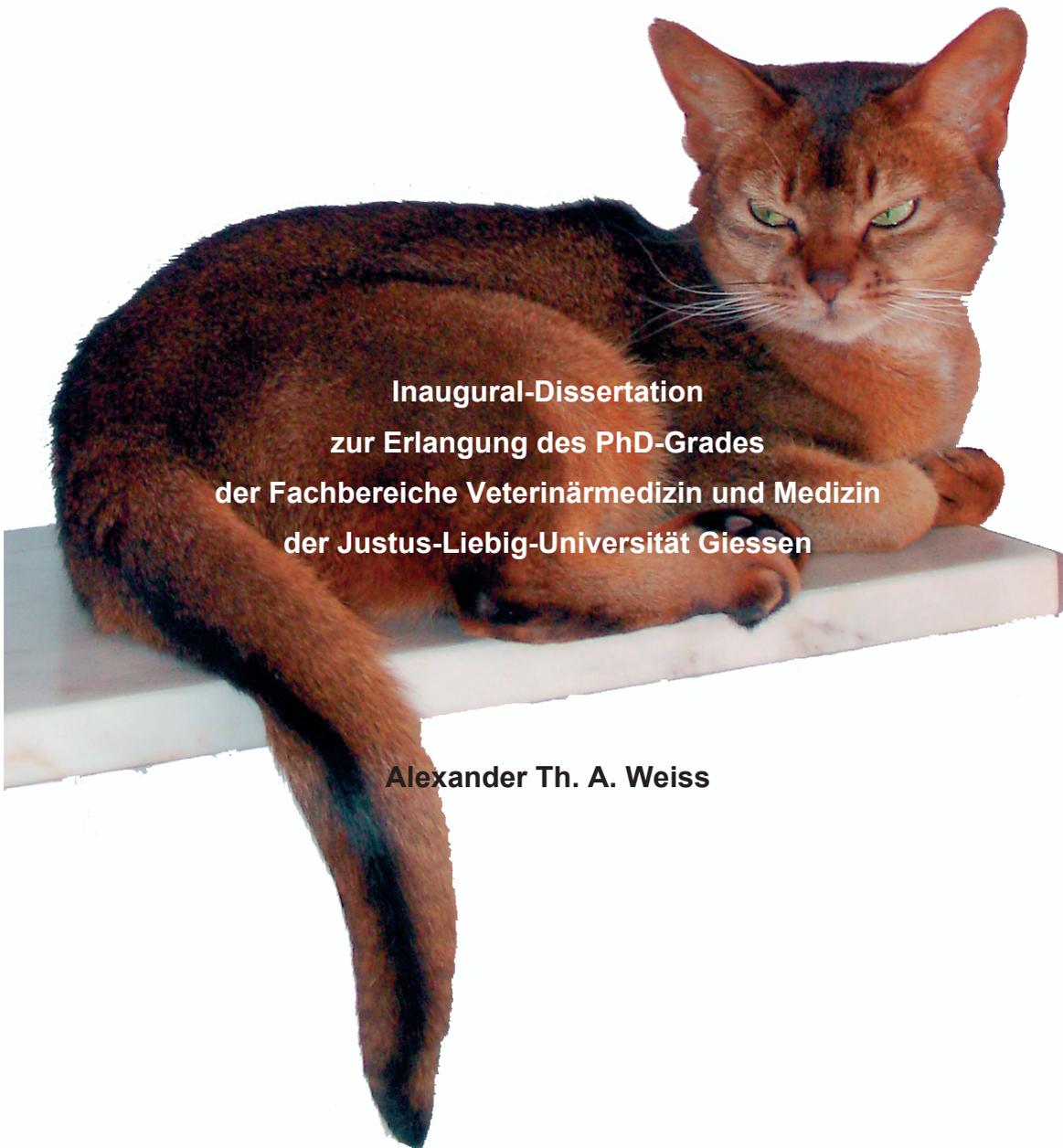


# **Untersuchungen zur Charakterisierung des felines T-Zell-Rezeptors $\gamma$**

**Grundlage für die molekulare Diagnose feline Lymphome  
durch Analyse klonal rekombinierter Antigenrezeptorgene**



**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des PhD-Grades  
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen**

**Alexander Th. A. Weiss**

## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;  
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2008

© 2008 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen  
Printed in Germany

ISBN 978-3-939902-58-4

Verlag: DVG Service GmbH  
Frankfurter Straße 89  
35392 Gießen  
0641/24466  
[geschaeftsstelle@dvg.net](mailto:geschaeftsstelle@dvg.net)  
[www.dvg.net](http://www.dvg.net)

**Untersuchungen  
zur Charakterisierung  
des felines T-Zell-Rezeptors  $\gamma$**

**Grundlage für die molekulare Diagnose feliner Lymphome  
durch Analyse klonal rekombinierter Antigenrezeptorgene**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des PhD-Grades  
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen**

**eingereicht von  
Alexander Th. A. Weiss  
Tierarzt aus Schwabach**

**Giessen 2007**

**Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie  
gf. Direktor: Prof. Dr. M. Reinacher  
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen**

- |   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: | Prof. Dr. M. Reinacher    |
| 2. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: | Prof. Dr. A. Gruber Ph.D. |
| Mitglied und Vorsitzender der Prüfungskommission: | Prof. Dr. Dr. H. M. Piper |
| Beisitzer:  | Prof. Dr. A. Moritz       |
| <br>  |                           |
| Tag der Disputation:                              | 7. Dezember 2007          |

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Alexander Th. A. Weiss

Für

**Conni, Hugo und Emma.**

Damit die Arbeit nicht nur für die Katz' ist.



# Inhaltsverzeichnis

	Verzeichnis der Abkürzungen _____	I
	Abkürzungen und Symbole für Aminosäuren _____	III
1.	EINLEITUNG _____	1
2.	LITERATURÜBERSICHT _____	3
2.1	Analyse klonal rekombinierter Antigenrezeptorgene in der Humanmedizin _____	3
2.1.1	Molekularbiologische Grundlagen _____	3
2.1.1.1	Der Antigenrezeptor der B-Lymphozyten _____	4
2.1.1.1.1	Struktur der Antikörper und der für sie kodierenden Gene _____	4
2.1.1.1.2	V(D)J Rekombination _____	6
2.1.1.2	Der Antigenrezeptor der T-Lymphozyten _____	9
2.1.2	Diagnostische Anwendung _____	10
2.1.2.1	Allgemeines _____	10
2.1.2.2	Anwendung der PCR zur Diagnose maligner Lymphome _____	11
2.1.2.2.1	B-Zell-Lymphome _____	11
2.1.2.2.2	T-Zell-Lymphome _____	13
2.2	Maligne Lymphome der Katze _____	14
2.2.1	Begriffsbestimmung und Vorkommen _____	14
2.2.2	Formen des malignen Lymphoms bei der Katze _____	15
2.2.3	Molekulargenetische Charakterisierung feliner Lymphome _____	16
2.3	Der TcR $\gamma$ _____	17
2.3.1	Entdeckung und Allgemeines _____	17
2.3.2	Entwicklung und Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen _____	18
2.3.3	Struktur des TcR $\gamma$ _____	20
2.3.4	Der TcR $\gamma$ bei verschiedenen Spezies _____	23
2.3.4.1	Allgemeines _____	23
2.3.4.2	Der TRG-Locus des Menschen _____	24
2.3.4.3	Der TRG-Locus der Maus _____	25
2.3.4.4	Der TRG-Locus bei Schaf und Rind _____	26
2.3.4.5	Der TRG-Locus des Hundes _____	28
2.3.4.6	TcR $\gamma$ bei der Katze _____	28
2.4	In vitro-Rekombination _____	28
2.5	Zielsetzung _____	29
3.	MATERIAL UND METHODEN _____	30
3.1	Biologisches Material _____	30
3.2	Extraktion von Nukleinsäuren _____	30

---

3. 2. 1	Extraktion von genomischer DNS	30
3. 2. 2	Extraktion von gesamt-RNS	32
3. 3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
3. 4	Oligonukleotide für molekularbiologische Arbeiten	33
3. 5	Polymerase Ketten Reaktion	35
3. 5. 1	DNS-PCR	35
3. 5. 1. 1	Testen der verwendeten Oligonukleotide	35
3. 5. 1. 2	Ergebniskontrolle	36
3. 5. 2	PCR mit Phusion™ High Fidelity DNS-Polymerase	37
3. 5. 3	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	38
3. 5. 4	Amplifikation nur teilweise bekannter Sequenzen - Rapid Amplifikation of cDNA Ends (RACE)	39
3. 5. 4. 1	Klassische RACE	39
3. 5. 4. 1. 1	cDNS Synthese	40
3. 5. 4. 1. 2	Aufreinigung der cDNS	41
3. 5. 4. 1. 3	Tailing der cDNS	41
3. 5. 4. 1. 4	Amplifikation der cDNS	42
3. 5. 4. 2	SMART™-RACE	42
3. 5. 4. 3	CapFishing™	44
3. 5. 3. 4	3'-RACE	46
3. 5. 4	Ergebniskontrolle - Elektrophorese	47
3. 5. 6	Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen	48
3. 5. 7	dATP „Tailing“ der PCR-Produkte	49
3.6	Klonierung der PCR-Produkte	50
3. 6. 1	Bakterienkultur	50
3. 6. 2	Vorbereitung der DNS	50
3. 6. 3.	Verwendete Klonierungskits	51
3. 6. 3. 1	Qiagen® PCR Cloning	51
3. 6. 3. 2	AccepTor™ Vektor Kit	52
3. 6. 4	Kolonie-PCR	52
3. 6. 5	Anzucht von <i>E. coli</i> Flüssigkulturen und Plasmidpräparation	53
3. 6. 6	Kontrolle der gewonnenen Plasmide	54
3. 7	Sequenzierung und Auswertung der Ergebnisse	55
3. 8	Durchführung der einzelnen Versuche	56
3. 8. 1	Klassische 5'-RACE	56
3. 8. 2.	SMART™ RACE	56
3. 8. 3	Weitere Amplifikationsversuche	57
3. 8. 4	CapFishing™	58

---

3. 8. 5	Amplifikation von fTRGV4 und zusätzliche Amplifikationen	59
3. 8. 6	3'-RACE	59
3. 8. 7	Aufklärung der weiteren vermuteten konstanten Region	61
4.	ERGEBNISSE	62
4.1	Extraktion von Nukleinsäuren	62
4. 1. 1	Extraktion genomischer DNS	62
4. 1. 2	Extraktion von gesamt-RNS	62
4. 2	Primertests	62
4. 3	Ergebnisse der 5'-RACE sowie der Klonierung und Sequenzierung	62
4. 3. 1	Klassische 5'-RACE	63
4. 3. 2	SMART™ RACE	64
4. 3. 3	Weitere Amplifikationsversuche	65
4. 3. 4	CapFishing™	67
4. 3. 5	Amplifikation von fTGV4 und noch nicht funktionell nachgewiesenen C-Regionen	68
4. 4	Ergebnisse der 3'-RACE sowie der Klonierung und Sequenzierung	68
4. 5	Aufklärung der fraglichen C-Region	70
4. 6	Suchen im Trace Archiv	71
4. 6. 1	Suche nach den Sequenzen für das Signal-Peptid	71
4. 6. 2	Suche nach 3'UTR verschiedener C-Regionen	71
4. 6. 3	V-Regionen	71
4. 6. 4	J-Regionen	72
4. 6. 5	C-Regionen	72
4. 6. 6	Suche im Trace Archiv der genomischen Hundesequenzen	72
4. 7	Auswertung der Sequenzen	73
4. 7. 1	Sequenz des Signalpeptids	73
4. 7. 2	Variable Regionen	75
4. 7. 3	N-Regionen	78
4. 7. 4	J-Regionen	80
4. 7. 5	C-Regionen	82
4. 7. 6	Sequenzen mit in vitro-Rekombinationen	85
4. 7. 7	Kombination der Regionen	87
5.	DISKUSSION	88
5. 1	Amplifikation der cDNS des feline T-Zell-Rezeptors	88
5. 1. 1	5'-RACE	88
5. 1. 2	3' -RACE	93
5. 2	Auswertung der Sequenzen	93

---

5. 2. 1	Variable Regionen _____	93
5. 2. 3	N-Region _____	96
5. 2. 4	J-Regionen _____	97
5. 2. 5	C-Regionen _____	98
5. 3	Überlegungen zum feline TRG-Locus _____	100
5.4	Ausblick – Einsatz der Sequenzen zur Etablierung eines Diagnostischen Systems _____	101
6.	ZUSAMMENFASSUNG _____	103
7.	SUMMARY _____	104
8.	LITERATURVERZEICHNIS _____	105
9.	ANHANG _____	127
9. 1	Verwendete Primer _____	127
9. 1. 1	Sequenz und Position verwendeter Primer _____	127
9. 1. 2	Verwendete Primerpaare _____	129
9. 2	Temperaturbedingungen für die Gradienten-PCR _____	132
9. 3	Verwendete DNS-Längenstandrats _____	133
9. 3. 1	pUC19/ <i>Msp</i> I _____	133
9. 3. 2	DNS-Längenstandart MF _____	133
9. 3. 3	Kommerzieller DNS-Längenstandart _____	134
9. 4	Primer und Reaktionsbedingungen für die Kolonie-PCR _____	135
9. 5	Reaktionsbedingungen für die Amplifikation _____	136
9. 5. 1	SMART™ RACE _____	136
9. 5. 1. 1	Mastermix für die SMART™ RACE _____	136
9. 5. 1. 2	Amplifikationsbedingngen bei der SMART™ RACE _____	137
9. 5. 2	Reamplifikationen mit FTGLf1 _____	137
9. 5. 3	CapFishing™ _____	138
9. 5. 4	Amplifikation von fTRGV4 und zusätzliche Amplifikationen _____	138
9. 5. 5	3'-RACE _____	139
9. 5. 5. 1	Reaktionsbedingungen für die 3'-RACE I _____	139
9. 5. 5. 2	Reaktionsbedingungen für die 3'-RACE II _____	140
9. 5. 5. 3	Reaktionsbedingungen für die 3'-RACE III _____	140
9.6	Ergebnisse der Nukleinsäureextraktion _____	141
9.7	Erzeugte Klone _____	142
9. 8	Ergebnisse der Suche im Trace Archiv _____	146
9. 8. 1	Suche nach den Sequenzen für das Signal-Peptid _____	146
9. 8. 2	Suche nach 3'UTR verschiedener C-Regionen _____	146
9. 8. 3	V-Regionen _____	147
9. 8. 4	J-Regionen _____	147

---

9. 8. 5	C-Regionen _____	148
9. 8. 6	Kanine Sequenzen _____	149
9. 9.	Nukleotidsequenzen der Subtypen von fTRGV1 _____	150
9. 10	Liste der Prototypen der Regionen _____	152
9. 10. 1	Liste der Prototypen für die V-Regionen _____	152
9. 10. 2	Liste der Prototypen für die J-Regionen _____	152
9. 11	Vergleich mit anderen Spezies _____	152
9. 11. 1	Ergebnisse des Vergleichs der V-Regionen mit V-Quest und IMGT/GapAlign _____	152
9. 11. 2	Vergleich der V-Regionen mit denen weiterer Spezies _____	153
9. 11. 3	Vergleich der J-Regionen mit denen des Hundes _____	153
9. 11. 4	Ergebnisse des Vergleiches der C-Regionen mit IMGT/GapAlign _____	154
9. 11. 5	Homologiewerte beim Vergleich von fTRGC Exon 1 mit cTRGC ____	154
9. 11. 6	Homologiewerte beim Vergleich von fTRGC1 Exon 3 mit denjenigen weiterer Spezies _____	154
9. 12	Homologiewerte der weiteren felines Regionen _____	155
9. 12. 1	Homologiewerte der felines J-Regionen _____	155
9. 12. 2	Homologiewerte der felines C-Regionen _____	155
9. 13	Kombinationen der V-, J- und C-Regionen _____	155
9. 14	Bezugsquellen _____	157
9. 14. 1	Bezugsquellen für Chemikalien, Enzyme und Kits _____	157
9. 14. 2	Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel _____	159
9. 15	Lösungen und Puffer _____	160
9. 15. 1	PCR _____	160
9. 15. 2	Elektrophorese _____	160
9. 15. 3	Klonierung _____	161
	Lebenslauf _____	162
	Danksagung _____	163

## Verzeichnis der Abkürzungen

3'UTR	3' nicht translatierte Region
A	Adenin
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bTRG	T-Zell-Rezeptor $\gamma$ des Rindes ( <i>Bos taurus</i> )
C	Cytosin
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR	complementarity determining region
C-Region	konstante Region
cTRG	T-Zell-Rezeptor $\gamma$ des Hundes ( <i>Canis familiaris</i> )
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DN	doppelt negativ
DNA-PK	DNS-abhängige Protein-Kinase
DNA-PKcs	katalytische Untereinheit der
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DP	doppelt positiv
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FeLV	Felines Leukämievirus
FIV	Felines Immundefizienz Virus
FR	framework region
fTRG	Gene des felines T-Zell-Rezeptor $\gamma$
G	Guanin
hTRG	T-Zell-Rezeptor $\gamma$ des Menschen ( <i>Homo sapiens</i> )
IBD	Inflammatory bowel disease
IgH	Immunglobulin schwere Kette
IgL	Immunglobulin leichte Kette
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ISP	unreif einfach positiv
J-Region	joining Region
kBp	Kilobasenpaare
LINE	Long interspersed Element
L-Region	Sequenz des Signalpeptids, Leader-Region
LTR	Long terminal Repeats

---

mA	milli Ampere
MHC	Major histocompatibility complex
mRNS	messenger-RNS
mTRG	T-Zellrezeptor $\gamma$ der Maus
N <sub>6</sub>	Zufallsprimer, „random hexamers“
NE	Hydratationspuffer, NucleoSpin® Extrakt II Kit (Macherey & Nagel, Düren)
NHEJ	nonhomologous end joining
NT	Bindepuffer, NucleoSpin® Extrakt II Kit (Macherey & Nagel, Düren)
ocTRG	T-Zell-Rezeptor $\gamma$ des Kaninchen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )
oTRG	T-Zell-Rezeptor $\gamma$ des Schafes ( <i>Ovis aries</i> )
PAGE	Polyacryamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
RAG	Rekombination aktivierendes Gen
RBC	rote Blutkörperchen (red blood cells)
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSS	Rekombinations-Signal-Sequenz
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SINE	Short interspersed Element
SMART™	Switching Mechanism At 5' End of RNA Transkript
SR	SMART™ RACE
sTRG	T-Zellrezeptor $\gamma$ des Schweins ( <i>Sus scrofa</i> )
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TcR	T-Zell-Rezeptor auf Proteinebene
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
TR	T-Zell-Rezeptor auf Genomebene
TRA	Gene des T-Zell-Rezeptors $\alpha$
TRB	Gene des T-Zell-Rezeptors $\beta$
TRD	Gene des T-Zell-Rezeptors $\delta$
TRG	Gene des T-Zell-Rezeptors $\gamma$
TRG1@	T-Zell-Rezeptor $\gamma$ -Locus 1
TRG2@	T-Zell-Rezeptor $\gamma$ -Locus 2

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNS	transfer-RNS
UPL	langer Universalprimer
UPM	Universalprimer-Mix
UP-nested	nested Universalprimer
UPS	kurzer Universalprimer
V	Volt
V-Region	variable Region
vRNS	Vorläufer-RNS
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

### Abkürzungen und Symbole für Aminosäuren

**Tabelle:** Abkürzungen und Symbole für Aminosäuren.

Aminosäure	Abkürzung	Symbol	Aminosäure	Abkürzung	Symbol
Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparaginsäure	Asp	D	Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutaminsäure	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

# 1. Einleitung

Als Grundlage für die Diagnose von Lymphomen in der Veterinärmedizin dient die pathologisch-histologische Untersuchung Hämatoxylin-Eosin gefärbter Gewebeschnitte oder Biopsien. Darüber hinaus werden auch häufig ausgestrichene Feinnadelaspirate vergrößerter Lymphknoten untersucht. Leukämien werden üblicherweise anhand der morphologischen Beurteilung von Zellen im Blutausschlag diagnostiziert.

Bei der histopathologischen Klassifizierung lymphatischer Neoplasien treten immer wieder Probleme auf, da reaktive lymphatische Infiltrationen, reaktive Proliferationen im lymphatischen Gewebe, lymphoproliferative Erkrankungen und echte Lymphome schwer abgrenzbar sein können. Die Tumorzellen können aktivierten Abwehrzellen (MOONEY et al., 1987; AVERY und AVERY, 2004) oder sogar ruhenden Lymphozyten (SKLAR und LONGTINE, 1992) ähneln. Außerdem zeigen mitunter benigne Lymphadenopathien Eigenschaften, die für maligne Tumoren charakteristisch sind, wie z. B. Infiltration der Lymphknotenkapsel und starke mitotische Aktivität (MOONEY et al., 1987). Besondere Probleme bei der Katze bereitet auch die Abgrenzung intestinaler Lymphome von Inflammatory Bowel disease (IBD) (WILLARD, 1999; RAGAINI et al., 2003; WALY et al., 2005).

Eine Möglichkeit, die klassische pathologisch-histologische Diagnostik zu unterstützen, ist der Nachweis spezifischer Eigenschaften der Tumorzellen. Grundlage hierfür ist, dass die neoplastische Zellpopulation klonalen Ursprungs ist (NOWELL, 1976). Das bedeutet, sie ist auf eine Ursprungszelle zurückzuführen, die spezifische Eigenschaften aufweist und diese auch an ihre Tochterzellen weitergibt (WAINSCOAT und FEY, 1990). Hinweise auf Klonalität können einheitliche Morphologie, einheitliche immunologische Eigenschaften, z. B. die Leichtkettenrestriktion im Fall von B-Lymphozyten (LEVY et al., 1977), einheitliche genetische Charakteristika wie chromosomale Aberrationen, z. B. für den jeweiligen Tumortyp spezifische Translokationen, oder das Vorhandensein klonal rekombinierter B- und T-Zell-Rezeptorgene sein (REZUKE et al., 1997; MCCARTHY, 1997). In der Humanmedizin wurden auch klonal in das Wirtsgenom integrierte Viren, z. B. das Epstein-Barr-Virus (EBV) oder das

---

humane T-Zell Leukämie Virus 1 (HTLV-1) für die Diagnostik genutzt (STEIN et al., 1991; CHADBURN et al., 1991; ARBER, 2000). Eine weitere wichtige Anwendung molekularbiologischer Techniken ist die Überwachung des Therapieerfolges (BILLADEAU et al., 1991; REZUKE et al. 1997; SPANGOLO et al., 2004).

Da über chromosomale Aberrationen in Lymphomen der Katze wenig bekannt ist (WU et al., 1995) und diese beim Menschen spezifisch für einen Tumortyp sind, ist die Analyse klonal rekombinierter Antigenrezeptoren zur Unterstützung der Diagnostik das Mittel der Wahl. Für die praktische Anwendung ist es sehr hilfreich, wenn auch formalin-fixierte, paraffin-eingebettete Proben untersucht werden können, was nur durch Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) möglich ist (WAN et al., 1990, GREER et al., 1990).

Ziel dieser Arbeit ist es, die nötigen Voraussetzungen zu schaffen, damit auch bei der Katze eine Methode etabliert werden kann, mit der klonale Rekombinationen der Antigenrezeptoren, speziell des T-Zell-Rezeptors  $\gamma$  (TcR $\gamma$ ), in malignen Lymphomen nachweisbar sind. Bei Aufnahme der Arbeit an diesem Projekt war von den Genen des felines T-Zell-Rezeptor  $\gamma$  (fTRG) nur zwei Abschnitte von 508 und 147 Basen aus der konstanten Region bekannt (D89023 und D89024, CHO et al., 1998).

Das Projekt baut auf einer vorhergehenden Studie auf, für die 181 Lymphome histologisch und immunhistologisch untersucht und nach der REAL-Klassifikation eingeteilt wurden (KÖHLER, 2003).

## **2. Literaturübersicht**

### **2. 1. Analyse klonal rekombinierter Antigenrezeptorgene in der Humanmedizin**

In der Humanmedizin werden molekularbiologische Methoden routinemäßig bei der Diagnostik und Klassifikation lymphoproliferativer Erkrankungen eingesetzt (REZUKE et al., 1997). Die molekulargenetischen Techniken werden an B- und T-Zell-Lymphomen v. a. in den Fällen verwendet, die morphologisch nicht eindeutig von reaktiven Infiltraten abzugrenzen sind (LORENZEN et al., 1994a). Dies trifft v. a. auf niedrig-maligne B-Zell-Lymphome zu. Entartete Lymphozyten ähneln hier häufig aktivierten reaktiven Zellen oder sogar ruhenden Zellen (SKLAR und LONGTINE, 1992). Außerdem kann eine maligne Population von reaktiven Zellen infiltriert sein, wie besonders deutlich im Fall des T-Zell-reichen B-Zell-Lymphoms (SPAGNOLO et al., 2004).

Mit Einschränkungen kann durch Analyse klonal rekombinierter Antigenrezeptorgene auch die Linienzugehörigkeit zu B- oder T-Lymphozyten bestimmt werden (TRAINOR et al., 1990). Einschränkungen hierbei ergeben sich, da 25 - 30 % der wenig differenzierten B-Zell-Lymphome und 5 - 10 % der gut differenzierten B-Zell-Lymphome auch rekombinierte T-Zell-Rezeptorgene aufweisen (MCCARTHY, 1997).

#### **2. 1. 1. Molekularbiologische Grundlagen**

Eine mögliche Zielstruktur für den molekularbiologischen Klonalitätsnachweis sind die Gene der Antigenrezeptoren der Lymphozyten. Diese stellen in der Keimbahn komplex aufgebaute Gengruppen dar, die erst durch Umlagerungen im Verlauf der Lymphozytenreifung zu funktionellen Genen werden (TONEGAWA, 1983). Im Fall der B-Lymphozyten unterliegen die Gene der schweren (IgH) und der beiden leichten Ketten IgL $\kappa$  und IgL $\lambda$  der Antikörper und im Fall der T-Lymphozyten die Ketten des T-Zell-Rezeptors (TcR) dieser somatischen Rekombination (NOSSAL, 2003; JUNG et al., 2006).

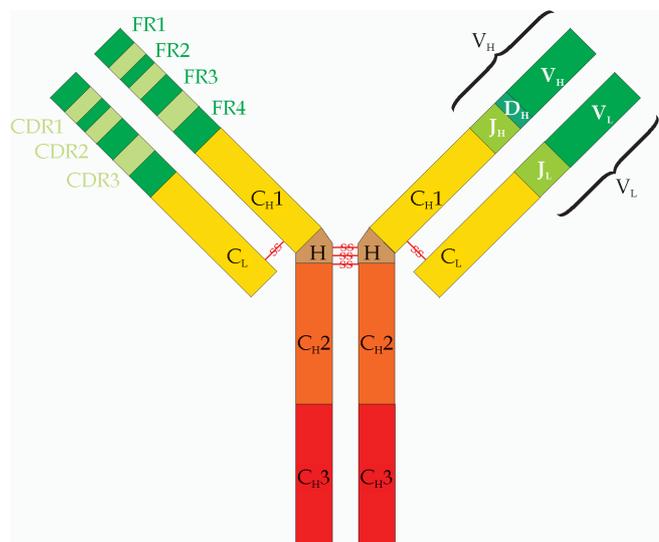
## 2. 1. 1. 1. Der Antigenrezeptor der B-Lymphozyten

### 2.1.1.1.1 Struktur der Antikörper und der für sie kodierenden Gene

Da die Vorgänge bei der somatischen Rekombination der Antigenrezeptorgene vor allem für die IgH-Kette untersucht sind, werden sie hier anhand dieses Genlocus erleutert. Antikörper sind die spezifischen Rezeptoren der B-Lymphozyten und bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Diese besitzen jeweils eine variable Domäne sowie eine konstante Domäne im Fall der leichten Ketten, beziehungsweise drei konstante Domänen im Fall der schweren Ketten des Immunglobulin  $\gamma$  (IgG). Die Verbindung der einzelnen Ketten erfolgt über Disulfid-Brücken (FLEISCHMANN, 1966; LENNOX und COHN, 1967; EDELMANN und GALL, 1969).

Säugetiere verfügen über ein großes Repertoire an verschiedenen Antikörpern. Diese werden nicht in vielen einzelnen Genen kodiert, sondern ihre Gene werden nach einem Baukastenprinzip aus mehreren Teilen zusammengesetzt (DREYER und BENNETT, 1965; HOZUMI und TONEGAWA, 1976; BERNARD et al., 1978; TONEGAWA, 1983; NOSSAL, 2003).

Der variable Anteil der schweren Kette besteht aus einer V- („variable“), einer D- („diversity“) und einer J-Region („joining“). In der Keimbahn des Menschen existieren 123 - 129  $V_H$ -Gene, 27  $D_H$ -Gene und neun  $J_H$ -Gene. Die  $V_H$ -Gene werden aufgrund von Übereinstimmungen in der Sequenz zu sieben Gen-Untergruppen zusammengefasst. Von den  $V_H$ -Genen sind ca. 38 - 46 funktionell, von den  $D_H$ -Genen 23 und von den  $J_H$ -Genen sechs (PALLARÈS et al., 1999; RUIZ et al., 1999). Die einzelnen Segmente sind hintereinander im Genom angeordnet, wobei zuerst die  $V_H$ -Gene, dann die  $D_H$ -Gene und zuletzt die  $J_H$ -Gene folgen. Am Ende des Locus der

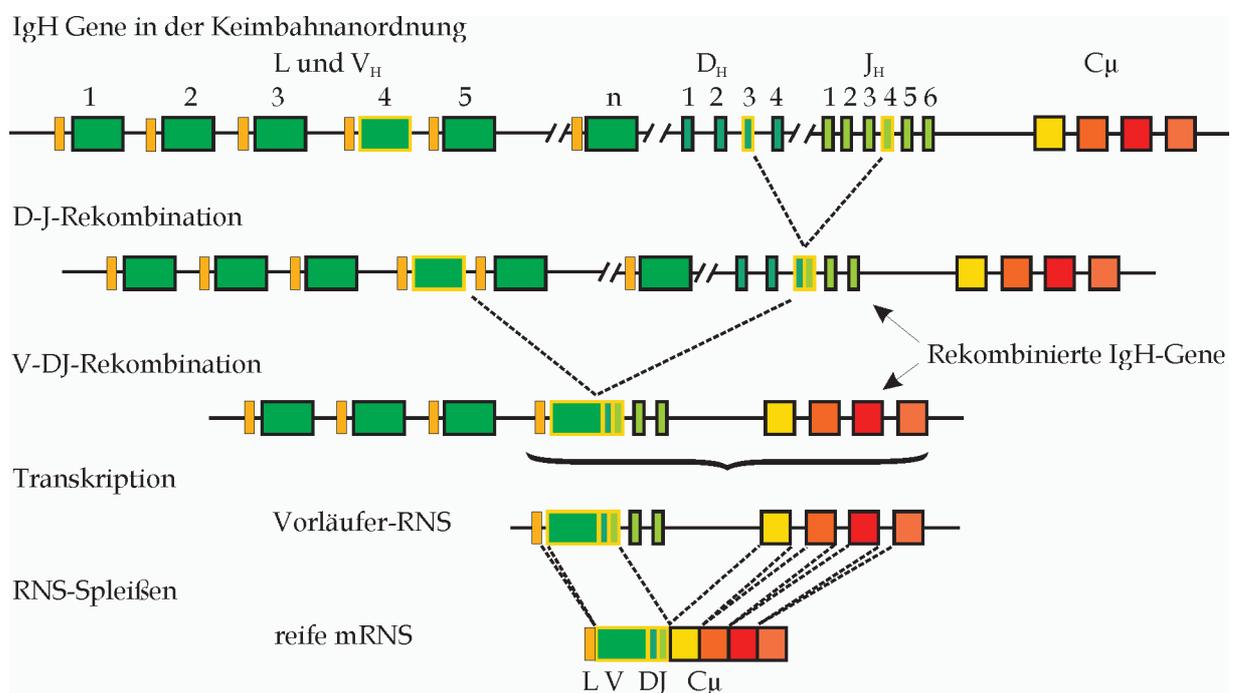


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Proteinstruktur der Immunglobuline und der sie kodierenden Gene. Modifiziert nach LORENZEN et al., 1994a.

schweren Kette liegen die Gene für die C<sub>H</sub>-Regionen. Zwischen diesen einzelnen Elementen liegen in der Keimbahnkonfiguration mehrere Kilobasenpaare (BERMAN et al., 1988; HOFKER et al., 1989; WALTER et al., 1990; LEFRANC, 2001).

Um die für einen Antikörper kodierende Sequenz zu erzeugen, wird während der Lymphozytenreifung jeweils eines der V<sub>H</sub>-, D<sub>H</sub>- und J<sub>H</sub>-Gene ausgewählt und diese einzelnen Segmente werden zu einem funktionellen Gen kombiniert (SCHILLING et al., 1980; SAKANO et al., 1980). Dieser Vorgang wird in zwei Schritten durchgeführt: zuerst erfolgt die Verbindung eines D- mit einem J-Segment, dann werden beide an ein V-Segment gebunden (ALT et al., 1984). Die Kombination mit einem C-Segment erfolgt auf der Ebene der RNS durch das Spleißen (SCHIBLER et al., 1978; GILMORE-HERBERT und WALL, 1978; JUNG et al., 2006).

Die Diversität wird dadurch weiter erhöht, dass die Verbindung zwischen D und J sowie V und D ungenau erfolgt (SAKANO et al., 1980; TONEGAWA, 1983) und dass Nukleotide ohne Matrize eingefügt werden können (siehe 2.1.1.1.2). Hierdurch entsteht die so genannte N-Region. Die resultierenden Gene weisen daher verschie-



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Rekombination und Transkription eines IgH Gens. Zuerst erfolgt die D-J-Kombination, gefolgt von der V-DJ-Kombination. Das rekombinierte Gen wird als Vorläufer IgH mRNA transkribiert, die durch Spleißen der nicht kodierenden Bereiche zur reifen IgH mRNA wird. Modifiziert nach VAN DONGEN und WOLVERS-TETTERO, 1991.

dene Längen auf, allerdings muss ein funktionierendes Leseraster gewährleistet sein (JUNG et al., 2006). Das Ergebnis ist ein einzigartiges, klonspezifisches Molekül, das an alle Tochterzellen weitergegeben wird. Nach der Aktivierung der Lymphozyten in der Immunantwort kann ein „Anpassen“ der Rezeptoren durch somatische Hypermutation erfolgen. Dadurch wird die Diversität noch einmal erhöht (TONEGAWA, 1983; NOSSAL, 2003).

Innerhalb der rekombinierten Gene gibt es Bereiche, deren Sequenz relativ konserviert ist, diese werden als „framework regions“ (FR) bezeichnet. Daneben gibt es drei hypervariable Bereiche, die als „complementarity determining regions“ (CDR) bezeichnet werden, da sie die Stellen kodieren, die im Antikörper den Kontakt mit dem Antigen aufnehmen. Besondere Bedeutung kommt der CDR3 zu, da sie die D- und N-Regionen enthält (TONEGAWA, 1983; JUNG et al., 2006).

#### 2.1.1.1. 2. V(D)J Rekombination

Die Vorgänge zur Umlagerung der Genabschnitte werden durch die Produkte der Rekombination aktivierenden Gene 1 und 2 (RAG1 und RAG2) katalysiert (SCHATZ et al., 1989; OETTINGER et al., 1990), die nur während der Umlagerungsvorgänge in der Lymphozytenreifung exprimiert und während der Proliferation herunterreguliert werden (NAGAOKA et al., 2000; JUNG und ALT, 2004). Diese binden an die Rekombinations-Signal-Sequenzen (RSS), die die Gene für die  $V_H$ -,  $D_H$ -, und  $J_H$ -Segmente flankieren (SAKANO et al., 1979, 1980; JUNG und ALT, 2004).  $D_H$ -Gene werden an beiden Seiten von RSS flankiert,  $V_H$ - und  $J_H$ -Gene nur an einer.

Die RSS bestehen aus einem hoch konservierten palindromischen Heptamer, einem konservierten Adenin-reichen Nonamer und einem dazwischen liegenden wenig konservierten Platzhalter von  $12 \pm 1$  Basenpaaren (Bp) oder  $23 \pm 1$  Bp Länge. Die Konsens-Sequenz für das Heptamer lautet 5'-CACAGTG-3' und für das Nonamer 5'-ACAAAAACC-3' (SAKANO et al., 1979, 1980; JUNG und ALT, 2004). Die Länge des Platzhalters dient zur Charakterisierung der RSS, so dass 12-RSS und 23-RSS unterschieden werden. Bei der Rekombination wird jeweils eine 12-RSS mit einer 23-RSS kombiniert, was als 12/23-Regel bezeichnet wird (SAKANO et al., 1980; TONEGAWA, 1983; JUNG und ALT, 2004).  $D_H$ -Segmente weisen auf beiden Seiten 12-RSS auf, die  $V_H$ - und  $J_H$ -Segmente eine 23-RSS (JUNG und ALT, 2004). Abweichungen

von der Konsens-Sequenz kommen häufig vor. Absolut essentielle Reste sind das „CAC“ des Heptamer und in geringerem Ausmaß das Guanin des „GTG“. Günstig für die Effizienz ist ein von Cytosinen flankierter Adenin-reicher Kern im Nonamer. Auch Längenvariationen der Spacer beeinflussen die Rekombinations-Effizienz erheblich (AKAMATSU et al., 1994).

Die Rekombination wird eingeleitet, indem RAG-1 und RAG-2 einen Komplex (RAG) bilden, der Doppelstrang-Brüche zwischen den RSS und den kodierenden Sequenzen induziert (ALT und BALTIMORE, 1982; VAN GENT et al., 1995; MCBLANE et al., 1995). Hierzu bindet RAG zunächst eine RSS, dann die zweite (JONES und GELLERT, 2002; MUNDY et al., 2002), wodurch ein RAG-DNS-Komplex entsteht, der als synaptischer Komplex bezeichnet wird. Danach induziert es einen Einzelstrangbruch am 5'-Ende jeder RSS. Der Doppelstrangbruch wird erzielt, indem die freie 3'-Hydroxylgruppe auf dem kodierenden Strang, die gegenüberliegende Phosphodiesterbindung angreift, aufbricht und durch Bildung einer neuen Phosphodiesterbindung eine geschlossene Harnadelstruktur bildet. An der RSS bleibt ein glattes 5'-phosphoryliertes Signalende übrig (VAN GENT et al., 1995; MCBLANE et al., 1995).

Im nächsten Schritt erfolgt die Ligation der kodierenden Enden und der Signalenden (ALT und BALTIMORE, 1982). Der hierfür verwendete Mechanismus entspricht dem ubiquitär zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen eingesetzten Verbinden nicht homologer DNS-Teile: „nonhomologous end joining“ (NHEJ) (TACCIOLI et al., 1993; JUNG und ALT, 2004). Die bekannten daran beteiligten Enzyme sind Ku70 und Ku80, die ein DNS-bindendes Heterodimer (Ku) bilden, XRCC4 und die DNS Ligase IV, die den Ligationskomplex bilden (CRITCHLOW et al., 1997), die katalytische Untereinheit der DNS-abhängigen Protein-Kinase (DNA-PKcs) und Artemis (JACKSON 2002; JUNG und ALT, 2004). DNA-PKcs und Artemis sind am NHEJ nur beteiligt, wenn die Enden vor der Ligation prozessiert werden müssen, wie im Fall der kodierenden Enden bei der V(D)J-Rekombination (JUNG und ALT, 2004).

Ku bildet nach Bindung der DNS-Enden mit DNA-PKcs einen Komplex, die DNS-abhängige Protein-Kinase (DNA-PK) (GOTTLIEB und JACKSON, 1993; JACKSON, 2002), die Artemis an den Doppelstrangbruch heranzuführt. Artemis wird dann phosphoryliert, was seine Endonukleaseaktivität induziert (MA et al., 2002). Diese ist nötig, um die Haarnadelstruktur der kodierenden Enden zu öffnen (ROONEY et al., 2002).

Seine Exonukleaseaktivität könnte zur Deletion von Basen an den kodierenden Enden führen (MA et al., 2002). Das Öffnen der Haarnadel erfolgt an der Spitze oder in der Nähe, im zweiten Fall entstehen 3'-Überhänge (MA et al., 2002), die, wenn sie aufgefüllt werden, zu Palindromen führen. Werden diese in die kodierende DNS übernommen, spricht man von „P“-Diversität (MCCORMACK et al., 1989; LAFAILLE et al., 1989). Welches Enzym die Überhänge auffüllt, ist noch unklar (JACKSON, 2002). Darüber hinaus kann die Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) „N“-Nukleotide ohne Template hinzufügen, wobei sie Guanin-Reste bevorzugt (ALT und BALTIMORE, 1982; KOMORI et al., 1993; GILFILLAN et al., 1993). Zuletzt verbindet die DNS Ligase IV die prozessierten Enden (CRITCHLOW et al., 1997; JACKSON, 2002). Je nach Orientierung der Sequenzen erfolgt die Rekombination als Deletion, mit Exzision eines zirkulären Episoms, das die Signalenden enthält, oder als Inversion (BALTIMORE und ALT, 1982; SCHATZ und SPANOPOULOU, 2005). Rein statistisch ist aufgrund der Triplet-Struktur des genetischen Kodes nur ein Drittel der rekombinierten Ketten produktiv (JUNG et al., 2006).

Die Abfolge der Rekombinationsvorgänge der einzelnen Segmente ist streng reguliert (JUNG et al., 2006). Zunächst wird auf beiden Allelen die D-J<sub>H</sub>-Rekombination durchgeführt, dann erfolgt die V-DJ<sub>H</sub>-Rekombination auf dem ersten Allel, entsteht hierbei kein produktives Gen, wird das zweite Allel umgelagert. Ist ein produktives Gen gebildet, werden keine weiteren Umlagerungen mehr durchgeführt. Dies wird als allelische Exklusion bezeichnet. Entsteht bei der Umlagerung kein intaktes offenes Leseraster erfolgt die Apoptose der Zelle (ALT et al., 1984, JUNG und ALT, 2004).

Die genauen Vorgänge, die zur allelischen Exklusion führen, und wie die Abschnitte, die kombiniert werden sollen, ausgewählt werden, wird zur Zeit intensiv untersucht (JUNG und ALT, 2004; JUNG et al., 2006). Ein wichtiger Faktor ist die Erreichbarkeit der DNS durch die beteiligten Proteine, was möglicherweise durch Enhancer in der Nähe der C-Region und Promoter in der Nähe jedes V-, D- und J-Abschnittes bedingt ist. Dies hat auch eine Transkription noch nicht rekombinierter Gen-Abschnitte zur Folge (KRANGEL, 2003; JUNG et al., 2006).

Die Rekombination läuft nach einer erfolgreichen Umlagerung auf dem IgH-Locus ähnlich bei den leichten Ketten ab, allerdings fehlt hier eine D-Region, so dass direkt eine V-J-Rekombination erfolgt (TONEGAWA, 1983; JUNG und ALT, 2004; JUNG et al.,

2006). Hierbei wird zunächst versucht, die  $\kappa$ -Kette umzulagern. Entsteht dabei auf beiden Allelen kein funktionelles Gen, erfolgt die Umlagerung der  $\lambda$ -Kette (JUNG et al., 2006).

Defekte bei der V(D)J-Rekombination führen bei Maus und Mensch zum Phänotyp der „Severe Combined Immunodeficiency“, da sowohl T-Zell- als auch B-Zell-Entwicklung gestört sind. Daneben kann dieser Mechanismus auch zu chromosomalen Translokationen führen, wie sie für verschiedene Lymphomtypen beschrieben sind (JUNG und ALT, 2004).

### **2. 1. 1. 2. Der Antigenrezeptor der T-Lymphozyten**

Der TcR besteht aus zwei Proteinketten, entweder  $\alpha$  und  $\beta$  oder  $\gamma$  und  $\delta$ , die mit dem CD3-Komplex zusammenwirken. Circa 95% der peripheren T-Zellen bei Mensch und Maus exprimieren den TcR  $\alpha\beta$ , die übrigen TcR  $\gamma\delta$  (BRENNER et al. 1986, STROMINGER, 1989; BOMMHARDT et al., 2004).

Während der T-Zell-Entwicklung erfolgt die Rekombination des TR- $\delta$ -Locus (TRD) und des TR- $\gamma$ -Locus (TRG) vor der des TR- $\beta$ -Locus (TRB) und des TR- $\alpha$ -Locus (TRA), so dass auch reife  $\alpha\beta$ -T-Zellen einen rekombinierten TRG enthalten (RAULET et al., 1985; PARDOLL et al., 1987; DIK et al., 2005). Auch bei den Genen der T-Zell-Rezeptoren (TR) gibt es V- und J-Segmente. D-Segmente kommen nur bei der  $\beta$ - und der  $\delta$ -Kette vor. Die Rekombination der Gene erfolgt analog zur Rekombination der schweren Kette der Antikörper (STROMINGER, 1989; ALT et al., 1992). Nach der Umlagerung erfolgen an den TR-Loci allerdings keine somatischen Mutationen (STROMINGER, 1989; HAYDAY, 2000).

In T-Zell-Lymphomen bleibt der TRB häufig in der Keimbahnkonfiguration (THEODOROU et al., 1994). Außerdem wurden in den meisten  $\alpha\beta$ -Zellen nicht produktive Rekombinationen des TRG gefunden (HEILIG und TONEGAWA, 1987; BOMMHARDT et al., 2004). Aufgrund dessen wird bevorzugt der Nachweis der Rekombination des TRG zur Diagnostik herangezogen. Der TRD-Locus liegt innerhalb des TRA-Locus und wird bei dessen Rekombination deletiert (CHIEN et al., 1987). Im Genrepertoire des TRG des Menschen gibt es 12 - 15 V-Gene, die zu 4 Untergruppen zusammengefasst werden können, 5 J-Gene und 2 C-Region Gene (LEFRANC et al., 1989). Von den TRGV-Genen sind 4 - 6 funktionell.

## 2. 1. 2. Diagnostische Anwendung

### 2. 1. 2. 1 Allgemeines

Zur Identifizierung klonaler Lymphozytenpopulationen in Probenmaterial wurde, neben der Immunhistologie, ab Mitte der 80er Jahre zunächst die „Southern Blot“-Technik an den Ketten der Immunglobuline (KORSMEYER et al., 1983; ARNOLD et al., 1983) und danach am TRB eingesetzt (BERTNESS et al., 1985). Später führte man Untersuchungen auch am TRG durch (PELICCI et al., 1987b).

Die DNS wird bei diesem Verfahren mit Restriktionsendonukleasen verdaut, durch Gelelektrophorese nach der Größe aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit spezifischen radioaktiv markierten Gensonden sichtbar gemacht. Üblicherweise verwendete Restriktionsendonukleasen waren *Bam*HI, *Eco*RI und *Hind*III. Die Sonden erkannten D-, J-, oder C-Elemente.

Bei der Rekombination der Gene gehen Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen verloren. Daher unterscheiden sich die Größen der nachgewiesenen Banden vor und nach der Rekombination. Zur Beurteilung muss die Größe der Banden in der Keimbahnkonfiguration bekannt sein. Eine sichtbare Bande entsteht, wenn ein Klon etwa 1 – 5 % aller rekombinierten Antigenrezeptoren ausmacht. Diese Methode ist gut anzuwenden an den Loci, die eine große Anzahl an V-Varianten und damit viele Rekombinationsmöglichkeiten aufweisen, das sind besonders die IgH-Kette und TRB (KORSMEYER et al., 1983; ARNOLD et al., 1983; BERTNESS et al., 1985; SPAGNOLO et al., 2004).

Der Vorteil dieser Methode ist die niedrige Rate an falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen. Nachteile sind, dass relativ große Mengen DNS guter Qualität benötigt werden und dass der Arbeits- und Kostenaufwand relativ hoch ist (LORENZEN et al., 1994a; REZUKE et al., 1997; SPAGNOLO et al., 2004). Entsprechende DNS lässt sich nur aus frischem oder gefrorenem Material sicher extrahieren.

Zu Beginn der 90iger Jahre wurde dann die PCR für diese Anwendung etabliert (TRAINOR et al., 1990; BRISCO et al., 1990; WAN et al., 1990; BOURGUIN et al., 1990; GOUDIE et al., 1990; MCCARTHY et al., 1990; DEANE und NORTON, 1990), nachdem GOUDIE 1988 die theoretischen Grundlagen gelegt hatte. Diese Methode beruht darauf, dass ein Amplifizieren der gesuchten Gene nur nach der Rekombination

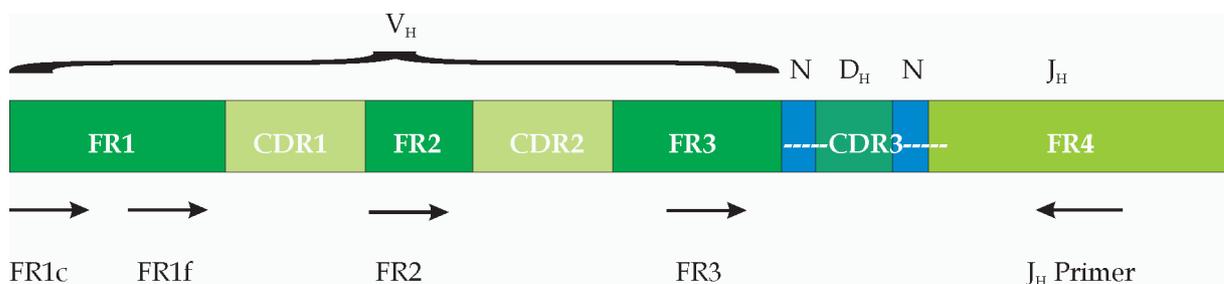
möglich ist, da die Regionen, an die die Primer binden, vorher zu weit auseinander liegen (GOUDIE, 1989; 1990).

Die Vorteile der PCR sind, dass sie schneller durchführbar ist und dass geringere Mengen an DNS benötigt werden, deren Qualität weniger gut sein kann. Außerdem ist sie kostengünstiger, kann an Material durchgeführt werden, das in Paraffin eingebettet war und benötigt keine radioaktiven Marker (SEGAL et al., 1992; LORENZEN et al., 1994a, b; SPAGNOLO et al., 2004).

## 2. 1. 2. 2 Anwendung der PCR zur Diagnose maligner Lymphome

### 2. 1. 2. 2. 1 B-Zell-Lymphome

Als Zielstrukturen der Primer wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen verschiedene Abschnitte der IgH-Kette verwendet. Aufgrund der großen Vielfalt an unterschiedlichen Genen ist es unmöglich, sequenzspezifische Primer einzusetzen. Daher wählte man die relativ konservierten Regionen als Bindungsbereiche für die Primer aus und verwendete z. T. degenerierte Primer, also Primer mit zwei oder mehr verschiedenen Basen an einer Stelle (BRISCO et al., 1990; TRAINOR et al., 1990). Man testete Primer, die gegen FR1, FR2 oder FR3 gerichtet waren, jeweils in Verbindung mit Primern, die an die J<sub>H</sub>-Region binden.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung eines rekombinierten IgH Gens. Es sind die relativen Positionen der Primer dargestellt, die bei den verschiedenen Strategien verwendet werden. **FR:** framework regions; **CDR:** complementarity determining regions; **c:** Konsens-Primer; **f:** familienspezifische Primer. Modifiziert nach AUBIN et al. 1995.

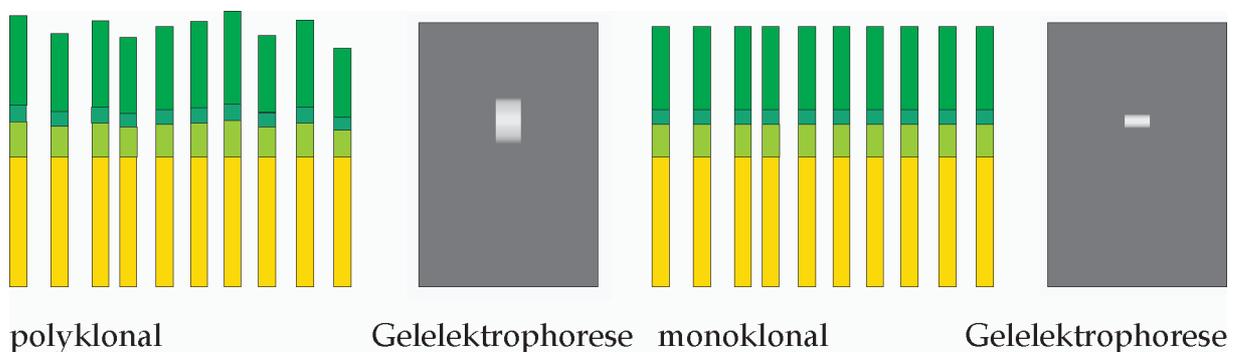
Aufgrund der Homologie in diesen Regionen kann eine begrenzte Zahl an Primern eingesetzt werden. Bei FR2 (RAMASAMY et al., 1992) und FR3 (BRISCO et al., 1990; TRAINOR et al., 1990; MCCARTHY et al., 1990) genügt jeweils ein Primer, ein so genannter Konsens-Primer, um einen hohen Prozentsatz der möglichen Rekombinationen nachzuweisen. Für FR1 wurden sowohl Konsens-Primer (FR1c) (AUBIN et

al., 1995) als auch familien-spezifische Primer entwickelt (FR1f) (DEANE und NORTON, 1991). Nachdem die PCR zunächst an frischem oder gefrorenem Material angewendet wurde, konnte sie mit Erfolg auf formalinfixiertes, paraffineingebettetes Material übertragen werden (WAN et al., 1990).

Bei Einsatz familien-spezifischer Primer erhält man zusätzlich Informationen über die Verwendung der einzelnen Gen-Untergruppen bei der Rekombination. Dies ist einerseits, wenn in einer Probe eine Untergruppe dominiert, ein weiteres Klonalitäts-Kriterium, und andererseits von Bedeutung, da bei bestimmten Lymphomtypen bestimmte Gen-Untergruppen bevorzugt auftreten (LORENZEN et al., 1994a).

Je nach eingesetzter Strategie variiert die Länge der erzeugten Moleküle zwischen 100 und 300 Basenpaaren (Bp). DNS dieser Länge kann relativ problemlos aus formalinfixiertem, paraffin-eingebettetem Material gewonnen werden (GREER et al., 1990).

Nach der Amplifikation werden die Produkte durch Gelelektrophorese nach der Größe aufgetrennt und i. d. R. nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Es wurde aber auch die Detektion mit spezifischen radioaktiv markierten Sonden durchgeführt (DEANE und NORTON, 1990).



**Abbildung 4:** Klonalitätsbestimmung mit Konsens-Primern. Bei polyklonalem Ausgangsmaterial sind die amplifizierten Genabschnitte, wie links dargestellt, unterschiedlich lang, es ergibt sich daher eine unscharfe Bande in der Elektrophorese (rechts). Bei monoklonalem Material ist die Bande scharf. Modifiziert nach LORENZEN et al., 1994a.

Im Fall von klonalen Populationen sieht man hierbei eine oder wenige diskrete Banden, bei polyklonalen Populationen entsteht eine unscharfe Bande oder „Schmier“. Dies beruht auf der unterschiedlichen Länge der N-Regionen in den rekombinierten Immunglobulingenen. Die Elektrophorese wurde zunächst auf Agarosegel durchgeführt (TRAINOR et al., 1990; WAN et al., 1990), aber durch Verwendung von Polyacrylamid-Gel (PAGE) kann die Auflösung der Banden verbessert

werden (MCCARTHY et al., 1990; POLLARD et al., 1993). Im Gegensatz zu den Problemen mit der Auflösung bei Untersuchung des TRG ist bei der IgH-Kette aufgrund der größeren Unterschiede in der Moleküllänge die konventionelle Polyacrylamid-Gelelektrophorese ausreichend (BRADY et al., 1999; BRINCKMANN et al., 2000). Dennoch ist die Spezifität im Vergleich zum Southern Blot geringer und nach neueren Studien ist der Einfluss der Fixation auf die Qualität der DNS größer als früher angenommen (BAGG et al., 2002).

#### 2. 1. 2. 2. 2 T-Zell-Lymphome

Die molekulare Diagnostik auf Genebene ist bei T-Zell-Lymphomen bedeutender als bei B-Zell-Lymphomen, da ihnen immunphänotypische Marker, wie die Leichtkettenrestriktion der B-Zellen, fehlen (LORENZEN et al., 1994a).

Vorstellungen zum T-Zell-Klonalitätsnachweis mit der PCR wurden von GOUDIE am TRG theoretisch entwickelt (GOUDIE, 1989) und dann auch praktisch umgesetzt (GOUDIE et al., 1990). Er verwendete jeweils einen Primer für jede V-Genvariante und mehrere J-Region-Primer. BOURGUIN et al. (1990) entwickelten dann Konsens-Primer, setzten aber eine „nested“ PCR ein. MCCARTHY et al. (1992) vereinfachten die Methode und verwenden zwei V-Region- und zwei J-Region-Primer. Man setzte auch Konsens-Primer für die V $\gamma$ I-Untergruppe zusammen mit spezifischen Primern für die anderen TRGV-Varianten ein (LORENZEN et al., 1994b). TRGV-spezifische Primer testete man auch im Multiplexansatz, d. h. man kombinierte sie in einem Ansatz (FÖDINGER et al., 1996). Der Klonalitätsnachweis mit PCR am TRB liefert häufig falsch-negative Ergebnisse, daher ist der TRG geeigneter (DISS et al., 1995).

Aufgrund des Fehlens einer D-Region im TRG sind die Größenunterschiede der synthetisierten Moleküle geringer als bei der IgH-Kette, was Probleme bei der Auftrennung nach der Größe in einer normalen PAGE bereitet. Daher wurden hierfür modernere Methoden entwickelt wie die Technik des „single strand conformation polymorphism“ (YU und ALAIBAC, 1996; LYNAS und HOWE, 1998; SIGNORETTI et al., 1999; CHEN et al., 2004), der Temperaturgradient-Gelelektrophorese und der Denaturierungsgradient-Gelelektrophorese (GREINER et al., 1995; THEODOROU et al., 1996).

Eine Technik, die auch unter den Bedingungen der Tiermedizin eingesetzt werden kann, ist die Heteroduplexanalyse. Hierbei wird das Amplifikat auf ca. 95 °C erhitzt wobei sich die beiden DNS-Stränge trennen, und abgekühlt, was zum Renaturieren der DNS führt. Danach wird die Elektrophorese durchgeführt. Im klonalen Fall treffen beim Renaturieren homologe Moleküle aufeinander, was ohne Auswirkungen auf die Elektrophorese bleibt. Im polyklonalen Fall verbinden sich heterologe Moleküle, die sich vor allem in der N-Region unterscheiden. Die dabei entstehenden Sekundärstrukturen der DNS beeinflussen die Laufeigenschaften in der Elektrophorese, so dass die Auflösung verbessert wird (BOTTARO et al., 1994; PONTI et al., 2005; WERNER et al., 2005; MOORE et al., 2005).

Darüber hinaus wurden sowohl für die Untersuchung des TR als auch der IgH-Kette automatisierte Techniken eingesetzt (LINKE et al., 1997; MUNRO et al., 1999; MEIER et al., 2001). In der routinemäßigen Diagnostik wird aber weiterhin die PAGE auch für TRG eingesetzt (THÉRIAULT et al., 2000).

## **2. 2. Maligne Lymphome der Katze**

### **2. 2. 1 Begriffsbestimmung und Vorkommen**

Lymphome sind solide neoplastische Proliferationen von Zellen der lymphatischen Reihe in der Hämatopoese. Sie finden sich in Lymphknoten, anderen lymphatischen Organen oder extranodaler Lokalisation (MESSIK und CALDERWOOD MAYS, 2000). Entsteht die Neoplasie primär dem Knochenmark und sind die neoplastischen Zellen in großen Mengen im peripheren Blut vorhanden, wird die Erkrankung als Leukämie bezeichnet (FRY und MCGAVIN, 2007). Allerdings können auch Lymphome, die an anderen Stellen entstehen, das Knochenmark infiltrieren und einen leukämischen Verlauf nehmen. Die Leukämien werden nach dem Zelltyp in lymphatische und myeloische Formen unterteilt, sowie nach dem Verlauf in akute und chronische (FRY und MCGAVIN, 2007). Bei der Katze und auch den übrigen Haussäugetieren sind Tumoren der myeloischen Differenzierungsreihe der Hämatopoese weitaus seltener als lymphatische Formen (REINACHER und THEILEN 1987; KÖHLER, 2003).

Erste Beschreibungen von Lymphomen bei Katzen gehen auf das ausgehende 19. Jahrhundert zurück (SIEDAMGROTSKY, 1871; BOLLINGER, 1874). Es ist der am häufigsten vorkommende Tumor bei Katzen. In einer Studie von DORN et al. (1968) sind bis zu einem Drittel aller felines Neoplasien hämoproliferative Erkrankungen. Hiervon sind ca. 90 % lymphatische Tumore. Die Inzidenz wird mit 41,6 pro 100.000 Katzen und Jahr angegeben (DORN et al., 1967). Studien von REINACHER et al. (REINACHER und THEILEN, 1987; REINACHER et al., 1995; REINACHER, 1997) ergaben, dass Tumoren der weißen Blutzellen über 50 % der neoplastischen Proliferationen bei seziierten Katzen ausmachen, davon waren über 90 % Tumoren lymphatischer Zellen.

### 2. 2. 2. Formen des malignen Lymphoms bei der Katze

Bei den malignen Lymphomen, die auch als Lymphosarkome bezeichnet werden, unterscheidet man makroskopisch, in Anlehnung an JARRETT et al. (1966) und CRIGHTON (1968), die multizentrische Form, die intestinale Form, die mediastinale Form (Thymusform) und so genannte andere Lymphomformen. Daneben kommen Sonderformen vor, die nicht in dieses Schema einzuordnen sind (REINACHER, 1997).

Bei den **multizentrischen Lymphomen** sind viele verschiedene Organe betroffen und es findet sich kein dominanter zusammenhängender Tumorknoten. Bei der so genannten **mediastinalen Form** (Thymusform) sitzt der größte zusammenhängende Knoten im präkardialen Mediastinum und bei der **intestinalen Form** im Magen-Darm-Trakt oder den zugehörigen Lymphknoten. Bei den so genannten **anderen Lymphomformen** findet sich i. d. R. ein solitärer Knoten, der in der Niere, der Haut, der Nase, dem Auge, dem ZNS oder in sonstiger extranodaler Lokalisation liegen kann. Die **Sonderformen** treten als Osteosklerose oder Myelofibrose auf (JARRETT, 1966; CRIGHTON 1968; Hardy, 1981; REINACHER, 1997; COUTO, 2001).

Neben Hinweisen darauf, dass Zigarettenrauch durch Passivrauchen bei Katzen Lymphome auslösen kann (BERTONE et al., 2002), gilt es als gesichert, dass bei der Pathogenese lymphoproliferativer Erkrankungen der Katze Retroviren eine Rolle spielen. Die Virusätiologie wurde 1964 von JARRETT et al. aufgedeckt. In daraufhin durchgeführten Untersuchungen war bei bis zu 70 % der an einem Lymphom oder einer Leukämie erkrankten Katzen FeLV nachweisbar (HARDY et al., 1969; COTTER et

al., 1975; FRANCIS et al., 1979; HARDY, 1981). Nach aktuellen Studien (VAIL et al., 1998; LOUWERENS et al., 2005; SUNTZ, 2007) nimmt seit der Einführung der Impfung gegen FeLV die Zahl der FeLV-Antigen-positiven Lymphome ab, die Zahl der mit Lymphomen in der Klinik vorgestellten Tiere nimmt jedoch zu (LOUWERENS et al., 2005). Die Mehrzahl der FeLV-positiven Lymphome zeigt T-Zell-Phänotyp (JACKSON et al., 1996; KÖHLER, 2003).

Seit der Isolierung des Felinen Immundefizienz Virus im Jahr 1986 (PEDERSEN et al., 1987) ergaben sich auch Hinweise darauf, dass es mit lymphatischen Neoplasien in Zusammenhang steht (GRUFFYDD-JONES et al., 1988; SHELTON et al., 1989; YAMAMOTO et al., 1989; HUTSON et al., 1991; CALLANAN et al., 1992, 1996; STEINHAEUER, 2000). Eine besonders deutliche Korrelation ergab sich in Australien, wo 50 % (GABOR et al., 2001) bzw. 46 % (COURT et al., 1997) der Katzen mit Lymphomen seropositiv getestet wurden. In der gleichen geographischen Region konnte eine Prävalenz der FIV-Infektion von 6,5 % bis 7,5 % festgestellt werden (MALIK et al., (1997).

### **2. 2. 3. Molekulargenetische Charakterisierung maligner Lymphome der Katze**

Bei Untersuchungen zur Pathogenese FeLV- und FIV-induzierter Tumoren wurden auch in der Veterinärmedizin Klonalitätsuntersuchungen angewendet. Hierbei konnten sowohl klonale Rekombination des TRB (LEVESQUE et al., 1990; TSATSANIS et al., 1994; TERRY et al., 1995; CALLANAN et al., 1996; ENDO et al., 1997, 1998; BEATTY et al., 1998; FUJINO et al., 2004) als auch des TRG (ENDO et al., 1998; FUJINO et al., 2004) und der IgH-Kette (TSATSANIS et al., 1994; TERRY et al., 1995; ENDO et al., 1997, 1998; BEATTY et al., 1998; FUJINO et al., 2004) mit Hilfe des Southern Blot festgestellt und dadurch die Klonalität der Zelllinien belegt werden. Im Fall des TRG konnte man allerdings nur die Keimbahnordnung nachweisen (ENDO et al., 1998; FUJINO et al., 2004). In neuerer Zeit wurden auch Gene der Variablen Regionen der IgH-Kette und des TRG der Katze beschrieben und es erfolgten bereits Klonalitätsuntersuchungen mit der PCR (MOORE et al., 2005; WERNER et al., 2005). Allerdings unterblieb die allgemeine Veröffentlichung der dabei gewonnenen Nukleotidsequenzen in der Gen-Datenbank (GeneBank). Für den TRB stellte man auch die Transduktion einer

kompletten rekombinierten und gespleißten DNS-Sequenz fest (Fulton et al., 1987; Tsatsanis et al., 1994).

Daneben fanden auch andere Strategien zum Nachweis einer klonalen Population Anwendung, wie z. B. der Nachweis der klonalen Integration des FeLV-Provirus an einer ganz bestimmten Stelle des Wirtszellgenoms (CASEY et al., 1981; TERRY et al., 1995; HISASUE et al., 2000). Auch chromosomale Translokationen konnten in Einzelfällen beschrieben werden (WU et al., 1995).

Außer bei der Katze erfolgten bei den kleinen Haustieren Klonalitätsuntersuchungen auch beim Hund. Hierbei wurden Rekombinationen der IgH-Kette und des TRB mit Hilfe des Southern Blot charakterisiert (MOMOI et al., 1993), aber es erfolgte auch eine Untersuchung des TRG (VERNAU und MOORE, 1999; BURNETT et al., 2003; LANA et al., 2006) und des TRB (DREIZ et al., 1999), sowie der IgH-Kette (BURNETT et al., 2003; TAMURA et al., 2006; LANA et al., 2006) mit Hilfe der PCR. Darüber hinaus untersuchte man auch Lymphome beim Rind mit Hilfe des Southern Blot auf Klonalität (ISHIGURO et al., 1994a, b).

## **2. 3. Der TcR $\gamma$**

### **2. 3. 1 Entdeckung und Allgemeines**

Bei der Suche nach den Antigenrezeptoren der T-Lymphozyten identifizierte man zunächst durch monoklonale Antikörper einen Rezeptor mit zwei Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$  (ALLISON et al., 1982; HAAS et al., 1993). Danach wurden bei der Maus die dazugehörigen Gene und deren somatische Rekombination beschrieben (YANAGI et al., 1984; HEDRICK et al., 1984). Hierbei fand man die mRNA eines weiteren Genes, das in T-Zellen eine somatische Rekombination durchläuft. Nachdem es zunächst für die  $\alpha$ -Kette gehalten wurde, da es aus einer Zelllinie zytotoxischer  $\alpha\beta$ -T-Zellen isoliert worden war, stellte sich schnell heraus, dass es eine weitere Kette war, die man als  $\gamma$  bezeichnete (SAITO et al., 1984a, b; HAYDAY et al., 1985; KRANZ et al., 1985a). Kurz darauf konnte ein homologes Gen auch beim Menschen nachgewiesen werden (LEFRANC und RABBITS, 1985; MURRE et al., 1985). Durch daraufhin erzeugte Antikörper erkannte man ein zweites Heterodimer, das als T-Zell-Rezeptor fungiert, den  $\gamma\delta$ -Rezeptor (BRENNER et al., 1986; BANK et al., 1986). Der Genlocus der  $\delta$ -Kette

wurde später ebenfalls eher zufällig kloniert, da er innerhalb des Locus der  $\alpha$ -Kette liegt (CHIEN et al. 1987).

$\gamma\delta$ -T-Zellen machen bei Mensch und Maus 1 - 5 % der zirkulierenden T-Lymphozyten und der in lymphatischen Organen ansässigen T-Lymphozyten aus (BRENNER et al., 1986; LANIER et al., 1988; FALINI et al., 1989). In verschiedenen Epithelien sind es dagegen über 50 % (ITOHARA et al., 1989, 1990; ASARNOW et al., 1989). Bei Wiederkäuern sind dagegen 20 - 40 % der zirkulierenden T-Lymphozyten  $\gamma\delta^+$  (MACKAY und HEIN, 1989; HEIN und MACKAY, 1991). Das einzige Charakteristikum der  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist die Expression ihres TcR (HAYDAY, 2000). Sie sind meist CD4<sup>-</sup> und CD8<sup>-</sup> (BANK et al., 1986; LANIER et al., 1986; ITOHARA et al., 1989; HAAS et al., 1993) und benötigen daher meist auch keine professionellen antigenpräsentierenden Zellen um Antigen zu erkennen. Sie sind also meist nicht MHC-restringiert wie die  $\alpha\beta$ -T-Zellen (HAYDAY, 2000; GIRARDI, 2006).

### 2.3.2 Entwicklung und Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen

T-Lymphozyten durchlaufen ihre Reifung charakteristischer Weise im Thymus. Die Lymphozytenvorläufer bei Mensch und Maus entstehen dabei wahrscheinlich aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle im Knochenmark (GALY et al., 1995; BLOM und SPITS, 2006). Hieraus entwickeln sich Zellen, die zur Differenzierung in B-Zellen und dendritische Zellen neigen und solche, die sich in T-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und dendritische Zellen entwickeln können (BLOM und SPITS, 2006). Ein wichtiger Hinweis auf einen gemeinsamen Ausgangspunkt sind D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>-Rekombinationen in 30 - 50 % der peripheren T-Zellen (BORN et al., 1988) und in unreifen Vorläufer-T-Zellen (ALLMAN et al., 2003).

Die weitere Differenzierung der T-Zellen erfolgt dann im Thymus. Über den Blutweg besiedeln pluripotente CD34<sup>+</sup>CD38<sup>lo</sup> Vorläuferzellen, die sich zu T-Zellen, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen entwickeln können, den Thymus (RES et al., 1996; DIK et al., 2005). Die weiteren Entwicklungsstadien werden nach der Expression von Oberflächenmolekülen eingeteilt in doppelt negativ (DN: CD4<sup>-</sup> und CD8<sup>-</sup>), unreif einfach positiv (ISP: CD4<sup>+</sup>) und doppelt positiv (DP: CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>). Die reifen  $\alpha\beta$ -T-Zellen sind dann CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> (DIK et al., 2005; BLOM und SPITS, 2006).

$\gamma\delta$ -Zellen zweigen im DN-Stadium ab, das beim Menschen anhand der Expression von CD34, CD38 und CD1a in drei Abschnitte untergliedert wird. Bereits im ersten Abschnitt, CD34<sup>+</sup>C38<sup>-</sup>CD1a<sup>-</sup>, beginnt die Rekombination des TRD-Locus, im zweiten Abschnitt, CD34<sup>+</sup>C38<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup>, konnten Rekombinationen des TRG-Locus nachgewiesen werden. Diese erreichten ihren Höhepunkt im dritten Abschnitt, CD34<sup>+</sup>C38<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>. Im zweiten Abschnitt fanden sich auch bereits wenige partielle Rekombinationen des TRB-Locus und wenige vollständige fanden sich im dritten Abschnitt (DIK et al., 2005). Im dritten Abschnitt konnte auch die Expression von pT $\alpha$ , einer immer identischen  $\alpha$ -Kette, die mit der  $\beta$ -Kette einen TcR-Vorläufer (prä-TcR) bildet, und Rekombinationen der Gene des TRA-Locus nachgewiesen werden. Dies deutet an, dass ab hier die Entwicklung zu  $\alpha\beta$ -Zellen festgelegt ist (DIK et al., 2005; BLOM und SPITS, 2006).

Da in  $\alpha\beta$ -Zellen nicht produktive Rekombinationen der TRG- und/oder TRD-Loci gefunden wurden (HEILIG und TONEGAWA, 1987), da die Rekombinationen der Ketten in der beschriebenen Reihenfolge abläuft und in den meisten  $\gamma\delta$ -Zellen keine produktiven Rekombinationen des TRB-Locus gefunden wurden (RAULET et al., 1985; PARDOLL et al., 1987; DIK et al. 2005), wird angenommen, dass  $\alpha\beta$ -Zellen aus solchen T-Lymphozytenvorläufern entstehen, die keinen funktionellen  $\gamma\delta$ -Rezeptor exprimieren können (PARDOLL et al., 1987; KANG et al., 1998; JOACHIMS et al., 2006). In neueren Studien konnte aber auch nachgewiesen werden, dass die Expression des prä-TcR die Transkription des TRG abreguliert und so die Entwicklung zu  $\alpha\beta$ -Zellen festlegt, möglicherweise auch, wenn funktionelle  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten vorhanden sind (FERRERO et al., 2006). Wie genau das Schicksal der Zellen festgelegt wird, ist also noch unklar. Eine wichtige Rolle spielen wahrscheinlich Signale, die von den jeweiligen TcRs weitergeleitet werden, wobei ein funktioneller TcR $\gamma\delta$  stärkere Signale induziert, da er stärker exprimiert wird und der prä-TcR schwächere Signale, da er sehr gering exprimiert wird. Die Festlegung als  $\gamma\delta$ -T-Zellen wird in diesem Modell durch starke Signale induziert und als  $\alpha\beta$ -T-Zellen durch schwache (HAYES et al., 2003, 2005; HAKS et al., 2005; LAURITSEN et al., 2006). In wieweit  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine Positiv- oder Negativselektion durchlaufen, ist noch nicht absolut klar (HAYDAY, 2000).

Die reifen  $\gamma\delta$ -T-Zellen wandern aus dem Thymus aus und besiedeln besonders Epithelien verschiedener Schleimhäute und in weit geringerem Ausmaß periphere lymphatische Organe (HAYDAY, 2000; LAURITSEN et al., 2006).

Die Funktionen der  $\gamma\delta$ -T-Zellen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Sie scheinen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort bei der erworbenen, aber auch der angeborenen Immunität und bei der Regulation von Regeneration und Reparatur zu spielen. Sie sind auch bedeutend bei der Abwehr von Organismen bevor das adaptive Immunsystem reagieren kann und bei der Bekämpfung epithelialer Tumoren. Dies wird besonders deutlich durch ihre relativ große Zahl im Bereich der Körperoberflächen, besonders im Darmepithel und im Epithel der Reproduktionsorgane sowie der Haut. Ein interessanter Aspekt hierbei ist, dass die  $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation im jeweiligen Kompartiment meistens eine bestimmte  $V\gamma$  und  $V\delta$  Variante trägt. Diese jeweiligen Populationen entstehen zu bestimmten Zeiten in der Fetalentwicklung und wandern an ihren Ansitzort aus, wo sie sich weiter vermehren. Die meisten  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die bei Menschen im Blut zirkulieren, tragen z. B.  $V\gamma 9$  und  $V\delta 2$  (HAYDAY, 2000; CARDING und EGAN, 2002; GIRARDI, 2006).

Als Effektormechanismen wurden nachgewiesen, dass  $\gamma\delta$ -Zellen Zielzellen lysieren können (BORST et al., 1987; BRENNER et al., 1987; LANIER et al., 1986) und dass sie Perforin und Serin-Esterase 1 und 2 exprimieren (NAKATA et al., 1990; KOIZUMI et al., 1991). Daneben können bestimmte Subpopulationen auch als professionelle antigen-präsentierende Zellen für  $\alpha\beta$ -Zellen fungieren (BRANDES et al., 2005). Andere Subpopulationen sind an der Beseitigung entzündlicher Infiltrate beteiligt, indem sie über Fas-Ligand die Apoptose von Makrophagen induzieren (DALTON et al., 2003, 2004).

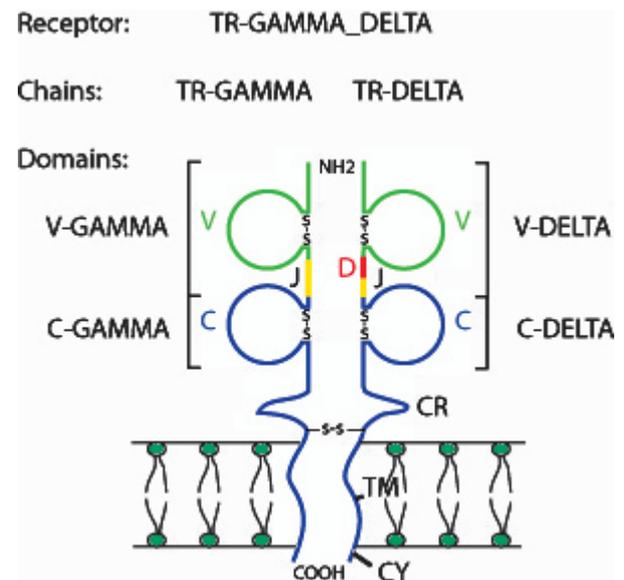
### **2. 3. 3 Struktur des TcR $\gamma$**

Wie bereits zu Beginn der Erforschung des TcR $\gamma\delta$  vorausgesagt, entspricht seine Struktur weitgehend der des antigenbindenden Fragmentes (Fab) der Immunglobuline, das aus zwei Ketten mit je einer V- und einer C-Domäne zusammengesetzt ist (SAITO et al., 1984a; ALLISON et al., 2001). Innerhalb der Domänen besteht jeweils eine Disulfid-Brücke und die Verbindung der Ketten erfolgt ebenfalls über eine Disulfid-Brücke (SAITO et al., 1984a). Eine Ausnahme bildet hierbei die zweite

Variante der  $C\gamma$ -Region des Menschen, wo das Cystein fehlt und keine kovalente Verbindung mit der  $\delta$ -Kette erfolgt (LEFRANC, et al., 1986a; PELICCI et al., 1987a).

Wie bei den Antikörpern kann die ca. 110 Aminosäuren lange V-Domäne in drei CDRs und 4 FRs eingeteilt werden. CDR1 und CDR2 sind dabei in der V-Region kodiert, CDR3 entsteht bei der V(D)J-Rekombination und enthält auch Teile der V- und der J-Region, sowie die D-Region bei der  $\delta$ -Kette. Der Rest der J-Region kodiert für FR4. Vor der V-Region wird ein 18 – 20 Aminosäuren langes Signalpeptid kodiert (SAITO, et al., 1984a; LEFRANC et al., 1986b, 1999, 2003).

Um die Vergleichbarkeit der V-Domäne verschiedener Spezies und verschiedener Antigenrezeptortypen zu gewährleisten, wurde von LEFRANC et al. (1999, 2003) ein besonderes Nummerierungssystem entwickelt. Hierbei werden konservierten Aminosäuren feste Positionen zugeteilt und ausgehend von ihnen die CDRs und FRs eingeteilt. Charakteristisch sind hierbei die Cysteine an Position 23 und 104, sowie das Tryptophan an Position 41. An Position 89 liegt eine hydrophobe Aminosäure; dies ist häufig ein Leucin. FR1 umfasst die Aminosäuren 1 bis 26, und ist 25 – 26 Aminosäuren lang. Sind für einen bestimmten Rezeptor die Bereiche kürzer, wird am Ende des Bereiches eine Lücke eingefügt, die Bandbreite ist jeweils an die längsten bzw. kürzesten bekannten Varianten angepasst. CDR1 umfasst die Positionen 27 – 38, mit 5 – 12 Aminosäuren, FR2 die Positionen 39 – 55 mit 16 – 17 Aminosäuren, CDR2 die Positionen 56 – 65 mit 0 – 10 Aminosäuren und FR3 die Positionen 66 – 104 mit 36 – 39 Aminosäuren. FR1 und 3 werden jeweils durch die konservierten Cysteine charakterisiert, FR3 zusätzlich durch die hydrophobe Aminosäure und FR2 durch das Tryptophan. In der Keimbahnkonfiguration reicht die CDR3 von der Aminosäure nach dem zweiten Cystein bis zur RSS, was 2 bis 12 Aminosäuren sein



**Abbildung 5:** Schematische Struktur eines  $TcR\gamma\delta$ . PROTAT et al., 2006. **CR:** Verbindungsstück; **TM:** tranmembranäre Region; **CY:** cytoplasmatische Region.

können. Im rekombinierten Zustand reicht die CDR3 bis zur Aminosäure vor dem konservierten Tryptophan oder Phenylalanin der J-Region, das an Position 118 gesetzt wird. Für längere oder kürzere CDR3 werden Positionen ausgehend von 111 weggelassen oder zwischen 111 und 112 werden Positionen eingefügt. FR4 reicht von Position 118 bis 129 und umfasst 10 – 12 Aminosäuren. Die Länge der CDRs wird dadurch für den Rezeptortyp und die V-Untergruppe charakteristisch. Die hydrophoben Aminosäuren der FR liegen bei diesem System ebenfalls an festen Positionen.

Die CDR1 des humanen TRGV9, 10 und 11 ist zwei Aminosäuren länger als bei den anderen Varianten, die 6 Aminosäuren aufweisen. Bei TRGV9 und 11 finden sich in CDR2 sieben Aminosäuren, bei den anderen Varianten acht (PALLARÈS und FOLCH, 2002; HAYDAY, 2000). Für die CDR3 konnten Längen von 4 – 15 Aminosäuren, also 12 – 45 Bp nachgewiesen werden (ROCK et al., 1994<sup>1</sup>). Im Gegensatz zu den Immunglobulinen konnten an den TR-Genen keine somatischen Mutationen festgestellt werden, so dass die Diversität in den CDR1 und 2 auf das Keimbahnrepertoire zurückzuführen ist (HAYDAY et al., 1985; 2000; QUERTERMOUS et al., 1986b; LEFRANC und RABBITS, 1991).

Beim TcR $\gamma$  kommt häufig ein „IHWY“-Motiv an den Positionen 39 – 42 der V-Domäne vor. Hier liegt der Beginn von FR2 und das konservierte Tryptophan (W) (ARDEN et al., 1995a, b; HAYDAY, 2000). Allgemein findet sich hier bei allen Antigenrezeptoren vieler Spezies an den Positionen 41 – 44 ein „WYRQ“-Motiv, dieses ist bei den meisten Varianten des TcR $\gamma$  der Maus vorhanden, aber nur bei wenigen des Menschen (RAST und LITMAN, 1994; ARDEN et al., 1995a, b). Ein ebenfalls häufiges Motiv ist „YYCA“ um das konservierte zweite Cystein am Ende von FR 3 (RAST und LITMAN, 1994). Dieses ist bei der  $\gamma$ -Kette von Mensch und Maus zu finden.

Die C-Region setzt sich ebenfalls aus mehreren funktionellen Bereichen zusammen. Das Exon 1 von TRGC bei Mensch und Maus ist 330 Bp lang und kodiert die C-Domäne, die der der Antikörper entspricht (HAYDAY, 1985; LEFRANC et al., 1986a, 2005a, b; PELICCI et al., 1987a; ALLISON et al., 2001).

---

<sup>1</sup> Die Zahlenangaben aus dieser Veröffentlichung wurden an die besondere IMGT-Nummerierung angepasst (LEFRANC et al., 1999, 2003). Die Originalangabe lautet ein – zwölf Aminosäuren.

Das zweite Exon, das bei der 2. Variante der C-Region des Menschen dupliziert oder tripliziert sein kann, kodiert ein Verbindungsstück und das dritte Exon die hydrophobe, 24 Aminosäuren lange, transmembranäre und die positiv geladene, sieben Aminosäuren lange, zytoplasmatische Region (SAITO et al, 1984; HAYDAY, 1985; LEFRANC et al., 1986a; PELICCI et al., 1987a; MARTINEZ-JEAN, 2007). Das Verbindungsstück kann also unterschiedlich lang sein. Für die C-Domäne wurde von LEFRANC et al. (2005a) ebenfalls ein Positionierungssystem entwickelt, das mit den gleichen konservierten Positionen funktioniert. Häufige Motive im TcR $\gamma$  des Menschen, der Wiederkäuer und der Maus sind „LCLL“ um das erste Cystein und „CIV“ um das zweite Cystein. Um das konservierte Tryptophan existiert beim Menschen ähnlich wie in der V-Region ein „IHW“ (MARTINEZ-JEAN, 2007).

## **2. 3. 4 Der TcR $\gamma$ bei verschiedenen Spezies**

### **2. 3. 4. 1 Allgemeines**

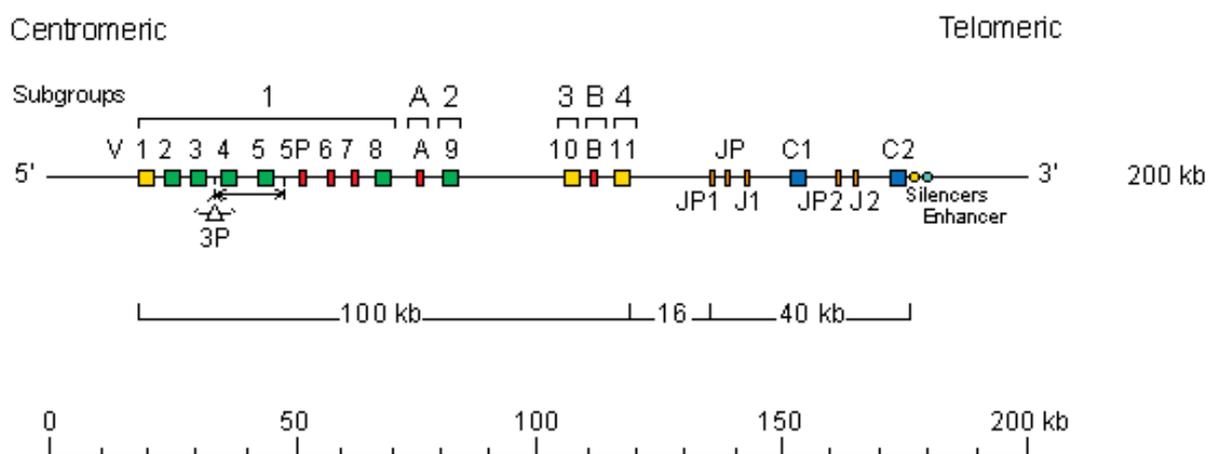
T-Zell-Rezeptoren und ähnliche Moleküle konnten bereits bei kiefermäuligen Wirbeltieren nachgewiesen werden. Homologiewerte liegen beim Vergleich der Sequenzen von sehr primitiven mit höheren Wirbeltieren um die 50 % (RAST und LITMAN, 1994). Allerdings sind die Inter- und Intraspeziesunterschiede in den V-Genen des TRG im Vergleich zu den anderen Ketten ungewöhnlich deutlich ausgeprägt. Bei einem Vergleich konnten größere Ähnlichkeiten nur zwischen humanem TRGV1 und murinem TRGV7 gefunden werden (CLARK et al., 1995). TRGV5 und TRGV6 der Maus weisen z. B. nur 30 % Homologie auf. Ähnlich ist die Situation beim Menschen, wo die Mitglieder verschiedener Familien sich stark unterscheiden (ARDEN et al., 1995a, b).

Bei den TR-Loci kommen, wie bei den Ig-Loci häufig, Pseudogene vor. Sie entstehen nach Duplikation funktioneller Abschnitte durch Mutationen, wie z. B. Deletionen oder Insertionen, die entweder die RSS oder das offene Leseraster (ORF) verändern. Hierdurch kann entweder eine V(D)J-Rekombination nicht mehr stattfinden oder es ergeben sich Verschiebungen des Leserasters bei denen auch vorzeitige Stop-Kodons entstehen können (BRENNER et al., 1988; ROTHENFLUH et al., 1995; MIGHELL et al., 2000).

### 2. 3. 4. 2 Der TRG-Locus des Menschen

Der humane TRG-Locus ist auf Chromosom 7p14 – 15 lokalisiert (MURRE et al., 1987). In seinem Genrepertoire gibt es 12 – 15 V-Gene, die zu sechs Untergruppen zusammengefasst werden können, fünf funktionelle J-Gene und zwei Gene, die für die C-Region kodieren. Von den  $V\gamma$ -Genen sind vier bis sechs funktionell. Nur Untergruppe 1 enthält mehrere Mitglieder, nämlich TRGV1 bis 8. Die unterschiedliche Zahl an  $V\gamma$ -Genen ergibt sich, da Allele mit einer Deletion von TRGV4 und 5 existieren und solche, bei denen zwischen TRGV3 und 4 eine Insertion eines TRGV3P existiert (LEFRANC et al., 1986b, 1989, 1991; GeneBank Zugangsnummer: NG\_001336). Zur Einteilung der V-Gene in Untergruppen oder Familien wird traditionell die Grenze bei 75 % Homologie auf Nukleotidebene gesetzt (ARDEN et al., 1995a, b; GIUDICELLI und LEFRANC, 1999).

Wie bei den Immunglobulinen liegt innerhalb der Sequenz des Signalpeptides ein ca. 120 Bp langes Intron (LEFRANC et al. 1986; QUERTERMOUS et al., 1986b). Die  $V\gamma$ -Gene liegen in einer Gruppe oberhalb der  $J\gamma$ - und  $C\gamma$ -Gene. Da sich die  $J\gamma$ - und  $C\gamma$ -Gene abgesehen von der Duplikation oder teilweise Triplikation des Exon 2 der C-Region sehr ähnlich sind, wird davon ausgegangen, dass sie durch eine Duplikation entstanden sind (GLUSMAN et al., 2001).



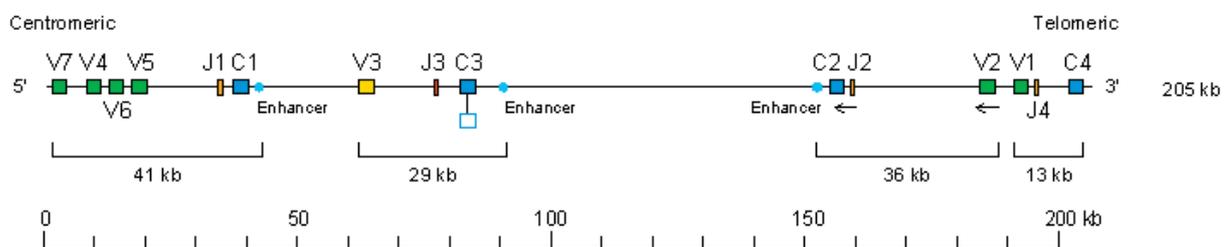
**Abbildung 6:** Darstellung des TRG-Locus des Menschen. Die funktionelle  $V\gamma$ -Gene sind grün dargestellt, die Pseudogene gelb und rot. LEFRANC et al. (1989).

Bei der Rekombination finden alle fünf  $J\gamma$ -Gene Verwendung, beim Spleißen werden sie mit dem jeweils folgenden  $C\gamma$ -Gen verbunden (QUERTERMOUS et al., 1986a; LEFRANC und RABBITS, 1986b, 1991). Die RSS entsprechen weitgehend der Konsens-

Sequenz, die Abweichungen kommen seltener vor als die Basen der Konsens-Sequenz. Die 23RSS liegen 3' der  $V\gamma$ -Gene und die 12RSS 5' der  $J\gamma$ -Gene (LEFRANC et al., 1986b; QUERTERMOUS et al., 1986b; WU et al., 2006a).

### 2. 3. 4. 3 Der TRG-Locus der Maus

Bei der Maus liegt der TRG-Locus auf Chromosom 13 A2.3 (KRANZ et al., 1985b). Er ist in vier Klustern organisiert mit jeweils einem  $J\gamma$ - und einem  $C\gamma$ -Gen sowie einem  $V\gamma$ -Gen oder mehreren im Fall des Klusters 1. Die Clusterbezeichnung ist jeweils die Nummer des zugehörigen  $C\gamma$ -Genes. Cluster 1 entspricht im Aufbau dem humanen TRG-Locus. Cluster 2 ist im Vergleich zu den anderen umgekehrt orientiert. Insgesamt sind sieben  $V\gamma$ -Gene, die zu fünf Untergruppen gehören, enthalten, vier  $J\gamma$ -Gene und vier  $C\gamma$ -Gene, wobei TRGC3 ein Pseudogen ist. Rekombinationen erfolgen zwischen den  $V\gamma$ -Genen und dem jeweils folgenden  $J\gamma$ -Gen. Beim Spleißen wird die Verbindung zum jeweils folgenden  $C\gamma$ -Gen durchgeführt. Die  $C\gamma$ -Gene bestehen aus drei Exons, außer TRGC4, bei dem wie beim menschlichen TRGC2 vier Exons existieren. Das dritte Exon ist allerdings nicht zum zweiten homolog (VERNOOIJ et al., 1993; GeneBank Zugangsnummern: Cluster 1 und 3: AF037352, Cluster 2 und 4: AF021335). Dennoch wird das dritte Exon in Anlehnung an die Situation beim Menschen als Exon 2B und das vierte als Exon 3 bezeichnet. Dies gilt auch für die weiteren Tierarten mit mehr als drei Exons. Wie beim Menschen entsprechen die RSS weitgehend der Konsens-Sequenz, ihre Anordnung entspricht der beim Menschen beschriebenen (HAYDAY et al., 1985).



**Abbildung 7:** Darstellung des TRG-Locus der Maus. Die funktionellen  $V\gamma$ -Gene sind grün dargestellt, die Pseudogene gelb und rot. LEFRANC und GINESTOUX, (2006), nach VERNOOIJ et al., (1993).

Bei der Maus existieren in den verschiedenen Organen feste  $\gamma\delta$ -T-Zell-Populationen mit bestimmten Rezeptortypen. So tragen die meisten  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Milz, im

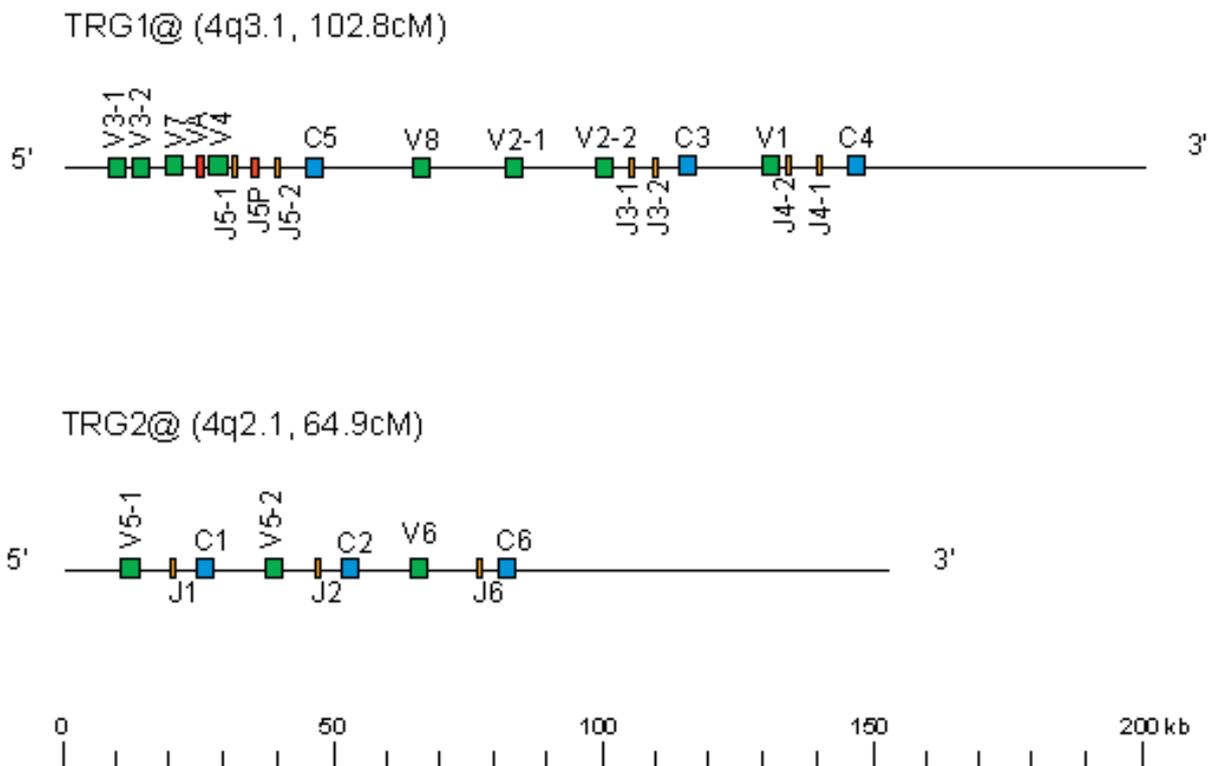
Blut und in den Lymphknoten  $V\gamma 1$  und  $V\gamma 4$ , die im Darmepithel  $V\gamma 7$ , im Epithel der Reproduktionsorgane  $V\gamma 6$ , in der Haut  $V\gamma 5$  und in der Lunge  $V\gamma 4$  und  $V\gamma 6$  (ITO HARA et al., 1989, 1990; ASARNOW et al., 1989; HAYDAY, 2000; GIRARDI, 2006). Die funktionale Diversität ist hierbei sehr unterschiedlich. In epidermalen und uterinen T-Zellen ist sie sehr gering, so dass annähernd identische CDR3 vorliegen, und in intestinalen sehr hoch (ASARNOW et al., 1989; HAYDAY, 2000). Die Populationen mit geringer Diversität entstehen bevor in der Fetalentwicklung im Thymus die TdT exprimiert wird (HAYDAY, 2000).

#### **2. 3. 4. 4 Der TRG-Locus bei Schaf und Rind**

Schaf und Rind gehören zu den Spezies mit einem hohen Anteil an zirkulierenden  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut (HEIN und MACKAY, 1991). Beim Schaf existieren zwei TRG-Loci, TRG1@ und TRG2@, mit jeweils drei Klustern auf Chromosom 4q 3.1 bzw. 4q2.1, wobei „@“ ausdrückt, dass ein vollständiger Gen-Locus gemeint ist. Die Kluster in TRG2@ enthalten jeweils nur eine Variante von V, J und C. In Kluster vier existieren zwei J-Varianten, im Kluster 3 zwei J- und drei V-Varianten. Im Kluster 5 sind es fünf V-Varianten, von denen eine ein Pseudogen ist, und drei J-Varianten.

In den Klustern des Schafes erfolgen die Rekombinationen, wie bei der Maus, jeweils zwischen aufeinander folgenden V- und J-Genen, so dass selten Rekombinationen zwischen verschiedenen Klustern auftreten. Der TRG2@ scheint nur bei Wiederkäuern aufzutreten, der TRG1@ ist homolog zum TRG-Locus des Menschen. Die Sequenzen für das Signalpeptid sind 54 Bp lang, das Intron innerhalb dieser Sequenz misst 79 - 136 Bp. Die typischen Sequenzen am Beginn des FR2 und Ende von FR3 sind wie bei der Maus vorhanden (MICCOLI et al., 2003; VACCARELLI et al., 2005) (Zugangsnummern: TRG1@: DQ992075; TRG2@: DQ992074).

Eine Besonderheit beim Schaf ist die unterschiedliche Anzahl der Exons in den verschiedenen C-Genen: bei TRGC1 und -C5 sind es drei, bei TRGC3 sind es vier und bei TRGC2, -C4 und -C6 sind es fünf (MARTINEZ-JEAN et al., 2006). Die funktionell wichtigen Bereiche, also C-Domäne und der transmembranärer Abschnitt, liegen im ersten bzw. im letzten Exon. Unterschiedlich ist also die Länge des Verbindungsstückes.



**Abbildung 8:** TRG Locus beim Schaf. Die funktionelle  $V\gamma$ -Gene sind grün dargestellt, die Pseudogene gelb und rot. WU et al., (2006b), nach MICCOLI et al., (2003) und VACARELLI et al., (2005).

Beim Rind existieren 17  $V\gamma$ -Gene, acht  $J\gamma$ - und sechs  $C\gamma$ -Gene, die ebenfalls in zwei unterschiedlichen Loci mit jeweils drei Klustern gegliedert sind. Eine Besonderheit sind zwei vermutlich rekombinierte und in die DNS reintegrierte VJ-Gene im TRG2@-Locus. Homologe V-Gene von Rind und Schaf sind auf Nukleotidebene zu 90 – 94 % identisch und homologe C-Gene zu 88 – 96 %. Homologiewerte zwischen verschiedenen Untergruppen reichen beim Rind von 34 – 75 %. Die Struktur ist der beim Schaf sehr ähnlich und Rekombinationen erfolgen hauptsächlich innerhalb der jeweiligen Kluster.

Inwieweit die verschiedenen C-Regionen unterschiedliche Funktionen erfüllen, ist noch nicht untersucht. Eine Hypothese ist jedoch, dass ähnlich wie bei den V-Regionen zu unterschiedlichen Zeiten der Embryonalentwicklung unterschiedliche  $\gamma\delta$ -T-Zell-Populationen mit unterschiedlicher Funktion und festem Rezeptor-Repertoire entstehen (HERZIG et al., 2006; CONRAD et al. 2007; GeneBank Zugangsnummern: TRG1@: AY644517; TRG2@: AY644518).

### **2. 3. 4. 5 Der TRG-Locus des Hundes**

Der TRG-Locus des Hundes konnte auf Chromosom 18 lokalisiert werden. Bisher sind vier funktionelle  $V\gamma$ -Varianten, sechs funktionelle  $J\gamma$ -Varianten und vier funktionelle  $C\gamma$ -Varianten beschrieben worden. Dies erfolgte durch Klonierung und Sequenzierung von cDNS und Vergleich mit der genomischen Sequenz des Chromosoms 18.

Alle bisher beschriebenen Gene sind in einem Locus mit vier Klustern organisiert. Im Gegensatz zu dem, was für Schaf und Rind berichtet wird, scheinen hier Kombinationen von Genen aus verschiedenen Klustern häufig zu sein. Besonders häufig nachgewiesen wurden Kombinationen von  $V\gamma 1$  mit  $J\gamma 3$  und  $J\gamma 4$  (YAGIHARA et al. 2007; Zugangsnummer bei GeneBank: NW\_876265). Außerdem sind beim Hund mehrere cDNS Sequenzen veröffentlicht (AF079118 – AF079123; AB117149 – AB117162).

### **2. 3. 4. 6 TcR $\gamma$ bei der Katze**

Bei der Katze wird der TRG-Locus auf Chromosom A2 vermutet (CHO et al., 1998). Bisher sind bei der Katze 3 Gruppen von  $V\gamma$ -Genen beschrieben, wobei die Grenze bei 80 % Homologie auf Nukleotidebene gewählt wurde. In der Untergruppe 1 wurden zwölf verschiedene Mitglieder gefunden, die sich nur um eine oder wenige Aminosäuren unterschieden. In Untergruppe 3 fanden sich nur Unterschiede im Signalpeptid. Darüber hinaus fand man sechs verschiedene J-Region-Gene, die sich jeweils in einer Aminosäure unterscheiden. Die Isolierung der mRNA erfolgte aus Darmepithel und Milz, wobei im Darmepithel nur Mitglieder der Untergruppe 1 nachgewiesen wurden (MOORE et al., 2005). Obwohl die Sequenzierung über eine cDNS-Sequenzierung erfolgte, wurde in der Veröffentlichung nur die abgeleitete Proteinsequenz angegeben und ein Zugänglich-Machen der Nukleotidsequenzen über GeneBank unterblieb.

## **2.4 In vitro-Rekombination**

Bei der Amplifikation von genomischer DNS mit dem Klenow-Fragment oder der *Taq*-Polymerase wurde früh festgestellt, dass artifizielle Rekombinationen zwischen den homologen Allelen auftreten können (SAIKI et al., 1988). Die Ursache wird in einem unvollständigen Abschreiben der Sequenz durch die Polymerase während

eines Amplifikationszyklus gesehen. Im nächsten Zyklus können sich unvollständige DNS-Einzelstränge in homologen Bereichen aneinanderlagern. Eine weitere Möglichkeit ist, dass sich ein unvollständiger Strang an einen vollständigen anlagert und er anhand dessen Sequenz ergänzt wird. Auf diese Weise können Sequenzen neu kombiniert werden, wenn die Stränge homologe und unterschiedliche Abschnitte enthalten und mit den gleichen Primern amplifizierbar sind. Im folgenden Zyklus wird zu diesem neu kombinierten Strang der komplementäre geschrieben und in den weiteren werden sie entsprechend amplifiziert (SAIKI et al., 1988, JUDO et al., 1998; YU et al., 2006).

Diese Vorgänge können besonders dann auftreten, wenn die Amplifikationszeit zu kurz gewählt wird und wenn Multigenfamilien, deren Mitglieder homologe Abschnitte aufweisen, oder repetitive Sequenzen untersucht werden (MEYERHANS et al., 1990, JUDO et al., 1998). Die Anzahl an rekombinanten Molekülen nach einer normalen PCR wird mit 1 - 7 % angegeben (MEYERHANS et al., 1990; JUDO et al., 1998). Unter gewissen Bedingungen kann sie jedoch zwischen 40 und 50 % erreichen, was zur Untersuchung von in vitro-Evolution genutzt wird (BRADLEY und HILLIS 1997; JUDO et al., 1998). Eine Verlängerung der Elongationszeit reduziert den Anteil an rekombinanten Molekülen (JUDO et al., 1998; YU et al., 2006). Bei einer Untersuchung der Amplifikation von mRNA des DQA MHC-Locus einer Robbenart unter Standardbedingungen wurden 26,4 % rekombinierte Moleküle festgestellt (YU et al., 2006), den deutlichsten Einfluss auf die Zahl an rekombinanten Molekülen hatte in dieser Untersuchung die Templatelänge. Insgesamt kommt in vitro-Rekombination bei der Amplifikation von mRNA relativ häufig vor und muss bei der Beurteilung von cDNS-Sequenzen bedacht werden.

## **2. 5 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist die molekularbiologische Charakterisierung des TRG bei der Katze, um Voraussetzungen zu schaffen, die es erlauben, eine PCR-gestützte Diagnostik von Lymphomen durchzuführen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Biologisches Material

Ausgangsmaterial für die Gewinnung von mRNA des feline TRG waren Milz, Thymus und Blut verschiedener Sektionstiere und Blut einer Blutspendekatte der Klinik für Kleintiere, Abteilung Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Kriterium für die Benutzung von Gewebe der Sektionskatzen war deren Frischezustand. Es wurde nur Gewebe von Tieren verwendet, die bei Probennahme vor maximal 30 Minuten verstorben waren. Bei der Probennahme wurden die ca. 1 × 1 × 0,3 cm großen Gewebeprobe sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

**Tabelle 1:** Daten der untersuchten Tiere

Tagebuchnummer	Rasse	Geschlecht	Alter	FeLV-Status	Erkrankung
940/02	EKH	mk	8 Jahre	pos.	T-Zell-Lymphom
1234/02	EKH	w	18 Jahre	pos.	Teils solides teils tubuläres Mammakarzinom
315/03	k. A.	m	adult	neg.	Hypertrophe Kardiomyopathie
902/03	EKH	m	1 Jahr	neg.	Stumpfes Trauma
1658/03	Main Coon	m	10 Jahre	neg.	Bronchoalveoläres Karzinom, FIV pos.
897/04	EKH	m	12 Wochen	neg.	Fraktur des dritten Brustwirbels
1448/04	EKH	w	1,5 Jahre	pos.	Lymphosarkom
1675/04	EKH	wk	7 Jahre	neg.	Chromophobes Hypophysenadenom
Kontroll-Blut	Abessinier	wk	adult	k. A.	Blutspendekatte

EKH = Europäische Kurzhaarkatze; w = weiblich; m = männlich; k = kastriert; pos. = positiv getestet durch Immunhistologie; neg. = negativ getestet durch WITNESS FeLV (selectavet, Weyarn). Die Nummern der Tiere entsprechen den Sektionstagebuchnummern des Institutes für Veterinär-Pathologie Gießen.

#### 3.2 Extraktion von Nukleinsäuren

##### 3.2.1 Extraktion von genomischer DNS

Die Isolierung genomischer DNS aus Gewebe oder Blut erfolgte mit dem Puregene® DNS Isolierungs-Kit (Biozym, Oldendorf). Das Prinzip dieses Kits beruht auf der

Lyse der Zellen mit anionischen Detergenzien und einer Salzpräzipitation der Proteine. Aus dem gereinigten Lysat wird die DNS mit Alkohol gefällt, gewaschen und in sterilem TE-Puffer aufgenommen.

Das gefrorene Gewebe wurde auf dem Kryomikrotom Frigucut 2.700 (Reichert-Jung, Nußloch) ca. 10 – 15 µm dick geschnitten, abgewogen und noch gefroren weiter bearbeitet.

1. **Zellyse:** Zu ca. 10 mg Gewebe werden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß 300 µl Zell-Lyse-Lösung gegeben. Zum gründlichen Homogenisieren das Gemisch mehrmals mit einer 1 ml Spritze mit aufgesetzter Kanüle ansaugen und ausspritzen. Danach 1,5 µl Proteinase K Lösung (20mg/ml) zugeben und zum Mischen das Gefäß 25× umdrehen. Bei 55 °C wird im Wasserbad für 3 Stunden inkubiert und zwischendurch durch Wenden des Gefäßes gemischt.
2. **RNase-Behandlung:** 1,5 µl RNase A Lösung (4 mg/ml) zugeben, mischen durch 25× Wenden und bei 37 °C 15 – 60 Minuten inkubieren.
3. **Protein-Fällung:** Aus dem Wasserbad nehmen, abkühlen auf Raumtemperatur und 100 µl Protein-Präzipitations-Lösung zugeben. Für 20 Sekunden heftig vortexen und bei 14.000 g für 3 Minuten zentrifugieren.  
**Cave:** Ist kein Pellet sichtbar muss das Vortexen wiederholt werden, danach 5 Minuten auf Eis inkubieren und erneut zentrifugieren.
4. **DNS-Fällung:** Den Überstand in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 300 µl 100 % Isopropanol geben. Zum Mischen das Gefäß vorsichtig 50× wenden. Danach wird die DNS durch Zentrifugieren bei 14.000 g für 1 Minute am Gefäßboden gesammelt.
5. **DNS-Waschen und Trocknen:** Überstand dekantieren und zum Waschen 300 µl 70 %iges Ethanol zugeben. Vorsichtig mischen und bei 14.000 g für 1 Minute zentrifugieren. Der Alkohol wird vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und das Pellet bei offenem Deckel für 10 – 15 Minuten luftgetrocknet.
6. **Rehydrieren der DNS:** Zum Lösen der DNS 50 µl DNS-Hydratationslösung zugeben und die DNS über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren. Alternativ kann eine Inkubation bei 65 °C für 1 Stunde erfolgen.

Die gewonnene DNS wird bei 4 °C im Kühlschrank oder bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

### 3. 2. 2 Extraktion von gesamt-RNS

Zur Extraktion von gesamt-RNS aus gefrorenem Gewebe wurde das Purescript® RNS Isolierungs-Kit (Biozym, Oldendorf) verwendet. Auch hier werden die Zellen durch anionische Detergenzien lysiert. Allerdings ist zusätzlich ein Stoff zur Einschränkung der RNaseaktivität enthalten. Danach werden Proteine und genomische DNS durch Salzpräzipitation entfernt und die RNS durch Alkohol gefällt, gewaschen und in steriles, RNase-freies Wasser aufgenommen. Genomische DNS wird hierbei je nach Gewebe zu 90 - 99,9 % entfernt.

1. **Zellyse:** Zu ca. 10 mg Gewebe werden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis 300 µl Zell-Lyse-Lösung geben. Zum gründlichen Homogenisieren das Gemisch mehrmals mit einer 1 ml Spritze mit aufgesetzter Kanüle ansaugen und ausspritzen.
2. **Protein- und DNS-Fällung:** Danach 100 µl Protein-DNS-Präzipitations-Lösung zufügen und zum Mischen das Gefäß 10× wenden. Für 5 Minuten auf Eis inkubieren und danach bei 14.000 g für 3 Minuten zentrifugieren. Entsteht kein festes Pellet muss dieser Vorgang wiederholt werden.
3. **RNS-Fällung:** Den Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen mit 300 µl 100 %igem Isopropanol gießen und zum Mischen 50× wenden. Dann bei 14.000 g für 3 Minuten zentrifugieren.
4. **RNS-Waschen:** Den Überstand abgießen, das Röhrchen leer laufen lassen und zum Waschen 300 µl 70 %iges Ethanol zugeben und mischen. Bei 14.000 g für 1 Minute zentrifugieren.
5. **Trockenen und Rehydrieren der RNS:** Den Alkohol vorsichtig mit der Pipette abziehen und das Pellet bei offenem Deckel für 10 - 15 Minuten lufttrocknen. Zum Lösen der RNS 50 µl RNS Hydratations-Lösung zugeben und auf Eis 30 Minuten rehydrieren lassen. Für 5 Sekunden vortexen und bei -70 °C bis zur Verwendung aufbewahren.

Zur Extraktion von gesamt-RNS aus 300 µl frischem Vollblut wurde vor Schritt 1 des obigen Protokolls folgendes durchgeführt: zu dem Blut in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß 900 µl RBC-Lysis-Lösung geben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Danach 20 Sekunden bei 14.000g zentrifugieren, den Überstand absaugen und das Pellet sowie 10 - 20 µl Flüssigkeit zurücklassen. Zum Resuspendieren vortexen und dann mit der Zellyse weiter verfahren.

### **3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration der extrahierten Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei 260 nm und einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht eine Extinktion von 1 ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml bei DNS beziehungsweise 40 µg/ml für RNS. Die optische Dichte der Nukleinsäurelösung ist abhängig von ihrem Guanin/Cytosin-Gehalt (GC). Bei einem 30 %igem GC-Gehalt entspricht die optische Dichte einer Lösung doppelsträngiger DNS mit einer Konzentration von 50 µg/ml 0,94 und bei einem 72 %igem GC-Anteil beträgt die optische Dichte 1,04. Zum Abschätzen des Reinheitsgrades der Nukleinsäuren wird das Verhältnis der bei 260 und 280 nm gemessenen Extinktionen bestimmt. Es soll annähernd bei 1,8 für DNS und 2,0 für RNS liegen (MÜLHARDT, 2002a).

### **3.4 Oligonukleotide für molekularbiologische Arbeiten**

Alle Primer und nach Möglichkeit die Primerpaare wurden mit dem Programm „GeneFisher 1.3“ (GEIGERICH et al., 1996) ausgesucht und getestet. Die dabei zu beachtenden Kriterien waren folgende (MÜLHARDT, 2002b):

- Die Primer für Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) sollten ca. 25 - 30 Basen lang sein;
- es sollten nicht mehr als vier gleiche Basen aufeinander folgen;
- der GC-Anteil sollte zwischen 40 und 60 % liegen;
- die mittlere Schmelztemperatur wird nach der Faustformel:  $2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$  berechnet;
- keine inneren Sekundärstrukturen wie Haarnadelstrukturen;

- die Primer eines Primerpaares dürfen möglichst nicht miteinander hybridisieren, besonders innerhalb der letzten 4 Basen am 3'Ende.

Die ersten Primer wurden anhand der von CHO et al. (1998) veröffentlichten Sequenz der C-Region des fTRG ausgesucht (Zugangsnummern bei GeneBank: D89023). Später dienten die selbst generierten Sequenzen als Grundlage. Hierbei konnten bei den Primern für die verschiedenen Varianten der C-Region aufgrund der teilweise geringen Unterschiede in der Sequenz die oben genannten Kriterien nicht immer eingehalten werden, da kleinste Unterschiede, teilweise nur eine Base am 3'Ende, genutzt werden mussten um einzelne Varianten amplifizieren zu können. Die Primersynthesen erfolgten durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg). Eine Liste der verwendeten Primer findet sich in Anhang 9.1.1. Einen Primer, FTGR4, wurde der Literatur (CHO et al., 1998) entnommen.

Die Primer für die Sequenz des Signalpeptids FTGLf1 und FTGLf2 wurden entwickelt indem das Trace-Archiv (NCBI, Bethesda, USA) mit den längsten durch SMART<sup>TM</sup> RACE generierten Sequenzen durchsucht und in den dadurch gefunden Sequenzen das Start-Kodon identifiziert wurde. In diesem Bereich erfolgte dann das Aussuchen der Primer.

Die Sequenzen für die Exons 1 zweier Varianten der C-Region, fTRGC5 und fTRGC6 konnten durch eine Suche mit fTRGC1 aus dem Trace-Archiv (NCBI, Bethesda, USA) entnommen werden. Auch die Sequenzen für die Primer im 3' nicht translatierten Bereich (3'UTR) wurden durch eine Suche im Trace-Archiv (NCBI, Bethesda, USA) gefunden. In diesem Fall erfolgte die Suche mit den bis dahin komplett sequenzierten Varianten der C-Region, fTRGC1 und fTRGC2, um die 3'UTR der übrigen Varianten zu finden. Die Primer wurden so gewählt, dass sie auf die beiden genannten Sequenzen möglichst schlecht passen.

## 3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

### 3.5.1 DNS-PCR

#### 3.5.1.1 Testen der verwendeten Oligonukleotide

Das Testen der Primer für die Reverse Transkriptase-PCR und das Überprüfen erzeugter Klone erfolgte mit der BioTherm™ DNS-Polymerase (NatuTec, Frankfurt). Die Zusammensetzung des PCR-Mastermixes ist in Tabelle 2 dargestellt.

Für Versuche, bei denen eine größere Menge an Produkt, z. B. für Klonierungen, benötigt wurde, wurden die in Tabelle 2 angegebenen Mengen verdreifacht. Alle PCR-Versuche wurden auf einem Thermocycler des Typs Multicycler PTC 200 (Biozym, Oldendorf) durchgeführt.

**Tabelle 2:** Zusammensetzung des PCR-Mastermix für die BioTherm™ DNS-Polymerase

Reagenz	Konzentration	Volumen (µl)	Endkonzentration
DEPC-Wasser		10,5	
PCR-Puffer (incl. 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	10 ×	1,5	
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,3	2,0 mM (insges.)
dNTP	10 mM jew.	0,6	0,4 mM jeweils
Primer 1	10 µM	0,5	0,3 µM
Primer 2	10 µM	0,5	0,3 µM
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,12	0,6 U/Ansatz
DNS	50 ng/µl	1,0	
Gesamtvolumen		15,02	

Die einzelnen Schritte und Reaktionsbedingungen für die PCR mit Taq-Polymerase sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die primerspezifischen Bedingungen für Anlagerungstemperatur und Elongationszeit richten sich nach den Primereigenschaften und sind in 9.1.2 aufgeführt.

**Tabelle 3:** Reaktionsbedingungen für die PCR

Schritt	BioTherm™ DNS-Polymerase		Anzahl der Wiederholungen
	Zeit	Temperatur	
Denaturierung	2,5 Minuten	94 °C	1
Schmelzen	15 Sekunden	92 °C	35
Anlagern	10 Sekunden	Je nach Primer	
Elongieren	Je nach Primer	72 °C	
Abschließende Elongation	5 Minuten	72 °C	1
Kühlen	4 °C bis zur Entnahme der Proben aus dem Thermocycler.		

Für die Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur der verwendeten Primerpaare wurde die Gradientenoption des Thermocycler Multicycler PTC 200 Gradient (Biozym, Oldendorf) genutzt. Hierbei können in einem Experiment bis zu 12 unterschiedliche Anlagerungstemperaturen innerhalb eines Temperaturintervalls von maximal 20 °C gleichzeitig getestet werden. Je nach erwarteter Schmelztemperatur des Primerpaares wurden verschiedene Temperaturbereiche getestet (siehe 9.1.2). Die zu erwartende Schmelztemperatur wurde anhand der berechneten Schmelztemperaturen abgeschätzt. Das Testen der Primer für die RACE-PCRs erfolgte bei 58 – 68 oder 60 – 70 °C. Die Temperaturbedingungen für diese Tests werden hier exemplarisch aufgeführt, die Bedingungen für die übrigen Primertests finden sich in Anhang 9.2. Als Template für die Primertests diente, wenn möglich, genomische DNS der Tiere 940/02 und 1234/02. Ansonsten wurden Plasmide mit entsprechenden Inserts oder Erstampfivate von RACE-PCRs verwendet (siehe 9.1.2).

**Tabelle 4:** Temperaturen der Gradienten-PCRs

Temperaturintervall °C	Position auf dem Heizblock											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
58 – 68	58,0	58,3	58,9	59,7	60,9	62,3	64,0	65,4	66,5	67,3	67,8	68,0
60 – 70	60,0	60,3	60,9	61,7	62,9	64,3	66,0	67,5	68,5	69,3	69,8	70,0

### 3.5.1.2 Ergebniskontrolle

Die Ergebniskontrolle erfolgte auf 2,0 %igen und für Amplifikate unter 150 Bp auf 3,0 %igen Agarosegelen unter Zugabe von Ethidiumbromid (0,25 µg/ml, Carl Roth, Karlsruhe). Als Längenstandard wurde pUC19/*MspI* und der selbst entwickelte

Marker MF (siehe Anhang 9.3.2) verwendet. Als Ladepuffer diente eine 15%ige Ficoll® 400-Lösung (Serva, Heidelberg) und je nach Größe des erwarteten Amplifikates als Farbstoff im Ladepuffer Bromphenolblau (Carl Roth, Karlsruhe) oder Xylenzyanol (Carl Roth, Karlsruhe), um ein Überdecken der Banden zu vermeiden. Bromphenolblau wandert in 2 %igen Agarosegelen auf der Höhe von ca. 100 Bp, Xylenzyanol auf der Höhe von ca. 800 Bp.

Für die Elektrophorese wurden 15 µl PCR-Produkt mit 3 µl Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Beurteilung der Fragmentlänge wurde in die erste und z. T. zusätzlich in die letzte Tasche der Längenstandard gegeben. Als Laufpuffer diente ein Tris-Borat-EDTA-Puffer (1 × TBE). Als Spannung für die Elektrophorese wurden 6 V/cm bei einer maximalen Stromstärke von 500 mA (Microcomputer Elektrophoresis Powersupply, Consort, Belgien) für 45 - 60 Minuten angelegt. Das Sichtbarmachen der DNS erfolgte auf einem UV-Transluminator bei 254 nm und die fotografische Dokumentation wurde mit Kodak 1.0 "Digital Imaging" (Estman Kodak Inc., USA) durchgeführt.

### 3. 5. 2 PCR mit Phusion™ High-Fidelity DNS-Polymerase

Um bestmögliche Sequenzen generieren zu können, erfolgte der Einsatz der neu entwickelten Phusion™ High-Fidelity DNS-Polymerase (BioCat, Heidelberg). Diese hat nach Angaben des Herstellers eine fünfzigfach geringere Fehlerrate als *Taq*-Polymerase und eine sechsfach niedrigere als die *Pfu*-Polymerase. Sie weist dabei eine doppelt so hohe Prozessivität auf wie die *Taq*-Polymerase. Darüber hinaus hat sie eine bessere Thermostabilität, so dass die Denaturierungsschritte bei 98 °C erfolgen können. Hierdurch wird ein Fehl-Anlagern der Primer reduziert. Allerdings produziert sie wie, alle Polymerasen mit Fehlerkorrektur-Aktivität, so genannte glatte Enden ohne Adenin-Überhänge bei den DNS-Produkten.

**Tabelle 5:** Zusammensetzung des Mastermix für die Phusion™ DNS-Polymerase

Reagenz	Konzentration	Volumen (µl)	Endkonzentration
DEPC-Wasser		31,5	
PCR-Puffer (incl. 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 ×	10,0	1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP	10 mM jew.	1,0	0,2 mM jeweils
Primer 1	10 µM	1,0	0,2 µM
Primer 2	10 µM	1,0	0,2 µM
Phusion™	2 U/µl	0,5	1,0 U/Ansatz
cDNS		5,0	
<b>Gesamtvolumen</b>		50,0	

Aufgrund der besonderen Eigenschaften der Phusion™ DNS-Polymerase wurden die Reaktionsbedingungen angepaßt. Die initiale Denaturierung der DNS erfolgte für 30 Sekunden bei 98 °C, das Schmelzen in den jeweiligen Zyklen für 5 s bei 98 °C. Bei Touch-Down-Protokollen erfolgte das Schmelzen in den Zyklen während der Temperaturreduktion für 10 Sekunden. Die Primeranlagerung wurde für 30 s durchgeführt, beim CapFishing™ für 10 Sekunden. Die Elongation wurde, wie auch bei der *Taq*-Polymerase üblich, bei 72 °C und mit dem System angepasster Zeit durchgeführt. Die Schlußelongation lief bei 72 °C für 5 Minuten, danach folgte das Kühlen bei 4 °C bis zur Entnahme der Proben aus dem Thermocycler.

**Tabelle 6:** Reaktionsbedingungen für die Phusion™ High-Fidelity DNS-Polymerase

Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl der Wiederholungen
<b>Denaturierung</b>	30 Sekunden	98 °C	1
<b>Schmelzen</b>	5/10 Sekunden	98 °C	Je nach System.
<b>Anlagern</b>	10/30 Sekunden	Je nach Primer	
<b>Elongieren</b>	Je nach Primer	72 °C	
<b>Schlusselongation</b>	5 Minuten	72 °C	1
<b>Kühlen</b>	∞	4 °C	1

### 3. 5. 3 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde als „two step“ RT-PCR durchgeführt. Zunächst wurde die RNS in komplementäre DNS (cDNS) übersetzt und in einem weiteren Ansatz amplifiziert. Die Amplifikationsbedingungen entsprechen hierbei den oben beschriebenen. Die Übersetzung in cDNS erfolgte mit der Reversen Transkriptase des Avian

Myeloblastosis Virus (AMV-RT) (peQLab, Erlangen). Als Primer dienen je nach Versuch verschiedene genspezifische Rückwärtsprimer oder Zufallsprimer (N<sub>6</sub>).

Die Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut, gemischt und anzentrifugiert. Das Anzentrifugieren erfolgte in einer Tischzentrifuge für ca. 5 Sekunden. Danach wurden folgende Reagenzien auf Eis in ein PCR-Tube gegeben:

**Tabelle 7:** Erster Mastermix für reverse Transkription

Reagenz	Bemerkung	Menge (µl)
RNS	2 – 4 µg	bis 10,5
cDNS-SynthesePrimer	10 µM	2
DEPC-Wasser	ad 12,5	

Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Danach erfolgte auf Eis die Zugabe folgender Reagenzien:

**Tabelle 8:** Zweiter Mastermix für reverse Transkription

Reagenz	Bemerkung	Menge (µl)
Reaktionspuffer	5 ×	4
dNTPs	10 mM	2,5
AMV-RT	25 U/µl	1

Die Gefäße wurden gevortext und anzentrifugiert. Dann erfolgte die Inkubation für 60 Minuten bei 55 °C und zum Deaktivieren des Enzyms für 10 Minuten bei 65 °C. Die Ansätze wurden entweder sofort durch Amplifikation weiterverarbeitet oder bei – 20 °C maximal 3 Monate gelagert.

### **3. 5. 4 Amplifikation nur teilweise bekannter Sequenzen – Rapid Amplifikation of cDNA Ends (RACE)**

#### **3. 5. 4. 1 Klassische 5'-RACE**

Um nur teilweise bekannte Sequenzen auf cDNS-Ebene amplifizieren zu können, wird die Methode der RACE eingesetzt. Man entwirft hierzu Primer im bekannten Abschnitt und nutzt im Falle der 3'-RACE den Poly-Adenin-Schwanz (Poly-A-Schwanz) der meisten mRNS als Anlagerungspunkt für den Rückwärtsprimer, die hier auch als Ankerprimer bezeichnet werden. Für die 5'-RACE muss man in die

cDNS erst eine bekannte Struktur einbauen, um sie durch eine PCR amplifizieren zu können. Bei der klassischen RACE erfolgt dies, in dem nach der cDNS-Synthese mit Hilfe der Terminalen Desoxynukleotidyltransferase (TdT) am 5'-Ende ein Poly-A- oder Poly-Cytosin-Schwanz (Poly-C-Schwanz) angehängt wird, der dann als Anlagerungspunkt für den Ankerprimer fungiert, der hier als Vorwärtsprimer agiert. Damit ein reiner Poly-A- oder Poly-C-Schwanz gebildet werden kann, müssen vor der Inkubation mit TdT die übrigen Nukleotidtriphosphate aus der cDNS-Synthese entfernt werden (FROHMANN, 1994). Für die klassische RACE wurde hier das 5'/3' RACE Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. In diesem Kit ist als reverse Transkriptase die AMV enthalten, die eine reverse Transkription bei 55 °C erlaubt. Das ist vorteilhaft bei der Bearbeitung von mRNA mit stärkeren Sekundärstrukturen. Als Primer in der cDNS-Synthese für die 5'-RACE diente bei diesem Kit ein genspezifischer Rückwärtsprimer. Die Amplifikation der cDNS erfolgte mit in 5'-Richtung des ersten Primers liegenden genspezifischen Primern und dem Oligo-dT-Ankerprimer als „seminested PCR“. Um eine ausreichende Spezifität der Produkte zu gewährleisten, wird eine zweifache Amplifikation mit verschiedenen Primern empfohlen. Zur Kontrolle der Reaktionen werden im Kit eine mRNA und spezifische Primer mitgeliefert.

#### 3. 5. 4. 1. 1 cDNS Synthese

Die Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut, gemischt und anzentrifugiert. Danach wurden folgende Reagenzien in ein PCR-Tube gegeben:

**Tabelle 9:** Mastermix für die reverse Transkription

Reagenz	Konzentration	Probe (µl)	Kontrolle (µL)
cDNS-SynthesePuffer	5 ×	4	4
dNTPs	10 mM	2	2
cDNS-SynthesePrimer	12,5 µM	1	1
mRNS	0,2 - 2 µg		1
AMV-RT	20 U/µl	1	1
DEPC-Wasser	ad 20 µl		11
<b>Gesamtmenge</b>		20	20

Die Probengefäße wurden gevortext und anzentrifugiert. Danach erfolgte die Inkubation für 60 Minuten bei 55 °C und abschließend für 10 Minuten bei 65 °C.

### 3. 5. 4. 1. 2 Aufreinigung der cDNS

Um das als „Tailing“ bezeichnete Anhängen des Poly-A-Schwanzes durchführen zu können, wird die synthetisierte cDNS mit dem High Pure PCR Produkt Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) gereinigt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer selektiven Bindung von DNS an spezielle Glasfasern im High Pure Filtergefäß in Anwesenheit von Guanidiniumthiocyanat. Die gebundene DNS wird in zwei Schritten gewaschen, um kontaminierende Nukleotide und Salze zu entfernen und mit einer Lösung geringer Salzkonzentration eluiert.

Bei der ersten Verwendung des Kits müssen 40 ml 99 %iges Ethanol zum Waschpuffer gegeben werden.

1. **DNS Binden:** 100 µl Bindepuffer werden zu 20 µl Erststrang-cDNS gegeben, danach wird gevortext. Diese Mischung wird in das Filtergefäß auf einem Sammelgefäß pipettieren und 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit (ca. 13.000 g) zentrifugiert. Den Durchfluss verwerfen.
2. **DNS Waschen:** 500 µl Waschpuffer aufpipettieren und 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren. Den Durchfluss auch hier verwerfen. Diesen Vorgang mit 200 µl Waschpuffer wiederholen und das Sammelgefäß verwerfen.
3. **DNS Lösen:** Filtergefäß in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß stellen, 50 µl Elutionspuffer aufpipettieren und 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren.

Die gelöste Erststrang-cDNS wird im nächsten Schritt weiterverwendet.

### 3. 5. 4. 1. 3 Tailing der cDNS

In diesem Schritt wird mit Hilfe der TdT der Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der produzierte cDNS angehängt. Folgende Reagenzien wurden auf Eis in ein Reaktionsgefäß geben:

**Tabelle 10:** Zusammensetzung des Ansatzes für die cDNS-Tailing-Reaktion

Reagenz	Konzentration	Probe (µl)	Kontrolle ( µl)
gereinigte cDNS		19	19
Reaktionspuffer	10 ×	2,5	2,5
dATP	2 mM	2,5	2,5

Die Gefäße wurden gevortext und anzenrifugiert. 3 Minuten bei 94 °C inkubiert und auf Eis gestellt. Dann wurde 1 µl TdT zugegeben (10 U/µl), gemischt und bei 37 °C für 25 Minuten inkubiert. Zum Inaktivieren des Enzyms folgte eine Inkubation von 10 Minuten bei 70 °C. Nach dem Anzenrifugieren wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt oder bei - 20 °C eingefroren.

#### 3. 5. 4. 1. 4 Amplifikation der cDNS

Die Amplifikation der cDNS erfolgte in der Erstamplifikation mit dem Oligo-dT-Ankerprimer und verschiedenen genspezifischen Primern. Für die Reamplifikation wurden in 5'-Richtung liegende genspezifischen Primer und der PCR-Ankerprimer eingesetzt. Die PCR erfolgte mit verschiedenen Proben, Primersystemen und Polymerasen (siehe 3.8.1).

#### 3. 5. 4. 2 SMART™ RACE

Im SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences, Heidelberg) werden die Vorteile der Marathon™ cDNS Technologie (CHECHNIK et al., 1995) und der SMART Methode (Switching Mechanism At 5' End of RNA Transcript) verbunden. Hierdurch wird die Herstellung qualitativ hochwertiger cDNS aus geringen Mengen Gesamt- oder poly-adeninhaltiger-RNS ermöglicht. Die Besonderheit liegt darin, dass besonders lange cDNS-Moleküle angereichert werden.

Die cDNS-Synthese kann mit speziellen Oligonukleotiden aus dem Kit, Zufallsprimern oder genspezifischen Primern initiiert werden. Bei dieser Methode wird die Reverse Transkriptase des Molony Murine Leukemia Virus (MMLV) verwendet. Erreicht sie das 5'-Ende der mRNS-Matrize entfaltet sie terminale Transferaseaktivität und fügt Cytosin-Reste an die cDNS an. Das SMART II™ Oligonukleotid hybridisiert dann an diese Cytosin-Reste und die Reverse Transkriptase verwendet das Oligonukleotid als Matrize und baut die komplementäre Sequenz in die cDNS ein. Hierdurch wird eine bekannte Sequenz in die cDNS integriert, die dann als Anlagerungspunkt für die Primer bei der Amplifikation dienen kann. Die terminale Transferaseaktivität ist besonders ausgeprägt, wenn das 5'-Ende der mRNS erreicht wird, weshalb vollständige cDNS-Moleküle angereichert werden.

Aufgrund von Erfahrungen anderer Mitarbeiter im Labor wurde das Protokoll des Herstellers in einigen Punkten geändert. So wurde z. B. anstelle der „PowerScript™“ reversen Transkriptase (BD Biosciences, Heidelberg) die „Superscript™ II“ reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet (KREUZER, 2005). Um eine vorzeitige Zerstörung der RNS zu verhindern wurde der RNase-Inhibitor RNAsin® (Promega, Mannheim) bei der cDNS-Synthese zugesetzt.

Da das SMART II™ Oligonukleotid bei der cDNS-Synthese vorhanden ist, besteht die Möglichkeit, dass es selbst an eine RNS bindet und eine cDNS-Synthese initiiert. Da solche Konstrukte das Oligo an beiden Enden integriert haben, würden sie bei der Amplifikation mit vervielfältigt. Um dies zu verhindern, wurde die Step-out PCR entwickelt (MATZ et al., 1999). Hierbei wird ein langes Oligo verwendet, das im 3'-Bereich der Sequenz des SMART II™ Oligo entspricht und im 5'-Bereich 20 Bp zusätzlich enthält. Bindet dieser lange Universalprimer (UPL) an ein Konstrukt mit dem SMART II™ Oligo an beiden Enden, entstehen invertierte Wiederholungen, die sich bei weiteren Zyklen aneinanderlagern und eine weitere Amplifikation verhindern. Der kurze Universalprimer (UPS) wird in 5facher Konzentration im Vergleich zum UPL zugegeben und entspricht dem 5'-Bereich des UPL. UPS und UPL werden zusammen als Universalprimer-Mix (UPM) verwendet. cDNS mit der Sequenz des SMART II™ Oligo an der einen und der genspezifischen Sequenz an der anderen Seite werden nach Inkorporation des Sequenz des UPL durch UPS und den genspezifischen Primer effektiv amplifiziert. Soll eine zweite PCR mit dem gewonnenen Produkt durchgeführt werden, kann diese als nested PCR erfolgen, indem man den nested Universalprimer (UP-nested), der der Sequenz des SMART II™ Oligos entspricht, und einen innen liegenden genspezifischen Primer verwendet. Durch Einsatz der nested PCR kann die Spezifität erheblich verbessert werden.

Die Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut, gemischt und anzentrifugiert. Danach erfolgte die Zugabe folgender Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge in ein PCR-Tube:

**Tabelle 11:** erster Mastermix für die reverse Transkription bei der SMART™ RACE

Reagenz	Bemerkung	Menge (µl)
mRNS	100 ng	1 – 3
cDNS-Synthese-Primer	20 µM	1
Smart II™ A Oligo	10 µM	1
DEPC-Wasser	ad 5,0	

Die Probengefäße wurden gevortext und anzentrifugiert. Danach erfolgte die Inkubation für 2 Minuten bei 70 °C. Dann wurden die Gefäße aus dem Thermocycler genommen und für 2 Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden noch folgende Reagenzien zugegeben:

**Tabelle 12:** zweiter Mastermix für die reverse Transkription bei der SMART™ RACE

Reagenz	Bemerkung	Menge (µl)
Reaktionspuffer	5 ×	2
DTT	0,1 mM	1
RNAsin®	40 U/µl	0,5
dNTPs	10 mM	1
Superscript™ II	200 U/µl	0,5

Die Gefäße wurden gevortext und anzentrifugiert und dann für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Zum Verdünnen wurden 40 µl DEPC-behandeltes Wasser zugegeben und zur Deaktivierung des Enzyms für 7 Minuten bei 72 °C inkubiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt oder eingefroren.

Für die Amplifikation wurden verschiedene genspezifische Primer verwendet. Die RACE-Primer waren das Gemisch aus UPL und UPS für die Erstamplifikation sowie der Primer UP-nested für die Reamplifikationen (siehe: 3.8.2).

### 3. 5. 4. 3 CapFishing™

Das CapFishing™ Full-length cDNA Premix Kit (BioCat, Heidelberg) ermöglicht mit der CapFishing™ Technologie die einfache Erzeugung vollständiger cDNS mit Hilfe des CapFishing™ Adapters und des Oligo-dT-Adapters. Diese Technologie kann für 3'-RACE und 5'-RACE angewendet werden. Wird die cDNS-Synthese mit Zufallsprimern oder einem genspezifischen Primer initiiert kann eine 5'-RACE durchgeführt werden. Bei dieser Methode sind keine zusätzlichen enzymatischen

Behandlungen der RNS oder Adapterligationen notwendig. Als Ausgangsmaterial genügen 1 µg gesamt-RNS oder 50 ng mRNS.

Bei dieser Methode bindet nach der cDNS-Synthese, die nach Angaben des Herstellers mit der „SuperScript™ II“ reversen Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt wurde, ein Adapter-Oligonukleotid an die CAP-Struktur vollständiger mRNS. Dieser Adapter wird von der reversen Transkriptase in einem weiteren Schritt als Matrize verwendet, wodurch die komplementäre Sequenz in die cDNS eingebaut wird und nachher als Anlagerungspunkt für den 5'-RACE-Primer dient. Hierdurch werden nur vollständige cDNS-Moleküle amplifizierbar. Auch beim CapFishing™ wurde eine vorzeitige Degradation der RNS durch den RNase-Inhibitor RNAsin® (Promega, Mannheim) verhindert.

Die Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut, gemischt und anzentrifugiert. Danach gab man folgende Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge in ein PCR-Tube:

**Tabelle 13:** erster Mastermix für die reverse Transkription bei CapFishing™

Reagenz	Bemerkung	Menge (µl)
RNS	1 - 3 µg	1 - 4,5
dNTP	10 mM	4
cDNS-Synthesepimer	10 µM	2
DEPC-Wasser	ad 10,5	

Die Gefäße wurden 3 Minuten bei 75 °C inkubiert und danach für 2 Minuten auf Eis. Danach wurden folgende Reagenzien zugegeben:

**Tabelle 14:** zweiter Mastermix für die reverse Transkription bei CapFishing™

Reagenz	Bemerkung	Menge (µl)
Reaktionspuffer	5 ×	4
DTT	0,1 mM	1
CapFishing™ solution		1
BSA	1mg/ml	2
RNAsin®	40 U/µl	0,5
SuperScript™ II	200 U/µl	1

Die Gefäße wurden gevortext, anzentrifugiert und für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 3 µl des für 3 Minuten bei 75 °C

vorgeheizten und für 2 Minuten auf Eis abgekühlten CapFishing™ Adapter sowie 0,3 µl der SuperScript™ II. Im Anschluss wurde weitere 30 min bei 42 °C zum Integrieren der Adaptersequenz in die cDNS inkubiert. Zur Deaktivierung des Enzyms schloss sich eine Inkubation für 15 min bei 70 °C, sowie abschließend für 5 min bei 94 °C an. Durch Zugabe von 180 µl DEPC-behandelten Wassers erfolgte eine Verdünnung der Erststrang-cDNS im Verhältnis 1 : 10. Danach wurde das Produkt auf Eis oder bei - 20 °C im Gefrierschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Beim CapFishing™ erfolgte der Einsatz eines RACE-spezifischen Primers in Erst- und Reamplifikation. Genspezifischer Primer in der Erstamplifikation war eFTGr3, in der Reamplifikation waren es C-Region-Varianten-spezifische Primer (siehe 3.8.3).

### 3. 5. 3. 4 3'-RACE

Die Durchführung der 3'-RACE erfolgte analog zu den Angaben im 5'/3' RACE Kit (Roche Diagnostics, Mannheim). Die cDNS-Synthese wurde mit dem Oligo-dT-Ankerprimer initiiert, wodurch eine bekannte Anlagerungssequenz für den PCR-Ankerprimer in die cDNS eingebaut wurde. Als Reverse Transkriptase diente die Reverse Transkriptase des Avian Myeloblastosis Virus (AMV-RT, peQLab, Erlangen). Als RNase-Inhibitor wurde RNAsin® (Promega, Mannheim) verwendet.

Die Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut, gemischt und anzentrifugiert. Danach wurden folgende Reagenzien auf Eis in ein PCR-Tube gegeben:

**Tabelle 15:** Erster Mastermix für reverse Transkription

Reagenz	Bemerkung	Menge (µl)
RNS	2 - 4 µg	bis 9,5
Oligo-dT-Ankerprimer	12,5 µM	2
DEPC-Wasser	Ad 11,5	

Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe folgender Reagenzien auf Eis:

**Tabelle 16:** Zweiter Mastermix für reverse Transkription.

Reagenz	Bemerkung	Menge ( $\mu$ l)
Reaktionspuffer	5 ×	4
dNTPs	10 mM	2,5
RNA <sup>sin</sup> <sup>®</sup>	40 U/ $\mu$ l	1
AMV-RT	25 U/ $\mu$ l	1

Die Gefäße wurden gevortext und anzentrifugiert. Dann erfolgte die Inkubation für 60 Minuten bei 55 °C und zum Deaktivieren des Enzyms für 10 Minuten bei 65 °C. Die Ansätze wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei - 20 °C maximal 3 Monate gelagert.

Die Erstamplifikation erfolgte zunächst mit einem Homologie-Primer und dem PCR-Ankerprimer (siehe auch 3.5.4.1), die Reamplifikation mit Varianten-spezifischen Primern (Siehe 3.8.4).

### 3. 5. 4 Ergebniskontrolle – Elektrophorese

Die Ergebniskontrolle erfolgte auf 2,0 %igen Agarosegelen unter Zugabe von Ethidiumbromid (0,25  $\mu$ g/ml). Als Längenstandard diente der selbst entwickelte Marker, MF (Anhang 9.3.2). Als Ladepuffer wurde eine 15 %ige Ficoll<sup>®</sup> 400 Lösung und als Farbstoff im Ladepuffer Bromphenolblau (2,5 mg/ml) eingesetzt.

Für die Elektrophorese wurden 15  $\mu$ l PCR-Produkt mit 3  $\mu$ l Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Beurteilung der Fragmentlänge wurde in die erste und z. T. zusätzlich in die letzte Tasche der Längenstandard gegeben. Als Laufpuffer diente ein Tris-Borat-EDTA-Puffer (1 × TBE). Die Elektrophorese erfolgte bei 4 V/cm und einer maximalen Stromstärke von 500 mA (Microcomputer Elektrophoresis Powersupply, Consort, Belgien) für 60 - 90 Minuten. Das Sichtbarmachen der DNS fand auf einem UV-Transluminator bei 254 nm und die fotografische Dokumentation mit Kodak 1.0 "Digital Imaging" (Estman Kodak Inc., USA) statt.

Die Aufreinigung von Erstamplifikationsprodukten zum weiteren Einsatz in der PCR erfolgte wie oben angegeben. Dafür wurden die restlichen 35  $\mu$ l PCR-Produkt mit 7  $\mu$ l Ladepuffer gemischt und in entsprechend große Taschen des Gels pipettiert. Nach der Elektrophorese wurde ein Agaroseblock mit der Bande in der entsprechenden Größe auf einem UV-Transluminator bei 312 nm ausgeschnitten und in ca. 200  $\mu$ l

1 × Tris-Puffer überführt. Die weitere Amplifikation erfolgte nach mindestens 16 Stunden mit diesem Puffer, in den die DNS-Fragmente aus dem Gel hinein diffundierten. Bei den ersten Versuchen wurde im Gegensatz zu diesem Vorgehen eine Aufreinigung mit NucleoSpin® Extract durchgeführt (siehe 3.5.6).

Präparative Elektrophoresen wurden mit 2,0 %igen Agarosegelen und Tris-Acetat-EDTA-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Hierfür wurden 35 µl PCR-Produkt mit 7 µl Ladepuffer gemischt und in entsprechend große Taschen des Gels pipettiert. Flankierend wurden die Längenstandards aufgetragen. Die Elektrophorese fand bei 3 V/cm und einer maximalen Stromstärke von 500 mA (Microcomputer Elektrophoresis Powersupply, Consort, Belgien) für 90 – 120 Minuten statt. Die Elektrophoresekammer wurde dabei zur Kühlung in ein Gefäß mit Eiswasser gestellt. Die Visualisierung der DNS zum Ausschneiden erfolgte auf einem UV-Transluminator bei 312 nm.

### 3. 5. 6      **Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen**

Zur Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin® Extrakt II Kit (Macherey & Nagel, Düren) verwendet. Das Prinzip des Kits beruht auf einer Bindung der DNS an eine Silica-Membran in Anwesenheit chaotroper Salze, die mit dem Bindepuffer (NT) zugegeben werden. Das Schmelzen der Agaroseblöckchen erfolgt im Bindepuffer bei 50 °C. Nach dem Binden der DNS an die Silica-Membran werden Salze und Makromoleküle durch einen Waschschrift entfernt. Dann trocknet man die Membran und löst die DNS mit einem Puffer geringer Salzkonzentration (0,5 × Tris-Puffer).

Vor der ersten Verwendung muss der Waschpuffer mit der angegebenen Menge 96 %igem Ethanol versetzt werden.

1. **Schmelzen der Agarose:** pro 100 mg Gel werden 200 µl NT-Puffer zugegeben und für 5 – 10 Minuten bei 50 °C inkubiert.
2. **Binden der DNS:** Das Säulchen auf das Sammelgefäß stellen und die Probe aufpipettieren. Die Zentrifugation erfolgt für 1 Minute bei 11.000 g. Der Durchfluss wird verworfen.

3. **Waschen der DNS:** 600  $\mu\text{l}$  NT3-Puffer zugeben und 1 Minute bei 11.000 g zentrifugieren. Nach dem Ausgießen des Durchflusses wird zum Trocknen der Membran für 2 Minuten bei 11.000 g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses die Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß stellen.
4. **Lösen der DNS:** Zum Lösen der DNS werden 25 – 50  $\mu\text{l}$  NE-Puffer zugegeben, für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 Minute bei 11.000 g zentrifugiert.

Die gelöste DNS wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank gelagert. Zum Aufreinigen von doppelsträngiger DNS direkt aus Reaktionsansätzen wird das doppelte Volumen an NT-Puffer zugegeben und das Gemisch zum Binden (Schritt 2) auf die Säule pipettiert. Liegt das Volumen des Reaktionsansatzes unter 50  $\mu\text{l}$ , wird zunächst dieses Volumen durch Zugabe von  $1 \times$  Tris-Puffer eingestellt.

### 3. 5. 7 dATP „Tailing“ der PCR-Produkte

Für die Klonierung von PCR-Produkten, die mit *Taq*-Polymerase erzeugt wurden, werden die von diesem Enzym erzeugten einfachen Adenin-Überhänge an den 3'-Enden genutzt. Man verwendet Vektoren mit einem 3'-Thymin- oder -Uridin-Überhang und führt bei geringer Temperatur eine Ligationsreaktion durch. PCR-Produkte, die durch eine Polymerase mit Fehler-Korrektur-Aktivität erzeugt wurden, weisen keine Überhänge auf. Um diese trotzdem einfach mit einem Kit zur Klonierung von PCR-Produkten weiterverarbeiten zu können, wurden mit Hilfe der *Taq*-Polymerase nach Aufreinigung der PCR-Produkte entsprechende Überhänge erzeugt. Die Aufreinigung ist nötig, da im Puffer für die Phusion<sup>TM</sup>-Polymerase hohe Salzkonzentrationen vorhanden sind, die ein Funktionieren der *Taq*-Polymerase verhindern. Zum Anhängen der Überhänge wurden die PCR-Produkte mit PCR-Puffer, dATP und *Taq*-Polymerase für 20 Minuten bei  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die *Taq*-Polymerase verdünnte man für diesen Zweck 1 : 5 mit Verdünnungspuffer (peQLab, Erlangen).

**Tabelle 17:** Mastermix für das dATP-Tailing.

Reagenz	Bemerkung	Menge
PCR-Produkt		30 $\mu$ l
Puffer	10 $\times$	4 $\mu$
dATP	20 mM	3 $\mu$ l
<i>Taq</i> -Polymerase	1 U/ $\mu$ l	3 $\mu$ l

## 3.6 Klonierung der PCR-Produkte

### 3.6.1 Bakterienkultur

Für die Klonierung und Plasmid-Präparationen wurden die *Escherichia coli* Stämme Qiagen EZ-Kompetente<sup>®</sup>-Zellen (Qiagen, Hilden) und NovaBlue Singles<sup>™</sup> Kompetente Zellen (Novagen-Merck, Darmstadt) verwendet. Diese Stämme sind vom Sicherheitsstamm K12 abgeleitet. Als Klonierungsvektoren dienten die Plasmide pDrive (Qiagen, Hilden) und pSTBlue-1 (Novagen-Merck, Darmstadt). Beide Bakterienstämme und Plasmide ermöglichen ein blau/weiss-Screening der Bakterienkolonien.

Die Herstellung von Agar-Nährböden, die Anzucht von Flüssigkulturen und die Konservierung von Bakterien erfolgte nach Angaben des Herstellers der verwendeten Klonierungskits bzw. nach Standardprotokollen (SAMBROOK und RUSSEL, 2001). Die Agar-Nährböden und die Kulturmedien wurden mit 100  $\mu$ g/ml Ampizillin (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt.

### 3.6.2 Vorbereitung der DNS

Zur Vorbereitung wurden die mit *Taq*-Polymerase erzeugten oder die mit einem Adenin-Überhang versehenen PCR-Produkte zur Aufreinigung mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Hierzu wurden sie mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) versetzt, 1 Minute gevortext und 1 Minute bei ca. 14.000 g zentrifugiert. Danach wurde bei hoher DNS-Konzentration ein Aliquot der oberen, wässrigen Phase direkt für die Klonierung entnommen oder die DNS mit 99 %igem Ethanol aus der oberen Phase gefällt. Dafür wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ein zehntel Volumen 3 M

Natriumacetat, sowie das dreifache Volumen 99 %iges Ethanol zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte eine 5minütige Zentrifugation bei ca. 14.000 g. Das Pellet wurde 10 Minuten luftgetrocknet und für 1 Stunde mit 4 µl 0,5 × Tris-Puffer rehydriert. Danach folgte die Klonierungsreaktion. Teilweise wurde auch eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (25 : 24 : 1) nach dem gleichen Protokoll eingesetzt.

### 3. 6. 3. Verwendete Klonierungskits

#### 3. 6. 3. 1 Qiagen® PCR Cloning

Das Prinzip der Klonierung mit dem Qiagen® PCR Cloning Kit (Qiagen, Hilden) beruht auf der Ligation eines Inserts mit einzelnen 3'-Adenin-Überhängen in einen linearisierten Vektor mit einzelnen 3'-Uridin-Überhängen. Hierzu wurden der Klonierungsvektor, das PCR-Produkt und ein Ligations-Mastermix gemischt und bei 4 – 16 °C inkubiert. In diesem Kit können PCR-Produkte ohne Aufreinigung eingesetzt werden. Danach wurden die mitgelieferten EZ-Kompetenten®-Zellen nach Herstellerangaben mit dem Konstrukt transformiert.

Die Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut und in der folgenden Reihenfolge in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert:

**Tabelle 18:** Zusammensetzung des Ligationsansatzes

Reagenz	Menge (µl)
pDrive	1
PCR-Produkt	1 – 4
DEPC-Wasser	ad 5
Ligation Master Mix	5
Endvolumen	10

Nach einem vorsichtigen Mischen mit der Pipette erfolgte die Inkubation im Kühlschrank bei 4 – 16 °C für ca. 2 Stunden. Eine Inkubation von 30 Minuten ist nach Herstellerangaben ausreichend, aber durch die längere Inkubation kann die Effizienz verbessert werden.

Für die Transformation wurde ein Wasserbad auf 42 °C vorgewärmt, das SOC-Medium auf Zimmertemperatur gebracht und die Agarplatten auf 37 °C. Danach

wurden sie mit 40  $\mu\text{l}$  IPTG-Stok (23 mg/ml, Carl Roth, Karlsruhe) und 40  $\mu\text{l}$  X-Gal-Stock (40 mg/ml, Carl Roth, Karlsruhe) supplementiert und weiter bei 37 °C inkubiert. Pro Ansatz wurde 1 Röhrchen EZ-Kompetente<sup>®</sup>-Zellen aufgetaut.

Zur Durchführung wurden 1 – 2  $\mu\text{l}$  Ligationsprodukt in ein Röhrchen mit kompetenten Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Wärmebehandlung der Bakterien erfolgte für 30 s bei 42 °C. Danach wurden sie für 2 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  SOC-Medium erfolgte das Ausplattieren auf LB-Agar-Platten. Dabei wurden 40, 60 und 80  $\mu\text{l}$  auf verschiedene Agarplatten verteilt. Nach dem Antrocknen erfolgt die Inkubation bei 37 °C über Nacht für 15 – 18 Stunden.

### 3. 6. 3. 2 AccepTor<sup>™</sup> Vektor Kit

Das AccepTor<sup>™</sup> Vektor Kit (Novagen-Merck, Darmstadt) funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie das Qiagen<sup>®</sup> PCR Cloning Kit (Qiagen, Hilden), ist aber kostengünstiger. Bei diesem Kit empfiehlt der Hersteller in jedem Fall eine Aufreinigung der DNS vor der Ligation.

Ligation und Transformation wurden nach Angaben des Herstellers analog zum oben beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Pro Ansatz wurde ein Röhrchen NovaBlue Singles<sup>™</sup> aufgetaut.

**Tabelle 19:** Zusammensetzung des Ligationsansatzes

Reagenz	Menge ( $\mu\text{l}$ )
pSTBlue-1	1
PCR-Produkt	1 – 4
DEPC-Wasser	ad 5
Ligation-PreMix	5
Endvolumen	10

### 3. 6. 4 Kolonie-PCR

Das überprüfen der weißen Kolonien aus der Klonierung wurde mit Hilfe der PCR und genspezifischen bzw. plasmidspezifischen Primern durchgeführt. Zur Durchführung wurden die Kolonien mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers von der Agarplatte in 2,5 ml Flüssig-LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C auf

einem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Danach wurden 5 µl Flüssigmedium in ein PCR-Gefäß pipettiert und die Bakterien für 10 Minuten bei 94 °C abgetötet. Dann erfolgte die Zugabe von 10 µl des PCR-Mastemixes (siehe Tabelle 20) und die PCR unter an das verwendete Primersystem angepassten Bedingungen. Initial fand noch einmal eine Denaturierung für 2,5 Minuten bei 94 °C statt. Das Schmelzen geschah in jedem Zyklus bei 92 °C für 15 s. Die Anlagerungszeit der Primer war 15 Sekunden, die Elongationstemperatur 72 °C. Anlagerungstemperaturen und Elongationszeiten finden sich in Anhang 9. 4. Es wurde eine Schlußamplifikation für 5 Minuten bei 72 °C durchgeführt, danach folgte das Kühlen bei 4 °C bis zur Entnahme aus dem Thermocycler. Die Ergebniskontrolle wurde je nach verwendetem Primersystem wie unter 3.5.1.2 beschrieben auf 2 %igen oder 3 %igen Agarosegelen in Tris-Borat-EDTA-Puffer für 45 bis 60 Minuten durchgeführt.

**Tabelle 20:** Mastermix für die Kolonie-PCR

Reagenz	Konzentration	Volumen (µl)	Endkonzentration
DEPC-Wasser		6,5	
PCR-Puffer (incl. 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	10 ×	1,5	
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,3	2,0 mM (insges.)
dNTP	10 mM jew.	0,6	0,4 mM jeweils
Primer 1	10 µM	0,5	0,3 µM
Primer 2	10 µM	0,5	0,3 µM
Taq-Pol	5 U/µl	0,12	0,6 U/Ansatz
Flüssigkultur		5,0	
Gesamtvolumen		15,02	

### 3. 6. 5 Anzucht von *E. coli* Flüssigkulturen und Plasmidpräparation

Vor der Präparation der Plasmid DNS erfolgte eine Vermehrung der positiven Bakterienkolonien in LB-Flüssigmedium. Hierfür wurden 0,5 µl Flüssigmedium mit entsprechenden Kolonien in 10 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Zur Isolierung der Plasmid-DNS mit NucleoSpin® Plasmid (Macherey & Nagel, Düren) wurden je nach optischer Dichte des Mediums 4 - 6 ml eingesetzt.

Bei diesem Kit wird die Plasmid-DNS nach einer alkalischen Lyse der Bakterien analog zum Verfahren bei NucleoSpin® Extrakt (siehe 3. 5. 6) aufgereinigt.

Vor dem ersten Einsatz des Kits muss der Waschpuffer A4 mit der angegebenen Menge 99 %igem Ethanol und der Puffer A1 mit der lyophilisierten RNase versetzt werden. Die Bakterien wurden aus dem Flüssigmedium bei 4500 g für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

1. **alkalische Lyse:** Das Pellet vorsichtig in 250 µl A1-Puffer resuspendieren und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen. 250 µl A2-Puffer zugeben und vorsichtig mischen. Nach maximal 2 Minuten 300 µl A3-Puffer zugeben und vorsichtig mischen. Die Bakterienreste für 10 min bei 14.000 g abzentrifugieren.
2. **Plasmid-DNS Binden:** Den Überstand auf die Säule pipettieren und für 60 s zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen.
3. **Erstes Waschen der Plasmid-DNS:** Hierzu 500 µl auf 50 °C angewärmten AW-Puffer auf die Säule geben und für 60 Sekunden bei 11.000 g zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen.
4. **Zweites Waschen der Plasmid-DNS:** Dazu 600 µl A4-Puffer auf die Säule geben und für 60 Sekunden bei 11.000 g zentrifugieren. Den Durchfluss verwerfen.
5. **Trocknen der Membran:** Für weitere 120 Sekunden bei 11.000 g zentrifugieren. Danach die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß transferieren.
6. **Lösen der Plasmid-DNS:** Zum Lösen 50 µl AE-Puffer aufpipettieren, 1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren und noch einmal für 1 Minute bei 11.000 g zentrifugieren. Diesen Schritt einmal wiederholen.

Die gewonnene DNS wurde einer Konzentrationsbestimmung unterzogen und bei – 20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

### 3. 6. 6 Kontrolle der gewonnenen Plasmide

Die gewonnene Plasmid-DNS wurden zur Kontrolle der enthaltenen DNS einem Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* unterzogen. Bei den verwendeten Klonierungsvektoren wird die Klonierungsstelle von Erkennungsstellen dieses Enzyms flankiert, so dass nur das integrierte Fragment herausgeschnitten

wird. Je nach Konzentration der Plasmid-DNS wurden 1 oder 2  $\mu\text{l}$  in die Reaktion eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 bis 2 Stunden bei 37 °C.

**Tabelle 21:** Mastermix für den Restriktionsverdau

Reagenz	Bemerkung	Menge ( $\mu\text{l}$ )
DEPC-Wasser		20 – 21
Puffer für <i>EcoRI</i>	10 ×	2,5
<i>EcoRI</i>	10 U/ $\mu\text{l}$	0,5
Plasmid DNS		1 – 2
Gesamtmenge		25,0

Die Ergebniskontrolle fand auf 2%igen Agarosegelen mit 15  $\mu\text{l}$  aus jedem Reaktionsansatz wie oben beschrieben (siehe 3. 5. 4) statt.

### 3.7 Sequenzierung und Auswertung der Ergebnisse

Die Sequenzierung erfolgte im Plasmid mit Hilfe plasmidspezifischer Primer bei der MWG Biotech GmbH, Ebersberg. Ausgewählte Plasmide und Plasmide aus der 3'-RACE mit langen Fragmenten wurden mit Vorwärts- und Rückwärtsprimern sequenziert, die übrigen nur mit dem Rückwärtsprimer.

Die Computerauswertung der Sequenzierungsergebnisse und der Elektropherogramme erfolgte mit Chromas 1.4, dem BLAST-Search Programm (NCBI, Bethesda, USA), ClustalW (EMBL-EBI, Heidelberg) und zusätzlich mit dem speziell für Antigenrezeptorgene entwickelten V-QEST (IMGT, Montpellier, Frankreich; GIUDICELLI et al., 2004) sowie IMGT/Domain GapAlign (IMGT, Montpellier, Frankreich). Für die Darstellung von Sequenzvergleichen wurde TreeView 1.6.6 und GeneDoc 2.6.003 eingesetzt.

Bei der Einteilung der V-Regionen in Untergruppen und Subtypen wurden Unterschiede in den Sequenzen ab drei unterschiedlichen Basen berücksichtigt, da es bei den TR-Loci nach Literaturangaben keine somatische Hypermutation gibt (HAYDAY et al., 1985; 2000; QUERTERMOUS et al., 1986b; LEFRANC und RABBITS, 1991). Die Bildung der Untergruppen wurden mit ClustalW und TreeView 1.6.6 analysiert.

## 3. 8 Durchführung der einzelnen Versuche

### 3. 8 . 1 Klassische 5'-RACE

Bei den ersten Versuchen der 5'-RACE konnte kein spezifisches Produkt produziert werden. Daher erfolgte eine zweifache Amplifikation der cDNS als seminested PCR:

**Tabelle 22:** Versuche zur klassischen 5'-RACE

	5'-RACE 5	5'-RACE 6
<b>Probe</b>	315/03* (30. 8. 2003#)	902/03* (28. 10. 03#)
<b>cDNS-Synthese-Primer</b>	FeTcRGr3	FeTcRGr3
<b>Genspezifischer Primer in der Erstamplifikation</b>	FTRG4	FTRG4
<b>Genspezifischer Primer in der Reamplifikation</b>	FeTcRGr2	FeTcRGr2

\* Sektionstagebuchnummer des verwendeten Tieres; # Datum der RNS-Extraktion.

Die initiale Denaturierung der cDNS erfolgte für 30 Sekunden bei 98 °C, das Schmelzen in den jeweiligen Zyklen für 10 s bei 98 °C. Die Primeranlagerung wurde für 30 s bei 55 °C durchgeführt. In der Reamplifikation waren es 60 °C. Die Elongation erfolgte für 30 s bei 72 °C. Nach den ersten 10 Zyklen wurde die Elongationszeit in jedem Zyklus während der restlichen 25 Zyklen um 5 Sekunden verlängert. Zum Schluss erfolgte eine Endelongation für 5 Minuten bei 72 °C sowie ein Kühlen bei 4 °C bis zur Entnahme der Proben.

Das Überprüfen der mit dem Qiagen® PCR Cloning Kit (Qiagen, Hilden) erzeugten Kolonien erfolgte mit den plasmidspezifischen Primern M13f und M13r. Zusätzlich wurde ihre Identität mit den Primern FeTcRGf2 und FeTcRGr2 überprüft.

### 3. 8. 2 SMART™ RACE

Nach zwei erfolglosen Versuchen mit der SMART™ RACE Technik (SMART™ RACE I und II) erfolgte der Umstieg auf Primer, die für die mittlerweile sequenzierte Variante der C-Region fTRGC1 spezifisch waren. Darüber hinaus setzte man die Step-out PCR ein (siehe: 3.5.4.2). Zusätzlich wurden die hochwertigeren Nukleotidtriphosphate aus dem dNTP-Set „Long Range“ (peQLab, Erlangen) verwendet. Die Zusammensetzung der Mastermixe für Amplifikationen und Reamplifikationen finden sich unter 9.5.1.1.

**Tabelle 23:** SMART™ RACE Versuche

	SMART™ RACE III	SMART™ RACE IV	SMART™ RACE Va und Vb	SMART™ RACE Vc
<b>Probe</b>	1234/02* (28.10.03#)	1234/02* (28.10.03#)	897/04* (3. 7. 04#), Thymus: Va; Kontroll-Blut: Vb;	897/04 * (3. 7. 04#, Milz)
<b>cDNS-Synthese-Primer</b>	eFTGr1	eFTGr1	eFTGr1	eFTGr1
<b>Primer in der Erstamplifikation</b>	UPM , eFTGr2	UPM, eFTGr5	UPM , eFTGr2	UPM, eFTGr5b
<b>Primer in der Reamplifikation</b>	UP-nested , eFTGr3	UP-nested , eFTGr3	UP-nested , eFTGr3	UP-nested , eFTGr4b
<b>Reaktionsbedingungen:</b> siehe 9.5.1.2				
<b>Kolonie-PCR</b>	eFTGf4 und eFTGr4	eFTGf4 und eFTGr4	eFTGf4 und eFTGr4	–

\* Sektionstagebuchnummer des verwendeten Tieres; # Datum der RNS-Extraktion.

Ab SMART™ RACE V (SR) erfolgte die Klonierung mit dem AccepTor™ Vektor Kit (Novagen-Merck, Darmstadt).

**Tabelle 24:** SMART™ RACE VI

	SMART™ RACE VI
<b>Probe</b>	1675/07
<b>cDNS-Synthese-Primer</b>	FTGcDNA1
<b>Primer in der Erstamplifikation</b>	UPM, eFTGr3
<b>Primer in der Reamplifikation</b>	UP-nested, fTRGC1r1, fTRGC4r1, fTRGC7r
<b>Reaktionsbedingungen</b>	siehe 9.5.1.2
<b>Kolonie-PCR</b>	UP-nested, FTGCr7 bzw. FTGCr1

fTRGC4r1 ist spezifisch für die von CHO et al. (1998) publizierte Variante der C-Region. Da sich herausstellte, dass diese Sequenz vermutlich auf eine in vitro-Rekombination zweier Varianten zurückgeht, ergab sich eine Verschiebung in der Nummerierung der Primer und der Varianten der C-Region.

### 3. 8. 3 Weitere Amplifikationsversuche

Da bei SMART™ RACE Vc keine Klone erzeugt werden konnten, erfolgte eine direkte Amplifikation der dabei erzeugten cDNS mit zwei genspezifischen Primern.

**Tabelle 25:** Weitere Amplifikationsversuche

	PCR57/04	PCR10/05	PCR 21/05	FTGLf1
<b>Probe</b>	897/04, Kontroll-Blut	897/04	1234/02	897/04, 1675/04
<b>cDNS-Synthese</b>	SMART™ RACE Vc	SMART™ RACE Vc	AMV-RT	SMART™ RACE Vc und VI
<b>Primer</b>	eFTGVf1, eFTGr4 und eFTGr4b	eFTGVf1, eFTGr5b	eFTGVf1, eFTGr5b	FTGLf1 und variantenspezifische Rückwärtsprimer
<b>Polymerase</b>	Phusion™	BioTherm™	Phusion™	Phusion™
<b>Reaktionsbedingungen</b>	<b>A:</b> 63 °C; <b>S:</b> 20 s; 35 Zyklen	<b>A:</b> 63 °C - 0,5 °C * 10 Zyklen; 58 °C, 25 Zyklen; <b>S:</b> 30 s	<b>A:</b> 65 °C - 0,5 °C * 11 Zyklen; 59,5 °C, 25 Zyklen; <b>S:</b> 20 s	siehe 9. 5. 2
<b>Kolonie-PCR</b>	eFTGVf1 und eFTGr4 bzw. eFTGr4b	eFTGf3, eFTGr2	eFTGVf1, eFTGr3	FTGLf1, FTGCr7

A: Anlagerungstemperatur; S: Synthesezeit; s: Sekunden; \*Touchdown-Protokoll;

### 3. 8. 4 CapFishing™

Das CapFishing™ erfolgte mit gesamt-RNS von 1675/04 (24. 11. 05) und Zufallsprimern (N<sub>6</sub>) für die cDNS-Synthese. Die Amplifikation fand mit Phusion™ DNS-Polymerase und eFTGr3 sowie eFTGCr7 statt (Reaktionsbedingungen siehe 9. 5. 3).

Die Reamplifikation wurde zunächst mit dem C-Region Homologie-Primer FTGCr9, dann mit den Varianten-spezifischen Primern (siehe 9.5.3) getestet. Die DNS-Banden wurden aus dem Agarosegel aufgereinigt, mit A-Überhängen versehen, durch eine Chlorophorm-Extraktion und Alkohol-Fällung erneut aufgereinigt und mit dem AccepTor™ Vektor Kit kloniert. Um Material zu sparen, klonierte man die Amplifikate von jeweils zwei bis drei C-Region-spezifischen Primern gemeinsam in einer Reaktion. Die Überprüfung der Klone erfolgte mit dem 5'-RACE Primer und FTGCr7 bei 65 °C.

Diese Versuchsreihe wurde mit gesamt-RNS von 897/04 wiederholt. Hierbei erfolgte die Klonierung der einzelnen Amplifikate separat.

### 3. 8. 5 Amplifikation von fTRGV4 und zusätzliche Amplifikationen

Da fTRGV4 bisher nur in einem Klon nachgewiesen war und ausgehend von bestimmten C-Regionen bei 897/04 und 1675/04 keine erfolgreiche RACE durchgeführt werden konnte, erfolgten RT-PCRs mit Signalpeptid-Sequenz- und C-Region-spezifischen Primern.

**Tabelle 26:** Zusätzliche Amplifikationsversuche

	<b>fTRGV4</b>	<b>zusätzliche Amplifikationen</b>
<b>Probe</b>	cDNS von 897/04 und 1675/04	cDNS von 897/04 und 1675/04
<b>cDNS-Synthese</b>	AMV, siehe: 3. 5. 3	AMV, siehe: 3. 5. 3
<b>Primer für Amplifikation</b>	FTGLf3 und eFTGr3	FTGLf1 und eFTGr3
<b>Polymerase</b>	Phusion™	Phusion™
<b>Primer für Reamplifikation</b>	FTGLf3 und FTGCr9	FTGLf1 und variantenspezifische Rückwärtsprimer
<b>Polymerase</b>	Phusion™	BioTherm™
<b>Reaktionsbedingungen</b>	siehe 9. 5. 4	siehe 9. 5. 4
<b>Kolonie-PCR</b>	FTGLf3, FTGCr9	FTGLf1, FTGCr7

### 3. 8. 6 3'-RACE

Die 3'-RACE wurde angewendet, um auch die konstanten Regionen des fTRG vollständig aufzuklären. Sie erfolgten analog zu den Angaben im 5'/3' RACE Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) (siehe 3.5.3.4). Die Erstamplifikation wurde nacheinander mit zwei aufeinander folgenden Vorwärtsprimern mit Phusion™ DNS-Polymerase durchgeführt. Der erste Primer wurde ohne PCR-Ankerprimer verwendet, um eine spezifische Zweitstrangsynthese zu gewährleisten. Die Zweitstrangsynthese erfolgte über 10 oder 20 Zyklen, danach wurde der zweite Mastermix zugegeben und weiter amplifiziert. Um die Spezifität zu steigern, erfolgte der Einsatz der genspezifischen Primer im Überschuss. Dieser Weg wurde gewählt, da in einem Vorversuch Konstrukte mit dem PCR-Ankerprimer an beiden Enden aufgetreten waren. Alle Reaktionsbedingungen und die Zusammensetzung des Mastermixes sind in Anhang 9.5.5 aufgeführt.

**Tabelle 27:** 3'-RACE

	3'-RACE 2	ausgehend von fTRGJP	3'-RACE 5	3'-RACE 8 und 9
<b>Probe</b>	1234/04 (28. 10. 03)	897/04 (3. 7. 04)	1234/04 (28. 10. 03)	1675/04 (23. 5. 05) 897/04 (21. 12. 05)
<b>Primer für Zweitstrangsynthese</b>	FeTcRGf2	FTGVf1	eFTGCf5	eFTGCf5
<b>Primer für Amplifikation</b>	FeTcRGf1	FTGP1f1	FTGC2f1	FTGCf6
<b>Reaktionsbedingungen</b>	siehe 9. 5. 5. 1	siehe 9. 5. 5. 1	siehe 9. 5. 5. 1	siehe 9. 5. 5. 1
<b>Kolonie-PCR</b>	FeTcRGf1, FTGr4	eFTGf1, eFTGr1	eFTGC2f1, eFTGr1	

In einem weiteren Versuch mit RNS von 1675/04 sollte fTRGC4 ausgehend von dem vor der C-Region liegenden Intron amplifiziert werden. Hierzu führte man die Zweitstrangsynthese mit FTGI1f1 und 64 °C als Anlagerungstemperatur durch. Die Amplifikation erfolgte mit FTGI1f2 wie zuvor (siehe 9.5.5.1).

**Tabelle 28:** Reamplifikation der 3'-RACE

	fTRGC1	fTRGC3	fTRGC4	fTRGC6
<b>Probe</b>	3'-RACE 8 (1675/04)	3'-RACE 9 (897/04)	1675/04 mit intron-spezifischem Primer	3'-RACE 8 (897/04)
<b>Primer</b>	FTGC1f, PCR-Ankerprimer	FTGC3f1, FTGI3r2	FTGC5f1, PCR-Ankerprimer	FTGC7f1, FTGI3r3
<b>Reaktionsbedingungen</b>	9. 5. 5. 2	9. 5. 5. 2	9. 5. 5. 2	9. 5. 5. 2
<b>Kolonie-PCR</b>	FTGC1f1 eFTGr3	FTGC3f2, FTGI3r2	FTGC5f2, FTGC5I3r1	FTGC7f1, eFTGr3

Um auch FTRGC5 zu klonieren, wurde die 3'-RACE an RNS eines weiteren Tieres durchgeführt: 1448/04. Die dabei erzeugte cDNS wurde unter Verwendung von BioTherm™ DNS-Polymerase sowohl mit FTGCf6, als auch mit FTGV4f1 amplifiziert. Die Zweitstrangsynthese erfolgte im ersten Fall mit FTGCf5 und im zweiten mit FTGV4f2 (siehe 9.5.5.3). Die mit FTGV4f1 erzeugte Bande wurde aufgereinigt und direkt mit dem AccepTor™ Vektor Kit kloniert. Die Überprüfung der erzeugten Kolonien erfolgte mit den plasmidspezifischen Primern.

### 3. 8. 7      **Aufklärung der weiteren vermuteten konstanten Region**

Da die von CHO et al. (1998) veröffentlichte Sequenz der konstanten Region des fTRG in den Basen 1 bis 47 zu 100% homolog zu fTRGC1 ist und ab Base 71 bis auf einen Basenaustausch homolog zu fTRGC4 sollte überprüft werden, ob diese Variante auf Genomebene existiert.

Zu diesem Zweck wurde eine PCR mit FTGC4f1, der auf alle Varianten der C-Region passt, und dem fTRGC4-spezifischen Primer eFTGr5b durchgeführt. Die Proben waren DNS von 1234/02 und 940/02. Der Mastermix entsprach dem Vierfachen der in 3. 5. 1 aufgeführten Menge. Anlagerungstemperatur war 60 °C, Elongationszeit 20 Sekunden. Nach Kontrolle der Amplifikation erfolgte eine Chlorophorm-Extraktion und Alkohol-Fällung der DNS. Nach dem Rehydrieren mit 4 µl Tris-Puffer wurde eine Ligation mit dem AccepTor™ Vektor Kit durchgeführt.

Ein Aliquot des Ligationsansatzes wurde 1 : 10 verdünnt. Daraus erfolgte die Reamplifikation der DNS mit M13r und eFTGr5b unter den oben aufgeführten Bedingungen. Nach Amplifikationskontrolle wurde aus einem Aliquot des Ansatzes die DNS mit 99 %igem Ethanol gefällt und zur Sequenzierung eingeschickt. Diese erfolgte mit einem plasmidspezifischen Rückwärtsprimer.

## **4. Ergebnisse**

### **4. 1 Extraktion von Nukleinsäuren**

#### **4. 1. 1 Extraktion genomischer DNS**

Durch die DNS-Isolierung mit dem Puregene® Kit konnte DNS in entsprechender Menge und Qualität für die Durchführung von PCRs gewonnen werden (siehe 9.6). Die Proben wurden verdünnt und mit einer Konzentration von ca. 50 ng/µl in die PCR eingesetzt.

#### **4. 1. 2 Extraktion von gesamt-RNS**

Die Extraktion von gesamt-RNS mit dem Purescript® Kit lieferte RNS in guter Qualität und Menge, um RT-PCRs und RACE-PCRs durchzuführen (siehe 9.6).

### **4. 2 Primertests**

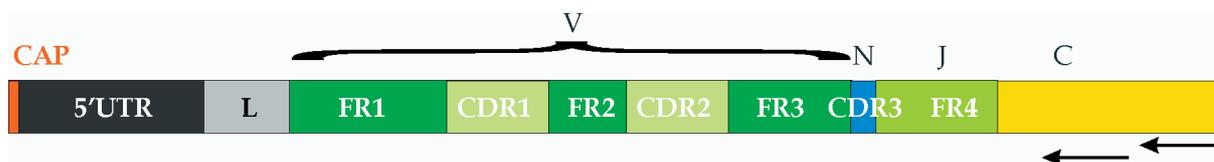
Das Testen der verwendeten Primer und Primerpaare erfolgte in der Regel als Gradienten-PCR, um die optimale Anlagerungstemperatur zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Versuche finden sich im Anhang 9.1.2.

### **4. 3 Ergebnisse der 5'-RACE sowie der Klonierung und Sequenzierung**

Für die Amplifikation der cDNS des fTRG wurde die Technik der RACE gewählt. Hierbei gibt es verschiedene Verfahren. Als erstes wurde die klassische RACE eingesetzt. Dabei wird an die gereinigte cDNS ein Poly-Adenin-Schwanz angehängt, an den bei der Amplifikation ein Ankerprimer binden kann. Resultat sind je nach RNS-Qualität verschieden lange cDNS-Stränge.

Die nächste Technik, die eingesetzt wurde, war die SMART™ RACE. Diese nutzt die terminale Transferaseaktivität der reversen Transkriptase aus dem Molony Murine Leukemia Virus, um eine bekannte Sequenz in die cDNS zu integrieren. Dies soll besonders effektiv in der Nähe des 5'-Endes der mRNS erfolgen.

Als letztes wurde die CapFishing™ Technologie verwendet, bei der direkt die CAP-Struktur als Anlagerungspunkt für ein Adapter-Oligo dient, dessen Sequenz dann in die cDNS integriert wird.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des 5'-Bereiches der cDNS des fTRG. Die Pfeile symbolisieren die Lage der verwendeten genspezifischen Primer. **CAP:** CAP-Struktur; **5'UTR:** 5' nicht translatierte Region; **L:** Sequenz des Signalpeptids (Leader); **FR:** Framework Region; **CDR:** Complementarity determining Region; **V:** variable Region; **N:** N-Region; **J:** joining Region; **C:** konstante Region.

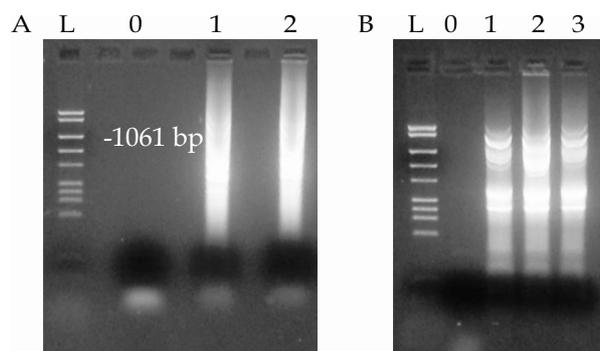
Eine Liste der erzeugten Klone und Sequenzen mit Identifizierung der enthaltenen Varianten befindet sich in Anhang 9.7. Dort sind auch die Zugangsnummern für die Sequenzen bei GeneBank aufgeführt.

#### 4. 3. 1 Klassische 5'-RACE

Die klassische RACE wurde an Proben von 315/03 (5'-RACE 5) und 902/03 (5'-RACE 6) durchgeführt. Dabei wurde jeweils der Schmier von oberhalb 680 bp reamplifiziert und die daraus resultierende DNS kloniert.

Für 5'-RACE 5 wurden insgesamt 184 Klone isoliert, von denen 65 in der Kolonie-PCR positiv waren und angezüchtet wurden. Die Sequenzierung erfolgte an fünf dieser Klone: pFTGII.134, pFTGII.159, FTGII.163, pFTGII.164 und pFTGII.169. Die Sequenzen dieser Klone waren weitgehend identisch, und enthielten eine der veröffentlichten C-Region (D89023; CHO et al., 1998) ähnliche Sequenz.

Aus der Klonierung von 5'-RACE 6 konnten 56 Kolonien isoliert werden, von denen in der Kolonie-PCR 22 positiv getestet wurden. Bei zwei dieser Klone erfolgte die Sequenzierung: pFTGIII.2

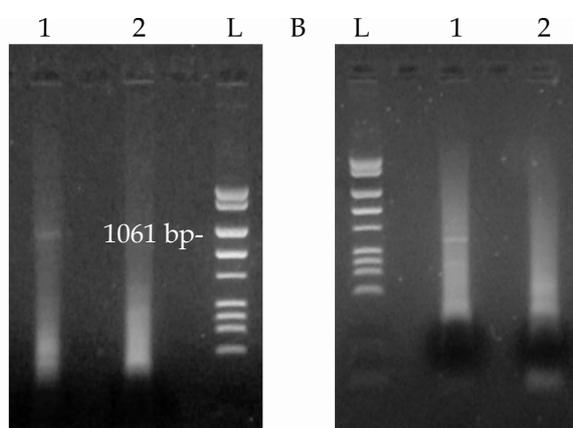


**Abbildung 10:** Elektrophorese der Erstamplifikation (A) und der Reamplifikation (B) von 5'-RACE 5. **L:** Längenstandard MF (siehe 9.3.2.); **0:** Negativkontrolle. **1 - 3:** identische mehrfache Ansätze.

und pFTGIII.3. Die Sequenz von pFTGIII.2 war weitgehend identisch mit denen aus 5'-RACE 5. pFTGIII.3 erwies sich als cDNS von ungespleißter mRNA.

### 4.3.2 SMART™ RACE

Der Umstieg auf die SMART™ RACE erfolgte, um vollständige Sequenzen funktioneller fTRG-Gene zu erhalten. Hierzu wurde auch auf neue Primer und die Technik der Step-out PCR umgestellt. Dadurch sollten Konstrukte vermieden werden, die an beiden Enden den Universal-Primer enthielten, wie sie in Vorversuchen aufgetreten waren. Die Amplifikation erfolgte weiterhin mit der Phusion™ High Fidelity DNS-Polymerase.



**Abbildung 11:** Ergebnis der Erst- (A) und Reamplifikation (B) von SMART™ RACE IV. L: Längenstandard MF (siehe 9.3.2.); 1 und 2: doppelte Ansätze.

**Tabelle 29:** Ergebnisse der Klonierung und Sequenzierung von SMART™ RACE III bis V

	SMART™ RACE III	SMART™ RACE IV	SMART™ RACE Va	SMART™ RACE Vb
<b>weisse Kolonien</b>	60 %	40 %	92	32
<b>davon Koloie-PCR-positiv</b>	80 %	25 %	38	11
<b>sequenziert</b>	FTGV1, FTGV2, FTGV17	FTG1, FTG3, FTG4.	fTRG23, 34, fTRGII.2, 4 und 5	fTRGIII.2 und 7
<b>Ergebnis</b>	vRNS	fTRGV1, -J1.1, -C1	fTRGV1, -J1.1, -C1	fTRGV1, -J1.1, -C1

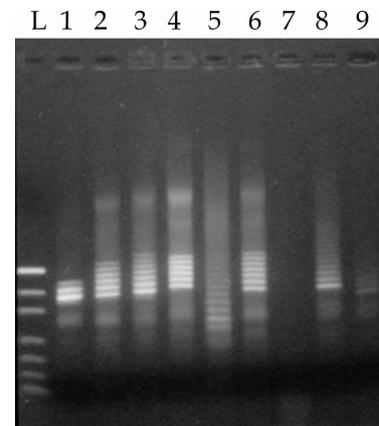
**Tabelle 30:** Ergebnisse der Klonierung und Sequenzierung von SMART™ RACE VI

Reamplifikation	FTGC1r1	FTGC4r1	FTGC7r1
<b>weiße Kolonien</b>	56	56	52
<b>PCR-positive Kolonien</b>	10	8	15
<b>Sequenzierte Kolonien</b>	2	3	3
<b>Bezeichnung</b>	FTGVJC1.1 - 2	FTGVJC4b.1 - 5	FTGVJC7.1 - 8

In der Kolonie-PCR wiesen viele Klone zwei Banden auf. Es wurde nur mit Klonen weitergearbeitet, die eine Bande ergaben. Daneben fanden sich beim Test mit UP-nested und FTGC7r1 auch solche mit einem deutlichen Leiternmuster. Dies rührte daher, wie die Sequenzierung ergab, dass der RACE-Primer am 5'-Ende mehrfach in die Sequenz integriert war.

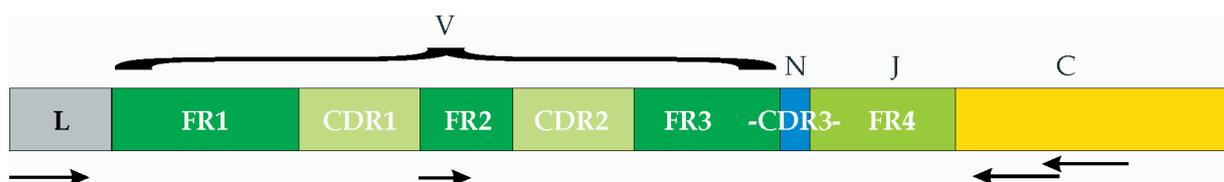
Die mit FTGC1r1 und FTGC7r1 erzeugten Klone enthielten die erwarteten C-Regionen. Außerdem konnte eine neue Variante der V-Region festgestellt werden, fTRGV1.2, sowie eine neue Variante der J-Region, fTRGJ2.1. Die übrigen Klone entsprachen den bekannten fTRGV1, -J1.1 und -C1.

**Abbildung 12:** Ergebnis einer Kolonie-PCR mit UP-nested und FTGC7r1. L: DNS-Längenstandard pUC19/*Msp*I (siehe: 9.3.1); 1 - 9: mehrere getestete Kolonien.



### 4.3.3 Weitere Amplifikationsversuche

In weiteren Versuchen setzte man zwei genspezifische Primer ein, um Sequenzen des fTRG zu generieren, da mit der RACE-Technik keine vollständigen V-Regionen erhalten werden konnten.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der TcR $\gamma$ -Kette mit Angabe der Lage der Primer für die weiteren Amplifikationen. L: Sequenz des Signalpetids (Leader); FR: Framework Region; CDR: Complementarity determining Region; V: variable Region; N: N-Region; J: joining Region; C: konstante Region.

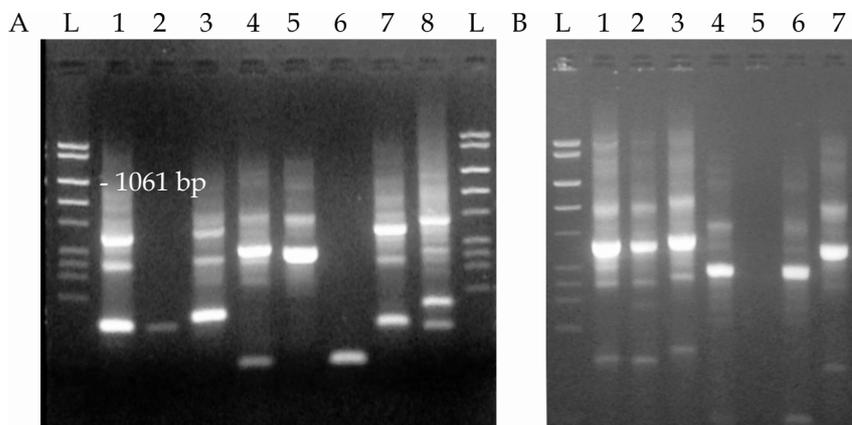
**Tabelle 31:** Ergebnisse der weiteren Amplifikationsversuche

	PCR57/04 - 897/04	PCR57/04 - Kontroll-Blut	PCR10/05	PCR21/05
<b>weiße Kolonien</b>	30	116	8	96
<b>PCR-positive Kolonien</b>	8	74	5	82
<b>Sequenzierte Kolonien</b>	2	7	3	3
<b>Bezeichnung</b>	PCR57.2.2, -13	PCR57.3.3, -6, -12, -21, -22, -23, -30	VJC4.4, -5, -6	21.83, 21.84, 21.87

Die Sequenzen aus PCR57.2 entsprachen den bisher gefundenen fTRGV1, -J1.1 und -C1. Bei den Sequenzen aus PCR57.3 waren neue Varianten der Regionen enthalten, nämlich fTRGV2, -V3, -J2.2, -J1.2, -C2 und -C3. Zwei der Klone aus PCR10/05, VJC4.4 und VJC4.5, enthielten fTRGV1, -J1.1 und -C1, der dritte, VJC4.6 fTRGV1, -J1.1 und eine zur veröffentlichten Sequenz D89023 (CHO et al., 1998) homologe Sequenz. Die Klone aus PCR 21/04 waren zu über 99 %ig identisch und enthielten eine zu D89023 homologe Sequenz, sowie fTRGV1 und -J1.1.

Für die Reamplifikation mit FTGLf1 wurden Erstamplifikate aus SMART™ RACE V und VI mit FTGLf1 und den C-Varianten-spezifischen Rückwärtsprimern verwendet. Bei Verwendung von SR V mit FTGC2r1 und FTGC6r1 konnte kein Amplifikat erzeugt werden, mit FTGC3r1 nur ein schwaches. Bei SR VI blieb mit FTGC5r1 eine Bande aus. Die Größe der Banden lag wie erwartet zwischen ca. 450 und 650 Bp.

**Abbildung 14:** Reamplifikation mit variantenspezifischen Primern. **A:** SR V, 897/04; **B:** SR VI 1675/04; **1 - 7:** FTGC1 - 7r1; **8:** eFTGr3. **L:** DNS-Längenstandard MF (siehe: 9.3.2).



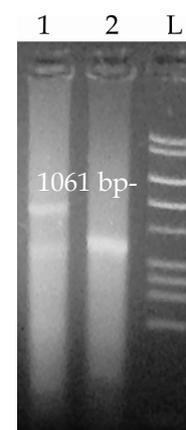
**Tabelle 32:** Ergebnisse der Amplifikationen mit fTRGLf1

	PCR50/04	PCR50/04b	56/04, 58/04	62/04, 63/04
weiße Kolonien	32	32	2	32
PCR-positive Kolonien	18	18	2	8
Sequenzierte Kolone	4	2	1	6
Bezeichnung	50.10, - 11, -14, -15	52.2, 52.7	58.15	62.1 bis 6

#### 4.3.4 CapFishing™

Da mit der SMART™ RACE keine vollständigen Klone erzeugt werden konnten, wurde die neue Technik des CapFishing™ an RNS von zwei Tieren durchgeführt. Der erste Versuch, bei dem ein genspezifischer Primer in der cDNS-Synthese verwendet wurde, blieb erfolglos, daher wurden später Zufallsprimer (N<sub>6</sub>) verwendet. Im

**Abbildung 15:** CapFishing II. **1:** Erstamplifikation mit eFTGr3; **2:** Erstamplifikation mit FTGCr7. **L:** DNS Längenstandard MF (siehe: 9.3.2).



CapFishing™ II stammte die RNS von 1675/04. Die produzierte Bande der Erstamplifikation lag bei ca. 850 Bp, die bei den Reamplifikationen zwischen 800 und 600 Bp. Die Gelbilder der Reamplifikationen entsprachen in ihrem Aussehen der Abbildung 14. Für fTGC4 konnten unter Verwendung von fTRGC5r1 keine Banden erzeugt werden, obwohl es unter gleichen Bedingungen für das zweite Tier gelang. Die Bezeichnungen der Klone setzen sich zusammen aus C1 für das erste erfolgreiche CapFishing™ und C mit den Nummern der für die Amplifikation verwendeten C-Region Primer.

**Tabelle 33:** Ertrag der Klonierungen aus CapFishing™ II

Bezeichnung der Klonierung	C1C9	C1C1/ C1C4	C1C367	C1C26	C1C24	C1C23	C1C467
Isolierte Kolonien	30	50	52	10	20	32	84
Positive Kolonien	27	18	3	2	1	22	49
sequenzierte Klone	4	6	3	2	1	6	7

Für die Wiederholung des CapFishing™ erfolgte die Verwendung von gesamt-RNS aus der Milz der Katze 897/04 (21.12.05).

**Tabelle 34:** Ertrag der Klonierungen aus CapFishing™ III

Bezeichnung der Klonierung	C1C1	C1C2	C1C3	C1C4
Isolierte Kolonien	48	16	16	16
Positive Kolonien	12	12	9	5
Sequenzierte Klone	3	3	3	6

#### 4. 3. 5 Amplifikation von fTRGV4 zusätzliche Amplifikationen

Bei der Erstamplifikation in diesem Versuch mit FTGLf1 und FTGLf3 sowie eFTGr3 als Rückwärtsprimer konnten Banden in der erwarteten Größe von ca. 650 Bp erzeugt werden. Auch die Reamplifikationen mit den C-Varianten-spezifischen Primern ergaben die erwarteten Banden in der Größe von 500 bis 600 Bp.

**Tabelle 35:** Ertrag der Klonierungen von fTRGV4 und der zusätzlichen Amplifikationen

Bezeichnung der Klonierung	V4.1	V4.2	C5V1	C5V2	C3V	C6V	C7V
Tier-Identifikation	897/ 04	1676/04	897/04	1676/04	1676/04	897/04	897/04
Isolierte Kolonien	12	12	24	24	8	8	8
Positive Kolonien	4	3	6	6	7	8	8
Sequenzierte Klone	4	3	5	5	2	2	2

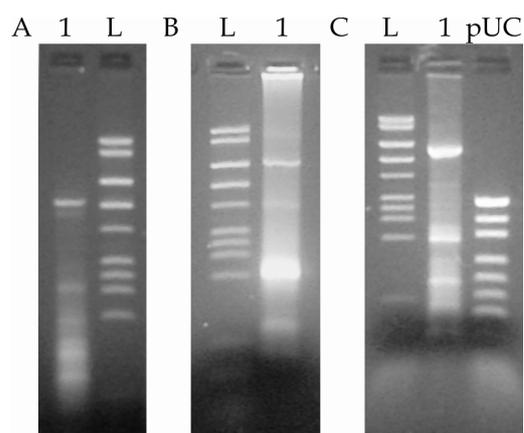
#### 4. 4 Ergebnisse der 3'-RACE sowie der Klonierung und Sequenzierung

Zur Aufklärung der kompletten kodierenden Sequenz des fTRG wurde auch die 3'-RACE durchgeführt. Dabei erzeugte man zuerst mit dem Vorwärtsprimer FeTcRGf2 die Zweitstrang-DNS und amplifizierte dieses Produkt mit dem Vorwärtsprimer FeTcRGf1 und dem PCR-Ankerprimer. Die hierbei entstandenen Banden lagen in der Größenordnung von 1,1 kBp. Das gilt auch für die Bande aus 3'-RACE 5. Bei fTRGJP war sie kleiner und befand sich zwischen 860 und 1060 Bp.

**Tabelle 36:** Ergebnisse der 3'-RACE

	3'-RACE 2	ausgehend von fTRGJP	3'-RACE 5
<b>weiße Kolonien</b>	38	16	32
<b>PCR-positive Kolonien</b>	10	6	15
<b>Sequenzierte Kolone</b>	3	2	3
<b>Bezeichnung</b>	FTGC1, -2, -3	fTGP1.1, -4	FTGC2.9, -24, -25

Bei den 3'-RACEs 8 und 9 erfolgte zunächst eine Erstamplifikation mit Homologie-Primern am Beginn der C-Region. In der Zweitstrangsynthese war dies FTGC5f1 und in der Amplifikation FTGC6f1. Als Rückwärtsprimer fungierte der PCR-Ankerprimer. Die erzeugte Bande lag im Größenbereich von 1,1 kBp. In einem Vorversuch, bei dem der PCR-Ankerprimer komplett im zweiten Mastermix eingesetzt worden war, trat eine Bande bei 850 Bp auf. Diese ließ sich durch alleinige Verwendung des PCR-Ankerprimers reproduzieren. Die kleineren Banden auf den Gelbildern sind ein unspezifisches Amplifikat, wie bei Sequenzierungen in Vorversuchen festgestellt wurde. Die großen Banden wurden für die Reamplifikation ausgeschnitten.



**Abbildung 16:** Ergebnis der 3'-RACE 8. **A:** RACE nur mit PCR-Ankerprimer **B:** RACE mit Homologie-Primern. **C:** RACE für fTRGC4; **1:** Probenansatz; **L:** DNS Längenstandard MF (siehe: 9.3.2); **pUC:** pUC19/*MspI* (siehe 9.3.1).

**Tabelle 37:** Ergebnisse der 3'-RACE

	fTRGC1	fTRGC3	fTRGC4	fTRGC6
<b>weiße Kolonien</b>	8	12	12	10
<b>PCR-positive Kolonien</b>	3	2	8	8
<b>Sequenzierte Kolone</b>	2	2	2	2
<b>Bezeichnung</b>	C1.1, C1.2	C3.1, C3.2	C5.1, C5.2	C7.1, C7.2

Die bei der Reamplifikation mit fTRGCr1 erzeugte Bande lag in der Größenordnung von 1,1 kBp. Die bei der Reamplifikation von fTRGC4 entstandene Bande war deutlich kleiner als die zuvor erzeugten. Sie waren über 99 % homolog zu den vorher ausgehend vom J-Region-Pseudogen sequenzierten (siehe: 4.7.4 und 4.7.5). Bei der Reamplifi-

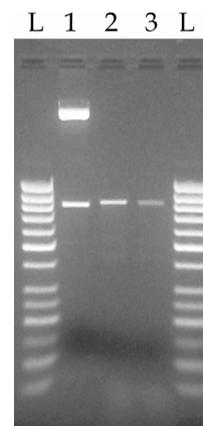
kation von fTRGC6 entstanden zwei Banden, eine bei ca. 850 und die andere ca. 100 Bp darunter. Die DNS wurde nur aus der oberen aufgereinigt und kloniert. Die 3'-RACEs 8, 9 und 15 wurde mit FTGC7f1 und FTGI3r3 reamplifiziert. Hierbei gelang bei 3'-RACE 8 die Reproduktion der Bande nicht. Bei den 3'-RACEs 9 und 15 konnte eine Bande in der zuvor festgestellten Größe nachgewiesen werden. Also hat fTRGC6 auch bei diesen Tieren die gleiche Länge.

Für fTRGC5 erfolgte die Erstamplifikation als 3'-RACE 15 RNS von 1448/04 unter Verwendung von BioTherm™ DNS-Polymerase. Dabei ergab sich eine Bande in der Größenordnung von ca. 1,2 kBp. Diese wurde kloniert Dabei wurden 40 weiße Kolonien erzeugt, von denen 30 in der Kolonie-PCR positiv waren. Aus drei der Klone wurde die DNS zur Sequenzierung isoliert (15.1 bis -3).

## 4. 5 Aufklärung der fraglichen C-Region

Die von CHO et al. (1998) veröffentlichte Sequenz der konstanten Region des fTRG stimmt in ihren Basen 1 bis 47 zu 100 % mit fTRGC1 überein und ab Base 71 bis auf einen Basenaustausch mit fTRGC4. Um zu klären, ob diese Variante auf Genomebene existiert, oder auf eine in vitro-Rekombination von fTRGC1 und fTRGC4 zurückgeht, wurde eine PCR mit FTGC4f1, der auf alle Varianten der C-Region passt, und dem fTRGC4 spezifischen Primer eFTGr5b durchgeführt. Das Produkt dieser Amplifikation wurde mit dem AccepTor™ Vektor Kit ligiert und die DNS aus dem Ligationsansatz mit den Primern M13r und eFTGr5b reamplifiziert. Diese DNS wurde zur direkten Sequenzierung eingeschickt. Die dabei erzeugte Sequenz war eindeutig fTRGC4 zuzuordnen.

**Abbildung 17: 1:** *Eco*RI Verdau des Plasmides C7.1; **2 und 3:** Reamplifikat aus 3'-RACE 9 bzw. 15 mit FTRGC7f1 und FTRGCI3r3. **L:** O'GeneRuler™ 100 Bp Ladder.



## 4. 6 Suchen im Trace-Archiv

### 4. 6. 1 Suche nach den Sequenzen für das Signal-Peptid

Da mit der SMART™ RACE keine vollständige cDNS erzeugt werden konnte, wurde versucht Primer zu erstellen, die für die Sequenzen im Bereich des Signal-peptids spezifisch waren. Hierzu wurde eine Suche im Trace-Archiv der genomischen Sequenzen der Katze mit der Sequenz des Klonen FTG1 durchgeführt. Als Ergebnis erhielt man dabei unter anderem [gnl|ti|750315017](#). In dieser Sequenz, konnte auch mit Hilfe der Proteinsequenzen von MOORE et. al (2005) das Start-Kodon an Position 658 bis 660 identifiziert werden. Dadurch ergab sich ein Intron von ca. 100 Bp. Weitere ATG-Kodone hatten größeren Abstand zur V-Region. Mit einem Teil der Sequenz um das Start-Kodon wurde eine weitere Suche durchgeführt und es wurden ähnliche Sequenzen gefunden (siehe 9. 8. 1).

### 4. 6. 2 Suche nach 3'UTR verschiedener C-Regionen

Diese Suche erfolgte mit den letzten 60 bzw. 30 Basenpaaren von Intron 3 und dem 3'UTR von fTRGC1 und fTRGC2. Bei dieser Suche wurden 24 verschiedene Sequenzen gefunden. Aus ihnen wurden diejenigen ausgewählt, die nicht fTRGC1 und fTRGC2 entsprachen und zu ihnen passende Primer erstellt. Eine Liste mit den Zugangsnummern und der späteren Identifikation dieser Sequenzen findet sich in Anhang 9. 8. 2.

### 4. 6. 3 V-Regionen

Die Suchen nach den V-Region-Varianten im Trace-Archiv der genomischen Sequenzen der Katze wurden mit den vier Haupttypen des fTRG durchgeführt. Dabei konnten zu fTRGV1 und fTRGV3 homologe Sequenzen gefunden werden (siehe 9. 8. 3). In die weitere Auswertung wurden nur Sequenzen aufgenommen, die den gesamten kodierenden Bereich enthielten.

Bei der Suche mit fTRGV4 wurden drei verschiedene ähnliche Varianten gefunden. [gnl|ti|631627457](#), [gnl|ti|843445389](#) und [gnl|ti|686318445](#) sind Vertreter einer dieser Varianten. Sie stellen Pseudogene dar, da der Bereich oberhalb Base 87 der V-Region aus Cytosin-Thymin- und Adenin-reichen Wiederholungen besteht und

wurden als fTRGV4.3P bezeichnet. Eine weitere Variante fTRGV4.1P bilden [gnl|ti|838072588](#) und [gnl|ti|827924706](#), die dritte fTRGV4.2P wird vertreten von [gnl|ti|643947952](#), [gnl|ti|646819523](#) und [gnl|ti|644534307](#). Die jeweiligen Vertreter weisen untereinander eine Homologie von 99 % auf (siehe auch 9.8.3). In den Sequenzen sind Mutationen an den Stellen der typischen Protein-Motive enthalten, und im Bereich des Nonamer der 23RSS Cytosin-Thymin-reiche Insertionen.

#### 4. 6. 4 J-Regionen

Im Trace-Archiv wurden homologe Sequenzen zu fTRGJ1.2, fTRGJ1.3, und fTRGJ3 gefunden. Zu fTRGJ2.2 fanden sich genomische Sequenzen mit einer Homologie von 86 %. Zu den übrigen möglichen Varianten konnten keine genomischen Homologien ermittelt werden (siehe 9.8.4). [gnl|ti|755161287](#) entspricht zu über 99 % dem J-Region Pseudogen fTRGJP (siehe: 4.7.4). Bei der Suche mit der Sequenz des Klon fTGII.2 wurden zwei Sequenzen, die zu 100 % der enthaltenen J-Region fTRGJ2.4 entsprechen gefunden ([gnl|ti|915239161](#), [gnl|ti|652438676](#)).

#### 4. 6. 5 C-Regionen

Zu den C-Regionen konnten dem Trace-Archiv ebenfalls homologe Sequenzen entnommen werden. Dabei wurde auch die Einteilung in Exone möglich. Die einzigen Abschnitte, zu denen im Trace-Archiv Sequenzen fehlen, sind das Exon 3 von fTRGC4 und das Exon 2B von fTRGC6 (siehe 9.8.5). Es konnten keine Abschnitte gefunden werden mit weniger als 97 % Homologie in den Exonen bzw. 95 % Homologie im 3'UTR.

#### 4. 6. 6 Suche im Trace-Archiv der genomischen Hundesequenzen

Mit Hilfe der eigenen Sequenzen und der Veröffentlichung von YAGIHARA et al. (2007) konnten im Trace-Archiv der genomischen Sequenzen des Hundes die vier beschriebenen Varianten der variabel Region ermittelt werden. Danach verglich man diese Sequenzen mit dem kaninen Chromosom 18 (Zugangsnummer: NW\_876265), um die Gene richtig bezeichnen zu können. Die in der Publikation von YAGIHARA et

al. (2007) angegebenen Sequenzen für die J-Regionen wurden entsprechend der oben angegebenen caninen Sequenz ergänzt.

Auch für die selbst ermittelten felines Sequenzen des Exon 1 der C-Region konnten im Trace-Archiv entsprechende homologe kanine Sequenzen nachgewiesen werden (siehe auch: 9.8.6).

## **4.7 Auswertung der Sequenzen**

Die Einteilung der von den Klonen erhaltenen Sequenzen in die einzelnen Regionen erfolgte anhand der Vergleiche mit cDNS Sequenzen weiterer Spezies, zunächst vor allem Schwein, Schaf und Kaninchen. Außerdem wurden Vergleiche mit der Sequenz des TRG Locus von Mensch, Maus und zuletzt auch Hund durchgeführt.

Später wurden vor allem die Vergleiche der Sequenzen untereinander und mit den Sequenzen aus dem Trace-Archiv der genomischen Sequenzen der Katze mit einbezogen. Die genauen Grenzen von J- und V-Regionen konnten nur für die Varianten festlegen werden, für die entsprechende genomische Beispiele gefunden wurden. Ansonsten erfolgte die Festlegung anhand der Homologie der Sequenz am Übergang zur N-Region. Ein Vergleich mit den genomischen Sequenzen der Katze ist in Anhang 9. 8 aufgeführt.

Alle Positionsangaben bei Nukleotid- und Proteinsequenzen im Text und in den Tabellen des Anhangs beziehen sich auf das Start-Kodon als Anfangspunkt, da der Beginn der V-Region nicht zweifelsfrei festgelegt werden konnte. Ausnahmen sind die Darstellungen mit der besonderen IMGT-Numerierung (LEFRANC et al., 1999).

### **4. 7. 1 Sequenz des Signalpeptid**

In den vollständigen Sequenzen wurde anhand des Start-Kodon ATG den Beginn der Sequenz des Signalpeptides erkannt. Aufgrund fehlender Homologie dieser Sequenz zu den komplett beschriebenen Loci von Mensch, Maus und Schaf konnte das 5'Ende und damit der Beginn der V-Region nicht genau festgelegt werden. In Übereinstimmung mit der Situation bei Mensch, Rind und Schaf wurde für fTRGV1, fTRGV2 und fTRGV3 eine Länge von 54 Bp gewählt. fTRGV4 erwies sich als sechs Basenpaare länger. Für das Signalpeptid ergeben sich so Längen von 18 bzw. 20

Aminosäuren. Im 3' Bereich der Sequenz besteht Übereinstimmung mit der Sequenz des Schweins, aber nicht im 5' Bereich.

```

                *           20           *           40           *           60
fTRG-V1 : ATG---CTGGGTCCC---CTGGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCA : 54
fTRG-V2 : ATG---CTGGGTCCC---CTGGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCCGGCAGCTGGGCA : 54
C1C367.1 : ATG---CTGGGTCCC---CTGGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCCGGCAGCTGGGCA : 54
fTRG-V3 : ATG---CTGGGTCCC---CTGGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCCGGTGATGTGGCA : 54
C3V.1 : ATG---CTGGGTCCC---TTGGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCCGGTGATGTGGCA : 54
fTRG-V4 : ATGTGGCTCCTGTCCCAGGCTGGTCCCTGGTGGCCCTCCCTTTGCAGCTATACAAGTGGAGGC : 60

```

**Abbildung 18:** Vergleich der Nukleotidsequenzen für das Signalpeptid. Für fTRGV2 und fTRGV3 sind die Klone mit Mutationen in diesem Bereich mit aufgeführt.

Bei Klonen, die fTRGV1 enthielten, wurden in der Sequenz des Signalpeptides zwei stumme Mutationen festgestellt. Zum einen bei C1C23.21 an Position 24 ein Guanin nach Adenin und bei C1C4.4 an Position 54 ein Adenin nach Guanin. Bei fTRGV1.12 fand sich ebenfalls eine stumme Mutation an Position 48 mit Cytosin nach Thymin. Alle übrigen Klone mit Sequenzen der fTRGV1-Gruppe sind identisch. C1C367.1 ein Klon mit fTRGV2 zeigte an Position 23 eine Verschiebung von Thymin nach Guanin, was eine Veränderung der Proteinsequenz an Position acht von Leucin nach Arginin zur Folge hat. Bei C3V.1 liegt eine Mutation an Position 13 von Thymin nach Cytosin vor, was eine Änderung der Proteinsequenz an Position fünf von Leucin nach Phenylalanin verursacht.

Für die Varianten, von denen genomische Sequenzen im Trace-Archiv gefunden werden konnten, konnte auch die Lage und Länge des Introns innerhalb der Sequenz des Signalpeptides bestimmt werden. Bei fTRGV1 hat das Intron eine

Länge von 95 Bp und bei fTRGV3 von 88

Bp. Nimmt man dabei den Beginn der V-Region wie oben beschrieben an, hat das zweite Exon des Signalpeptids eine Länge von 11 Bp, was der Situation beim Menschen entspricht. Die Sequenzen sind identisch zu den von MOOR et al. (2005) veröffentlichten, wobei dort fTRGV4 nicht mit enthalten ist.

```

                *           20
fTRG-V1 : M-LGP-LALFLCALLFPGGVA : 18
fTRG-V2 : M-LGP-LAFLCALLFPGSWA : 18
C1C367.1 : M-LGP-LAFRCALLFPGSWA : 18
fTRG-V3 : M-LGP-LAFLCALLFPGDVA : 18
C3V.1 : M-LGP-FAFLCALLFPGDVA : 18
fTRG-V4 : MWLRSRVLVASLCSYTSGG : 20

```

**Abbildung 19:** Vergleich der in Proteinsequenz übersetzten Signalpeptidinformationen.

```

      *           400           *           420           *           440
fTRG-V3 : -----ATGCTGGGTCCCCTCGCCTTCCTGTGCGCCCTCCTGTTTCCCG----- : 43
gnl|ti|667 : AGCAGAACCATGCTGGGTCCCCTCGCCTTCCTGTGCGCCCTCCTGTTTCCCGGTAAGTCCTGAC : 448
              ATGCTGGGTCCCCTCGCCTTCCTGTGCGCCCTCCTGTTTCCCG

      *           460           *           480           *           500           *
fTRG-V3 : ----- : -
gnl|ti|667 : TCCCTCCCCGGCGCGGGTGCGTGCGGTGCCTGAGGCTCTTATCCTTCCCTGTCTCACCGCTGT : 512

      520           *           540           *           560           *
fTRG-V3 : -----GTGATGTGGCAGCGATCAGTGTGGAGCAGCCAGCCGTGGTGGTGGCAGTGC : 95
gnl|ti|667 : CCCCCCTCGCAGGTGATGTGGCAGCGATCAGTGTGGAGCAGCCAGCCGTGGTGGTGGCAGTGC : 576
              GTGATGTGGCAGCGATCAGTGTGGAGCAGCCAGCCGTGGTGGTGGCAGTGC

```

**Abbildung 20:** Vergleich der Prototypsequenz von fTRGV3 (C1C23.20) mit der genomischen Sequenz aus dem Trace-Archiv (gnl|ti|667332944). Das erste Exon der Sequenz des Signalpeptids endet bei Base 436 der genomischen Sequenz und das zweite beginnt bei Base 525. In der genomischen Sequenz sind auch die Spleiß-Signale (LODISH et al., 2000) erkennbar: CG/gta . . . ccctgag . . . cag/GT.

#### 4. 7. 2 Variable Regionen

Die in den über 100 sequenzierten Klonen enthaltenen V-Regionen wurden aufgrund der Homologie in vier Varianten, fTRGV1 bis fTRGV4 gegliedert. fTRGV1, fTRGV2 und fTRGV3 weisen untereinander Homologiewerte von ca. 78 % auf und können daher zu einer Untergruppe zusammengefasst werden. fTRGV4 hat zu fTRGV1 und fTRGV2 9 % Homologie und zu fTRGV3 40 %, weist also große Unterschiede auf. Für fTRGV1 konnten mehrere Subtypen festgestellt werden, deren Homologie zum Prototyp zwischen 96 % und 98 % schwankt (siehe 9.9). Varianten mit nur einem oder zwei Basenaustauschen wurden nicht als eigene Subtypen klassifiziert. Eine Liste der Prototypen für die einzelnen Varianten ist in Anhang 9.10 aufgeführt.

**Tabelle 38:** Homologiewerte der felines V-Regionen untereinander

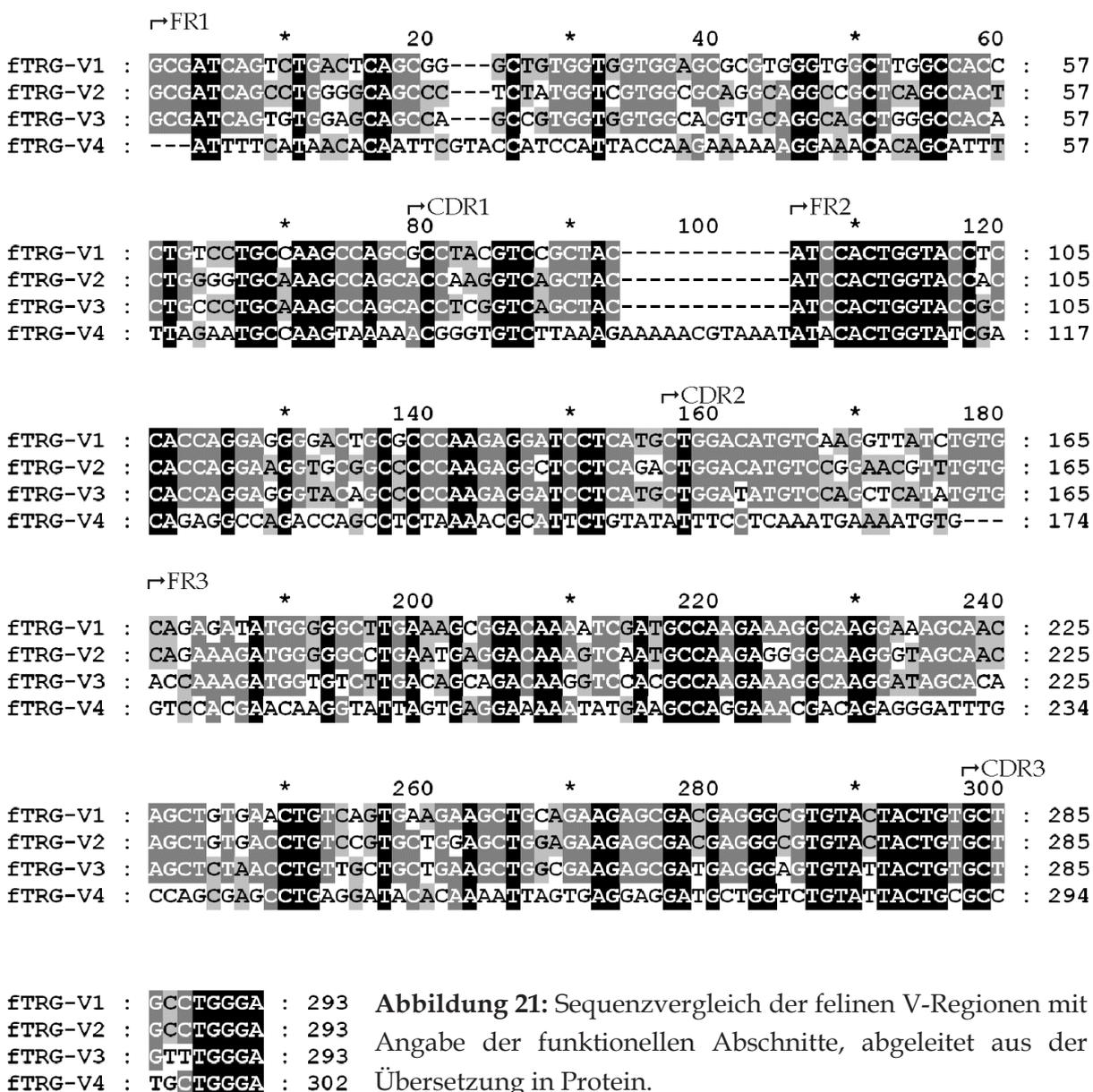
	fTRGV2	fTRGV3	fTRGV4
fTRGV1	79 %	78 %	9 %
fTRGV2		78 %	9 %
fTRGV3			40 %

Durch die Analyse mit V-Quest und IMGT/Domain GapAlign konnten die FR- und CDR-Regionen zugeordnet werden. Allerdings konnte V-Quest fTRGV1 nur ohne J-Region und ab FR2 verarbeiten. Bei fTRGV2 und fTRGV3 erfolgte die Verarbeitung ebenfalls erst, wenn die Sequenz ab FR2 eingegeben wurde. fTRGV4 konnte als einzige Sequenz komplett verarbeitet werden. fTRGV1, fTRGV2 und fTRGV3 konnte

dieses Programm nur mit Sequenzen des Menschen vergleichen, fTRGV4 nur mit denen der Maus.

Bei IMGT/Domain GapAlign ließ das Programm aufgrund zu geringer Homologie mit den Vergleichssequenzen die jeweils ersten zehn Aminosäuren weg. Eine Liste der Homologiewerte aus diesen Vergleichen ist in Anhang 9.11.1 aufgeführt. Die Proteinsequenzen der V-Region-Varianten wurden im Vergleich und mit der besonderen IMGT-Numerierung dargestellt (LEFRANC et al., 1999, 2003).

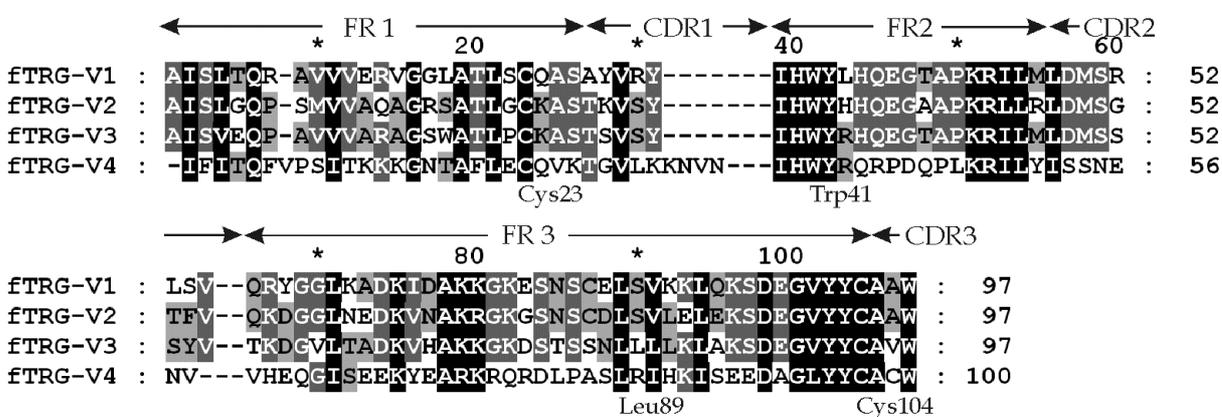
Damit das konservierte Cystein hierbei an Position 23 gestellt werden konnte, musste eine Lücke in die Proteinsequenz eingeführt werden. Dies erfolgte aufgrund der



**Abbildung 21:** Sequenzvergleich der felines V-Regionen mit Angabe der funktionellen Abschnitte, abgeleitet aus der Übersetzung in Protein.

Homologie mit fTRGV4 vor der neunten Aminosäure. Bei fTRGV4 setzte man die Lücke an Position eins.

In der von den Nukleotidsequenzen abgeleiteten Proteinsequenz konnten die für den TcR $\gamma$  typischen Motive gefunden werden. Die konservierten Aminosäuren, Cystein 23, Tryptophan 41, Lysin 89 und Cystein 104 sind enthalten. Das typische Motiv „IHWY“ am Beginn von FR2 findet sich bei allen Varianten, das für alle Antigenrezeptoren charakteristische „WYRQ“-Motiv findet sich allerdings nur bei fTRGV4. Das „YYCA“-Motiv am Ende von FR3 ist in allen Varianten vorhanden. Bei fTRGV4 kann das ebenfalls als typisch beschriebene Serin an Position 10 gefunden werden (RAST und LITMAN, 1994; ARDEN et al., 1995a, b; HAYDAY, 2000).



**Abbildung 22:** Darstellung der abgeleiteten Proteinsequenzen mit IMGT-Nummerierung (LEFRANC et al., 1999, 2003) und Angabe der funktionellen Abschnitte sowie der konservierten Aminosäuren.

Bei den beiden als genomische Sequenz gefundenen Varianten konnte man auch die 23RSS isolieren. Sie ist in beiden Fällen identisch, aber der Spacer unterscheidet sich

```
fTRG-V1      AGCTGCAGAAGAGCGACGAGGGCGTGCTACTACTGTGCTGCCTGGGA----- 293
genomisch   AGCTGCAGAAGAGCGACGAGGGCGTGCTACTACTGTGCTGCCTGGGAAGCTCACAGCCCCG 360
fTRGV3      *****  
RSS kons.   CACAGCCTTA  
           CACAGTG
```

```
fTRG-V1      -----  
genomisch   CGCGCTGCTCTGCTCCCTGAGCAAAAAGTCTCGCTCTCCCAGGGCGCTCCAGGCCCGGAC 420
fTRGV3      CAGGAAGCTCAGGTCCTTGAGCAAAAAGT  
RSS kons.   ACAAAAACC
```

**Abbildung 23:** Sequenzvergleich des 5'Endes der cDNS von fTRGV1 und der zugehörigen genomischen Sequenz (gnl|ti|651428252) zur Darstellung des RSS. Zusätzlich ist die RSS der genomischen Sequenz zu fTRGV3 (gnl|ti|685364778) angegeben, sowie die Konsenssequenz für die RSS (SAKANO et al., 1979, 1980).

deutlich. Im Heptamer weichen nur die beiden letzten Basen von der Konsens-Sequenz ab, im Nonamer die erste und die beiden letzten.

Die Sequenzen der variablen Regionen entsprechen den von MOOR et al. (2005) beschriebenen. Auch die Bezeichnung der Typen stimmt überein. Allerdings konnten die meisten dort beschriebenen Aminosäureunterschiede der Subtypen von fTRGV1 im eigenen Sequenzmaterial nicht festgestellt werden. Die einzige Übereinstimmung ergab sich für fTRGV1.11 (C1C467.21) und SPL-G13 mit einer Mutation an Position 35 von Leucin nach Serin.

Beim Vergleich der Sequenzen mit anderen Spezies konnten die höchsten Homologiewerte beim Vergleich mit den V-Varianten des Hundes festgestellt werden. Beim Vergleich der Hundesequenzen untereinander liegen die Homologiewerte für cTRGV1, cTRGV2 und cTRGV3 zwischen 81 % und 86 %. Vergleiche mit weiteren Spezies sind in Anhang 9.11.2 aufgeführt.

**Tabelle 39:** Homologiewerte beim Vergleich der TRGV-Varianten von Hund und Katze

	fTRGV1	fTRGV2	fTRGV3	fTRGV4
cTRGV1	74 %	74 %	76 %	25 %
cTRGV2	69 %	73 %	72 %	20 %
cTRGV3	70 %	69 %	67 %	11 %
cTRGV4	7 %	7 %	8 %	86 %

### 4. 7. 3 N-Regionen

Der als N-Region bezeichnete Bereich zwischen Ende der V-Region und Beginn der J-Region wird zufällig durch mehrere Mechanismen bei der V(D)J-Rekombination erzeugt (TONEGAWA, 1983). Er entsteht, wenn zum einen die TdT Basen zufällig hinzufügt (KOMORI et al., 1993; GILFILLAN et al., 1993). Zum anderen können beim un-symmetrischen Auflösen der Haarnadelstruktur der kodierenden Enden genomische Sequenzen als Palindrome in der Sequenz zurückbleiben (MCCORMACK et al., 1989; MA et al., 2002). Außerdem gehen an den Enden der V- und J-Region meist Basen verloren (TONEGAWA, 1983). Im eigenen Sequenzmaterial konnten die Spuren dieser Vorgänge gefunden werden.

Palindrome konnten sowohl am 3'-Ende der V- als auch am 5'-Ende der J-Regionen festgestellt werden. Ein besonders langes Palindrom fand sich für C1C23.22 und

C1C26.1, 5'-TACCCGGGTA-3' am Übergang zur J-Region. Das am häufigsten nachgewiesene Palindrom ist das 5'-CTAG-3' am 3'-Ende der V-Region. Es konnte insgesamt siebenmal gefunden werden. Die längste N-Region, in C2C4.3, besteht aus 18 Bp. Daneben gibt es auch Klone ohne N-Region, wie z. B. C1C23.19.

	340	*	360	*	380	*	
C2C4.3-r	: GCTGCCTGGGAAGC	---	AACGTTTCGTAACGCAGGC	--	TGGGTATGGTTGGGCCAC	:	387
C2C3.3-r	: GCTGC	-----	GCAATT	-----	GTATGGCTGGGCCAC	:	363
C1C23.19-r	: GCTGCC	-----		-----		:	345
C1C26.1-r	: GCTGCCTGGGAAG	CT	AGTACCC	-----	GGGTA	TGGCTGGGCCAC	: 376
C1C23.22-r	: GCTGCCTGGGAAG	CT	AGTACCC	-----	GGGTA	TGGCTGGGCCAC	: 376
C5V2.3-r	: GCTGCCTGGGA	-----	GATCC	-----	GGGTATGGCTGGGCCAC	:	370
C5V1.5-r	: GCTGCCTGGGAAG	CT	AGTAGGGGACT	-----	TGGGTATGGCTGGGCCAC	:	382
VJC7.6-r	: GCTGCCTGGGAAG	CT	AGTTTTTTCTCGA	-----	CTGGATCATGGTA	:	151
PCR62.1-r	: GCTGCCTGGGAAGCT	CGGTTTACCGTCC	AT	--	ATGAATCAGGCTGGATCAAGATA	:	389
	GCTGCctggga				g	cac	

**Abbildung 24:** Darstellung besonderer N-Regionen im Vergleich. C2C4.3 enthält die längste nachgewiesene N-Region, in C1C23.19 kommt keine vor. C2C3.3 weist die meisten Nukleotidverluste am Ende der V-Region auf, C1C23.19, die meisten am Beginn der J-Region. In den übrigen Sequenzen sind Palindrome aufgeführt. Rot dargestellt sind Palindrome am 3'-Ende der V-Region, grün solche am 5'-Ende der J-Region.

Die potentielle Produktivität der rekombinierten Sequenzen wurde durch Übersetzung in Proteinsequenzen und folgender Kontrolle des Leserasters nach der N-Region überprüft. Die sich aus der Nukleotidabfolge ergebende Produktivität der Aminosäuresequenzen ist in Anhang 9.6 mit aufgeführt.

Von den 112 sequenzierten Klonen mit rekombinierten TRG-Genen weisen 25 % (28) ein verschobenes Leseraster auf. In drei der Klone fehlt die J-Region, zwei davon haben in der C-Region ein intaktes Leseraster. Vier der Klone weisen ein Stop-Kodon in der V-Region auf, einer davon ist der Vertreter von fTRGV1.6 (C1C1.2). Bei den beiden Klonen mit fTRGJ3 ist das Leseraster in einem Fall intakt.

	FR3	←	CDR3		*	→	FR4	
			120				140	
C2C4.3-r	: KLEKSDEGVYYCA	AWEATFVTQAGYGM	AHKVFGPGTLLRVT	-----	:	141		
C2C3.3-r	: KLEKSDEGVYYCA	---QL---	YGM	AHKVFGPGTLLRVT	-----	:	133	
C1C23.19-r	: ELEKSDEGVYYCA	-----	HKVFGPGTLLRVT	-----	:	127		

**Abbildung 25:** Abgeleitete Proteinsequenz der längsten und kürzesten potentiell funktionellen CDR3.

In produktiv rekombinierten Ketten ergeben sich für die CDR3, die von der Base nach dem zweiten konservierten Cystein der V-Region bis zur Base vor dem konser-

vierten Phenylalanin der J-Region reicht (LEFRANC et al., 1999, 2003), Längen von fünf bis 19 Aminosäuren, beziehungsweise 15 bis 57 Basenpaaren. Der Großteil der Sequenzen weist für die CDR3 Längen von 12 bis 16 Aminosäuren, also 36 bis 48 Bp auf. Fünf Aminosäuren finden sich bei C1C23.19 und 19 bei C2C4.3 sowie C2C4.5.

#### 4.7.4 J-Regionen

Im eigenen Sequenzmaterial konnten acht verschiedene Varianten für die J-Region festgestellt werden. Aufgrund der Homologie können sie in drei Untergruppen, fTRGJ1 bis fTRGJ3, eingeteilt werden. Die Homologiewerte innerhalb der Untergruppen liegen um 90 %. Die Werte von Untergruppe eins zu zwei um 20 - 40 % und von eins und zwei zu Untergruppe drei um 10 - 20 % (siehe 9.12.1). Zu Untergruppe eins gehören fünf Varianten, zu Untergruppe zwei zwei und zu Untergruppe drei eine. In den Untergruppen eins und zwei konnte das konservierte Phenylalanin 118 identifiziert werden, bei fTRGJ3 fand sich weder ein Phenylalanin noch ein Tryptophan an der entsprechenden Position. Die nach dem konservierten Phenylalanin kommenden Sequenzmotive entsprechen Motiven, die bei Mensch und Maus auftreten. Das „FGPG“ in fTRGJ1.2 bis 1.5 entspricht dem humanen TRGJP, und das „FAEGT“ in fTRG2.1 und -J2.2 dem humanen TRGJP1 und den meisten J-Varianten der Maus (PALLARÈS, 1998; SCAVINER, 2001).

Die Suche im Trace-Archiv ergab zwei weitere potentielle Varianten in Untergruppe zwei, nämlich fTRGJ2.3 (siehe 9. 8. 4) und fTRGJ2.4. fTRGJ2.3 ist zu 86 % homolog

```

                                CDR3 ←→ FR4
                                *      *      *      *      *
fTRGJ1.1 : -----TG GGTATGGCTGGGCTTACAAAGTATTTGGTGCTGGCACACTGCTCAGGGTCACAG----- : 56
fTRGJ1.2 : -----GGTTGGGTATGGCTGGGCCACAAAGTGTTCGGTCCTGGCACACTGCTCAGGGTCACAG----- : 59
fTRGJ1.3 : -GGTATGGCTGGTATAGCTGGGGCAACAAAGTGTTCGGTCCTGGCACACTGCTCAGGGTCACAG----- : 63
fTRGJ1.4 : -----TG GGTATGGTTGGGCCACAAAGTGTTCGGCCCTGGCACACTGCTCAGGGTCACAG----- : 56
fTRGJ1.5 : -----ATTGGTATAGCTGGGACCACAAAGTGTTCGGTCCTGGCACACTGCTCAGGGTCACAG----- : 57
fTRGJ2.1 : -----TGAATCAGGCTGGATCATGTTATTTGCAGAAGGAACTAAGGTCATCGTAAC TCCCCCGG : 59
fTRGJ2.2 : -----ATGAACCAGGCTGGATCAAGATATTTGCAGAAGGAACTAAGCTCATAGTAAC TCCCCCAG : 60
fTRGJ3   : TATTATGGATGGGGATCTACAAAAAATAAATCCTCCTCCAAACCTGAGATCTGGATTACAG----- : 64

```

```

                                CDR3 ←→ FR4
                                *      *      *
fTRGJ1.1 : ---GYGWAYKVFGAGTLLRVT-- : 18
fTRGJ1.2 : --VGYGWAHKVFGPGTLLRVT-- : 19
fTRGJ1.3 : -YGWYSWGNKVFGPGTLLRVT-- : 20
fTRGJ1.4 : ---GYGWAHKVFGPGTLLRVT-- : 18
fTRGJ1.5 : ---WYSWDHKVFGPGTLLRVT-- : 18
fTRGJ2.1 : ----ESGWIMVFAEGTKLIVTPP : 19
fTRGJ2.2 : ----EPGWIKIFAEGTKLIVTPP : 19
fTRGJ3   : YYGWGIYKKKNPPPKPELWIT-- : 21
                                Phe118

```

**Abbildung 26:** Darstellung der acht funktionell nachgewiesenen Varianten der J-Region bei der Katze und der abgeleiteten Proteinsequenz. Angegeben sind die funktionellen Bereiche und das konservierte Phenylalanin an Position 118. Das Guanin am 3'-Ende ist die erste Base des ersten Triplets der C-Region.

mit fTRGJ2.2 und zu 79 % mit fTRGJ2.1. fTRGJ2.4 ist zu 86 % mit fTRGJ2.2 und zu 71 % mit fTRGJ2.1 homolog. Die Homologie zum potentiellen fTRGJ2.3 beträgt 95 % (siehe auch 9.12.1). Ein deutlicher Unterschied ist eine drei Basen lange Insertion im 5'-Bereich von fTRGJ2.4.

```

          *           20           *           40           *           60
fTRGJ2.1 : -----TGAATCAG---GCTGGATCATGGTATTGTCAGAAGGAACTAAGCTCATCGTAACTCCCCTGG : 59
fTRGJ2.2 : -----ATGAACCAG---GCTGGATCAAGATATTGTCAGAAGGAACTAAGCTCATAGTAACTCCCCTGG : 60
fTRGJ2.3 : -----TCTAACCAG---GCTGGATCAAGATATTGTCAGAAGGAAATTAGGCTCATAGTAACTCCTCCTG : 60
fTRGJ2.4 : ATAACCTCTAACCAGTGTGATGGATCAAGATATTGTCAGAAGGAACTAAGCTCATAGTAACTCCTCCTG : 69
          AAcCAG   GcTGGATCAaGaTAT  TGCAGAAGGAAcTA  GcTCATaGTAActCC  CC  G

```

**Abbildung 27:** Vergleich von fTRGJ2.1 und fTRGJ2.2 mit den weiteren potentiellen Sequenz für die J-Region fTRGJ2.3 (gnl | ti | 915242736) und fTRGJ2.4 (gnl | ti | 915239161).

Für fTRGJ1.2, fTRGJ1.3, das potentielle fTRGJ2.3 und fTRGJ3 konnten die genauen Enden und die 12RSS durch Vergleich mit den genomischen Sequenzen bestimmt werden. Das Heptamer und das Nonamer von fTRGV1.3 weichen deutlich von der Konsens-Sequenz ab, allerdings konnten in der genomischen Sequenz keine geeigneteren Abschnitte festgestellt werden. Im Fall von fTRGJ2.3 weicht das Nonamer deutlich von der Konsens-Sequenz ab. Würde man hier den Spacer auf 10 Bp reduzieren ergäbe sich für das Nonamer 5'-TCTTTTTAG-3', was der Konsens-Sequenz näher kommen würde. In der genomischen Sequenz des potentiellen fTRGJ2.4 finden sich zwei potentielle Heptamere der RSS. Das eine ist im Vergleich zu den anderen Vertretern dieser Gruppe durch eine Insertion von TGT im 5'-Bereich

```

fTRGJ1.2 -----
genomisch  AAGAGTCTGATACTTACCCACTGAGCCACCCAGGTGCCCCAAAAGGAGATTCTGTAAA 420
fTRGJ1.3                                     CTTTTCAGA
fTRGJ2.3                                     CATCTTTTAG
fTRGJ2.4                                     CATTTTTCA
fTRGJ3                                         GATTCTGT
RSS konsens                                   GGTTTTTGT

fTRGJ1.2 -----GGTTGGGTATGGCTGGGCCACAAAGTGTTCGGTCCTGGCACAC 44
genomisch  AGCTTTTCAGACAGTGGGTTGGGTATGGCTGGGCCACAAAGTGTTCGGTCCTGGCACAC 480
fTRGJ1.3      TATGATG*****
fTRGJ2.3      CAGTGTG
fTRGJ2.4      TAGTGTG
fTRGJ3        GACAGTG
RSS konsens   CACAGTG

fTRGJ1.2  TGCTCAGGGTCACAG----- 59
genomisch TGCTCAGGGTCACAGGTAATATTCTTTTCATTCTTCCATATAACGTAGGGAGGGGAGGCA 540

```

**Abbildung 28:** Vergleich der RSS der J-Regionen für die genomische Sequenzen im Trace Archiv gefunden werden konnten. In der genomischen Sequenz von fTRGJ1.2 (gnl | ti | 648454096) ist das Spleiß-Signal (LODISH et al., 2000) unterstrichen.

der J-Region entstanden. Zu diesem Heptamer fehlt aber das Nonamer in geeignetem Abstand. 13 Basen weiter in 5'-Richtung befindet sich eine komplette RSS.

In den von MOORE et al. (2005) veröffentlichten Proteinsequenzen konnten nur Vertreter von fTRGJ1 festgestellt werden, wobei auch hier die meisten Varianten nicht mit den selbst sequenzierten übereinstimmen. Die dort am häufigsten vorkommende Variante entspricht fTRGJ1.2.

Die gefundenen J-Regionen der Katze wurden mit den sechs beim Hund als funktionell beschriebenen Varianten verglichen. Dabei konnten zwei Kluster festgestellt werden. Einer um die feline Untergruppe fTRGJ1 und der zweite um die feline Untergruppe fTRGJ2. fTRGJ3 ist zu beiden relativ wenig homolog und weist keine Verwandtschaft zu diesen Sequenzen auf (siehe auch: 9.11.3).

Bei der klassischen 5'-RACE wurde zuerst ein J-Region-Pseudogen kloniert und sequenziert, das in nicht rekombiniertem Zustand an fTRGC4 gespleißt exprimiert war. Bei der späteren Sequenzanalyse und im Vergleich mit dem potentiellen fTRGJ2.3, zu dem fTRGJP 90 % Homologie aufweist, konnte festgestellt werden, dass im Bereich des Heptamer der RSS eine 19 Bp lange Deletion vorliegt.

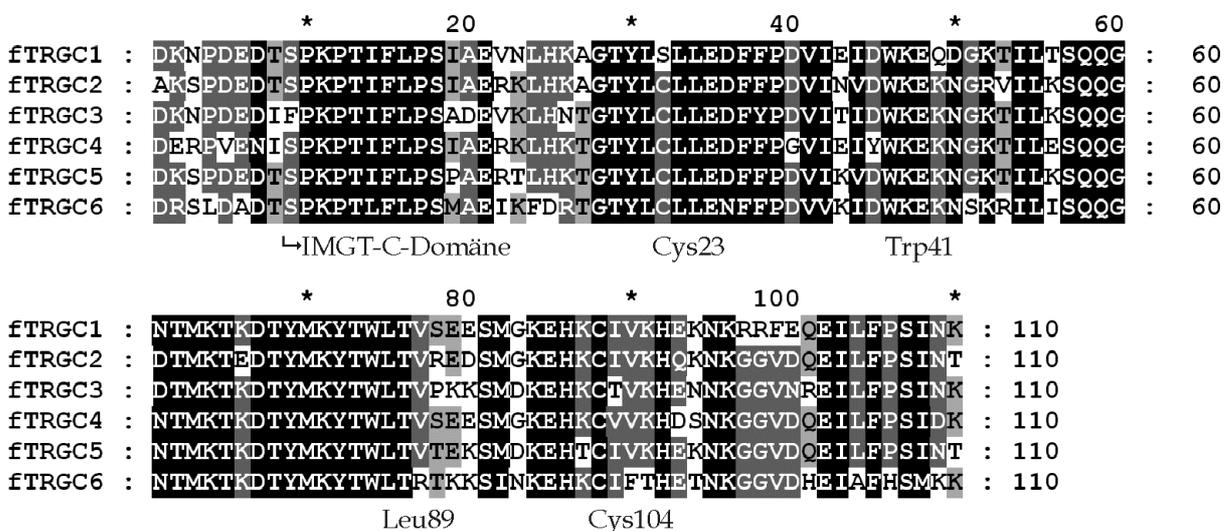
#### **4. 7. 5 C-Regionen**

Bei der Analyse der eigenen Sequenzen und durch die Suche im Trace-Archiv konnten sechs Varianten der konstanten Region des fTRG festgestellt werden. Diese wurden als 3'-RACE amplifiziert und erfolgreich kloniert sowie sequenziert. Die Sequenzen aus der 3'-RACE wurden im 5'-Bereich durch Sequenzen aus der 5'-RACE ergänzt um die C-Region zu komplettieren. Basenunterschiede in den einzelnen Sequenzen verschiedener Klone, korrigierte man, indem die am häufigsten auftretende Base eingesetzt wurde. Die Homologiewerte der einzelnen Varianten zueinander liegen zwischen 86 und 92 % (siehe auch 9.12.2). Nur fTRGC6 unterscheidet sich stärker von den anderen Varianten, seine Homologiewerte zu den anderen Varianten liegen bei 81 %.

Aufgrund des Vergleiches mit den im Trace-Archiv gefundenen Sequenzen konnten die C-Regionen fTRGC1 bis fTRGC4 in vier Exone eingeteilt werden, bei fTRGC5 und fTRGC6 sind es drei Exone. In Anlehnung an die Situation beim Menschen, wo

das Exon zwei bei TRGC2 verdoppelt vorkommt, wird das zweite Exon als 2A und das dritte als 2B bezeichnet. Das vierte Exon wird dann als Exon 3 bezeichnet. Das erste Exon ist bei allen Vertretern 330 Bp lang und kodiert für die C-Domäne des TcR. Diese Domäne ähnelt in ihrem Aufbau der V-Domäne. Daher wurde auch hierfür eine besondere IMGT-Numerierung anhand der konservierten Aminosäuren entwickelt (LEFRANC et al. 2005a). Die eigenen Sequenzen wurden mit dem Programm IMGT/Domain GapAlign analysiert (siehe: 9. 11. 4). fTRGC1 bis 5 ähnelte hier am stärksten Sequenzen der Maus, fTRGC6 solchen des Menschen.

Bei diesem Vergleich konnte festgestellt werden, dass die hoch konservierten Bereiche um die beiden Cysteine, das Tryptophan und das Leucin vorhanden sind. Allerdings fiel auf, dass bei fTRGC1 das erste Cystein durch ein Serin ersetzt ist. In der Nukleotidsequenz beruht dies auf einer Mutation von Guanin zu Cytosin an der zweiten Stelle des Triplets. Diese Mutation ist bei den beiden eigenen Sequenzen und auch in den Sequenzen aus dem Trace Archiv enthalten.

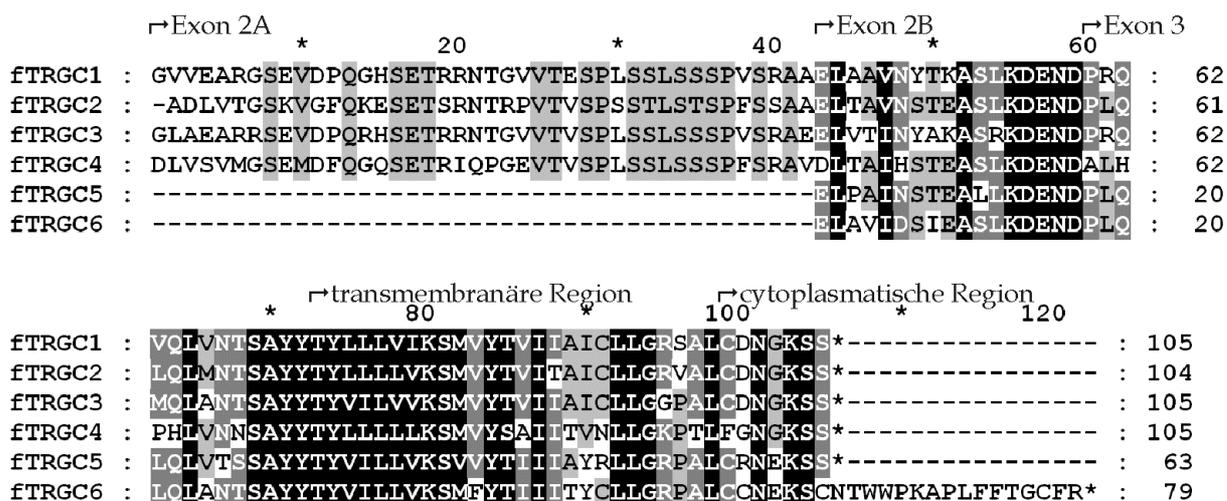


**Abbildung 29:** Vergleich der sechs Varianten der konstanten Region der Katze. Angegeben ist der Beginn der IMGT-C-Domäne, sowie die Positionen der konservierten Aminosäuren: Cystein 23, Tryptophan 41, Leucin 89 und Cystein 104 (LEFRANC et al. 2005a). Das Triplet der ersten Aminosäure besteht aus der letzten Base der J-Region und den ersten beiden Basen der C-Region der cDNS.

Exon 1 konnte mit den als funktionell beschriebenen TRG-Sequenzen des Hundes verglichen werden (siehe 9.11.5). Die Homologiewerte liegen zwischen 79 % und 85 %, ein erkennbarer Cluster wird von nur fTRGC6 und cTRGC4 gebildet, die übrigen Varianten zeigen keine Clusterbildung.

Exon 2A und 2B der Katze bilden das Verbindungsstück der C-Region. Exon 2A ist außer bei fTRGC2 126 Bp lang, bei fTRGC2 sind es 123 Bp. Exon 2B weist bei allen Vertretern 47 Bp auf. Für diese Exone konnte keine Homologie zu Exon zwei von Mensch oder Maus festgestellt werden. Homologien ergaben sich lediglich beim Vergleich mit Chromosom 18 des Hundes. Für fTRGC1 Exon 2A wurden 75 % und für fTRGC1 Exon 2B 87 % ermittelt. Diese homologen Bereiche liegen allerdings außerhalb des beschriebenen cTRG-Locus. Exon 2B ist auf Proteinebene im distalen Abschnitt homolog zu TRGC3 des Rindes und Schafes (MARTINEZ-JEAN, 2001, 2002). Allerdings fehlt das Cystein, das für die Disulfid-Brücke zwischen den beiden Ketten des TcR $\gamma\delta$  nötig ist. Hier liegt eine Mutation zu Serin bzw. bei fTRGC5 zu Leucin vor (Position 53 in Abbildung 30). In der Nukleotidsequenz liegt ein „TCT“ bzw. „TGC“ anstelle eines „TGT“ vor.

Exon 3 enthält die Informationen für den transmembranären und intrazytoplasmatischen Anteil des TcR und misst 144 Bp, außer bei fTRGC6. Dort liegt eine Deletion der letzten Base vor dem Stop-Kodon vor. Dadurch verschiebt sich das Leseraster und das nächste Stop-Kodon ergibt sich an Position 568 bis 570 wodurch dieses Exon 190 Bp lang wird. Gute Homologiewerte zwischen 70 und 80 % ergeben sich für dieses Exon beim Vergleich mit Mensch, Maus, Rind und Schaf (Siehe 9.11.6). Diese Vergleiche wurden mit fTRGC1 als Beispiel für die untereinander relativ



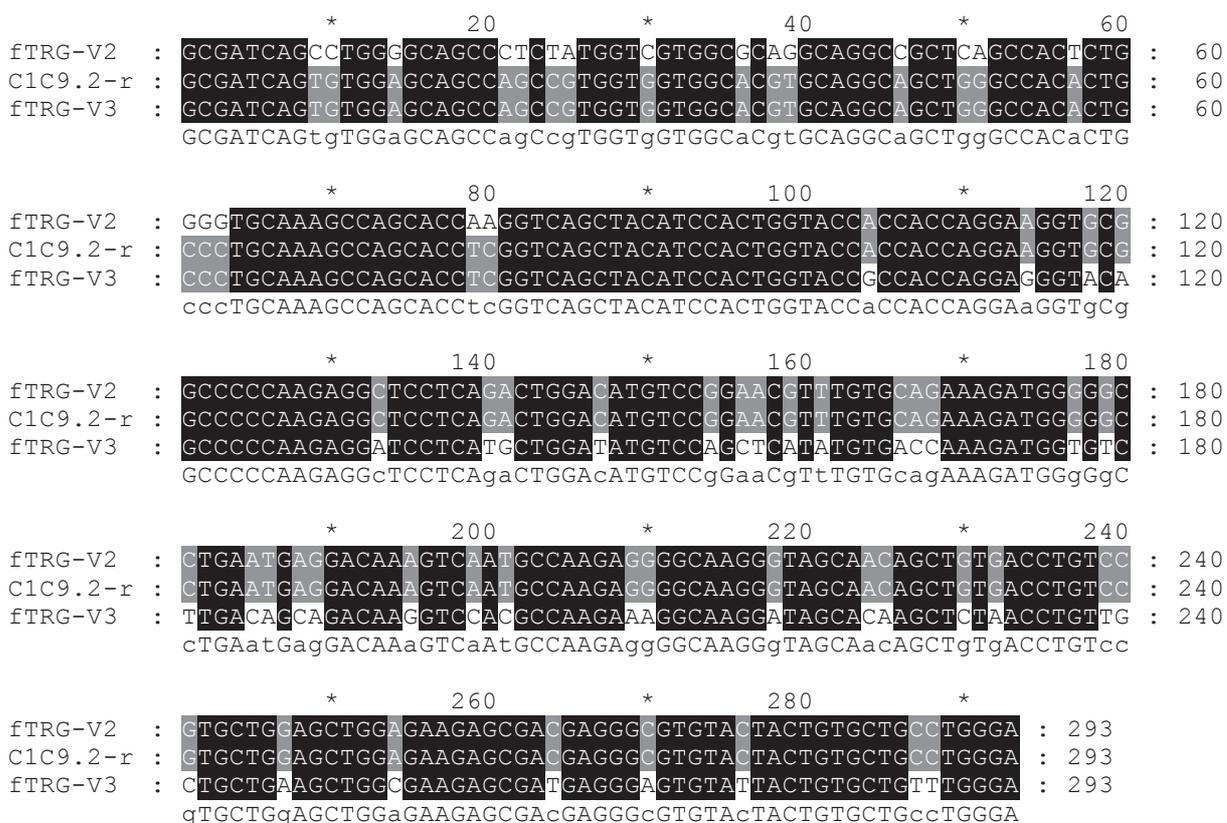
**Abbildung 30:** Vergleich der Exone 2A, 2B und 3 der sechs sequenzierten Varianten der konstanten Region des fTRG. Die funktionellen Bereiche wurden aufgrund von Homologie mit Schaf und Rind eingezeichnet (IMGT, Protein Displays, MARTINEZ-JEAN, 2001, 2002).

ähnlichen fTRGC1 bis -C5 durchgeführt. Zusätzlich erfolgten sie mit fTRGC6. Aufgrund dieser Homologien wurden auch die funktionellen Bereiche der transmembranären und intrazytoplasmatischen Abschnitte in Exon 3 bezeichnet. Die 3'UTR ist für die bis zum Poly-A-Schwanz sequenzierten Klone fTRGC1, -C2 und -C6 ca. 450 Bp lang, für die kürzere Variante fTRGC4 sind es ca. 200 Bp.

Für fTRGC1 und fTRGC4 erhielt man bei der klassischen 5'-RACE auch ungespleißte Vertreter. Bei fTRGC1 war dies FTGV4 und für fTRGC4 pFTGIII.3, FTGV1, FTGV2 und FTGV17.

#### 4. 7. 6 Sequenzen mit in vitro-Rekombinationen

Bei der Sequenzanalyse fielen sowohl bei der V-Region als auch bei der C-Region Klone auf, bei denen ein Teil zu 100 % einem Prototypen entsprach und der Rest zu 100 % einem anderen. Daraus wurde geschlossen, dass es sich hierbei um bei der Amplifikation neu kombinierte Sequenzen handeln musste. Bei der C-Region trat



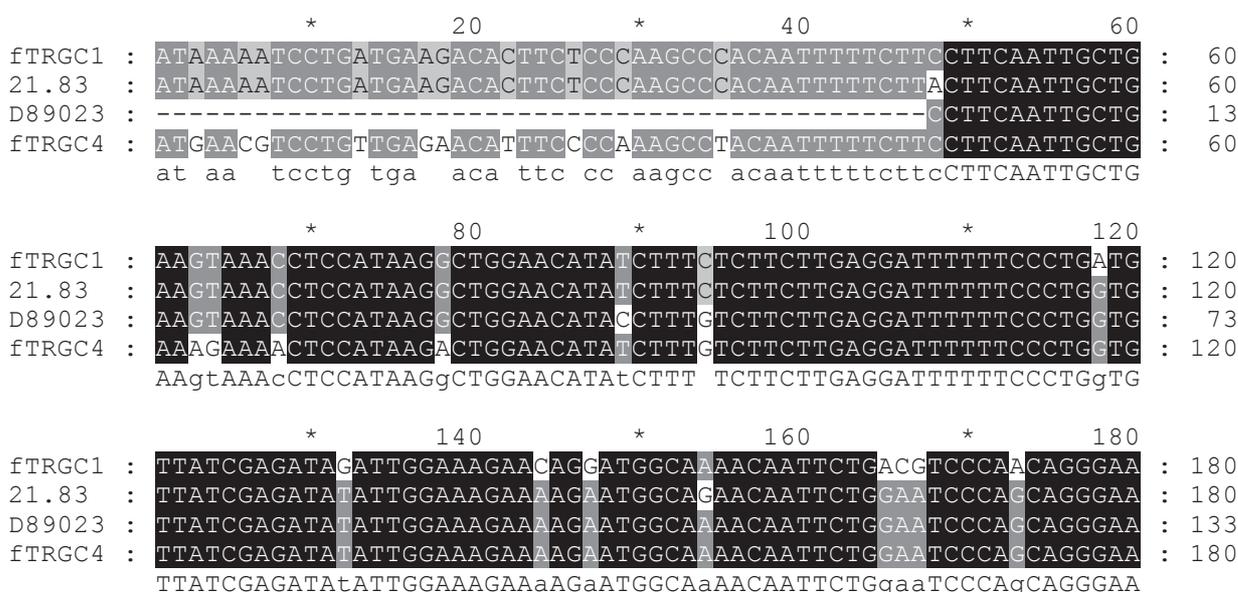
**Abbildung 31:** Vergleich von C1C9.2 mit den Prototypen für fTRGV2 und fTRGV3. Die ersten 80 Bp von C1C9.2 stimmen mit fTRGV3 überein, danach folgt ein in den dargestellten Sequenzen homologer Abschnitt, und ab Base 104 besteht Übereinstimmung mit fTRGV2.

dieses Phänomen vor allem bei dem Versuch auf, von fTRGC4 aus die 5'-RACE durchzuführen. Dabei entstanden auch Sequenzen, die zu über 99 % der von CHO et al. (1998) veröffentlichten Sequenz entsprachen (D89023). Weitere Klone mit neu kombinierten V-Regionen sind C1C467.20 aus fTRGV2 und -V3, C1C467.29 aus fTRGV2 und -V1 sowie C5V1.2 aus fTRGV1 und -V2.

**Tabelle 40:** Klone mit neu Kombinierten C-Regionen

Klon	C-Regionen	Klon	C-Regionen	Klon	C-Regionen
VJC4.6	1 + 4	C1C467.8	1 + 4	C2C4.6	1 + 4
21.83	1 + 4	C1C467.15	2 + 4	C2C4.7	2 + 4
21.84	1 + 4	C1C467.29	1 + 4	C5V1.3	1 + 4
21.87	1 + 4	C2C4.1	1 + 4	C5V1.5	1 + 4
C1C9.2	1 + 4	C2C4.3	2 + 4	C5V2.2	5 + 2
C1C23.21	1 + 4	C2C4.4	1 + 4	C5V2.5	1 + 2
C1C23.23	1 + 2	C2C4.5	5 + 4	FTGC6b.1/2	1 + 6

Klone mit neu kombinierten C-Regionen sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Übergangsbereiche von einer Variante zur anderen liegen häufig zwischen Position 40 und 60 der C-Region, in einigen Fällen auch zwischen Positionen 95 und 120. Letzteres gilt auch für die der veröffentlichten C-Region entsprechenden Sequenzen.



**Abbildung 32:** Vergleich von Klon 21.83, D89023 und den Prototypen von fTRGC1 und fTRGC4. D89023 und 21.83 stimmen bis Base 78 mit fTRGC1 überein. Danach folgt ein in den dargestellten Sequenzen homologer Abschnitt in dem 21.83 an Position 94 noch mit fTRGC1 übereinstimmt und D89023 schon mit fTRGC4. Danach stimmen beide mit fTRGC4 überein.

Diese Positionen stellen jeweils Cytosin-Thymin-reiche Abschnitte dar, die bei allen Varianten der C-Region hohe Homologie aufweisen. Auch bei der 3'-RACE trat beim Versuch der Amplifikation von fTRGC6 eine in vitro-Rekombination von fTRGC1 und C6 auf.

Beim Versuch, die Sequenz von D89023 auf DNS-Ebene nachzuweisen, wurde nur die Sequenz von fTRGC4 gefunden. Da die DNS direkt aus einem Amplifikat sequenziert wurde, sollte, wenn beide Varianten genomisch vorhanden sind, an den unterschiedlichen Stellen im Elektropherogramm die Kurven für beide Basen auftreten, was aber nicht der Fall war. Daher ist davon auszugehen, dass diese Variante genomisch nicht existiert und auf eine in vitro-Rekombination bei der RT-PCR zurückzuführen ist.

#### 4. 7. 7 Kombination der Regionen

Da bei Rind und Schaf in der V(D)J-Rekombination vor allem Varianten aus einem Cluster verbunden werden (MICCOLI et al., 2003; VACCARELLI et al., 2005; HERZIG et al., 2006), wurde die Zusammensetzung der Regionen bei der Katze analysiert, um eventuell Aufschlüsse über die genomische Struktur zu erhalten. Eine Liste dieser Kombinationen mit der Häufigkeit des Auftretens findet sich in Anhang 9.13. Hierbei wurden auch die Sequenzen mit in vitro-Rekombinationen berücksichtigt und jeweils die an die J-Region grenzenden Varianten in die Auswertung aufgenommen.

**fTRGV1** trat am häufigsten mit fTRGJ1.1 und fTRGJ1.2 auf. Die häufigste mit aufgetretene C-Region war fTRGC1, aber auch fTRGC2 konnte festgestellt werden. Bei **fTRGV2** fanden sich am häufigsten fTRGJ1.2 und fTRGC2, fTRGC1 konnte in Verbindung mit fTRGV2 nicht nachgewiesen werden. **fTRGV1.1** wurde vor allem in Verbindung mit fTRGJ1.1 und fTRGC1, aber auch mit fTRGJ2.2 und fTRGC5 gefunden. **fTRGV1.2** trat nur mit fTRGJ2.1 und fTRGC6 auf. fTRGC6 fand sich außerdem nur in Verbindung mit fTRGJ2.1. Eine weitere häufige Kombination war **fTRGV3**, -J1.5 und fTRGC3. **fTRGC5** konnte hauptsächlich mit fTRGJ2.2 und fTRGV4 sowie fTRGV1.8 festgestellt werden. **fTRGC4** war produktiv rekombiniert nur einmal mit fTRGJ3 aufgetreten. Ansonsten wurde es als ungespleißte vRNS oder in Kombination mit fTRGJP nachgewiesen.

## 5. Diskussion

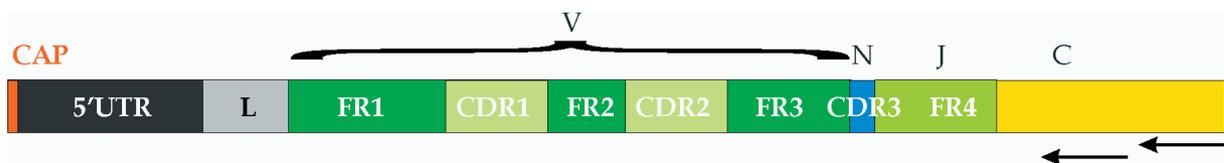
Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Grundlagen zu schaffen, um auch bei der Katze die Diagnostik von Lymphomen und Leukämien mit molekularbiologischen Methoden zu unterstützen. Dafür mussten zunächst die Sequenzen der entsprechenden Antigenrezeptoren aufgeklärt werden. Da bei der Katze T-Zell-Lymphome häufiger vorkommen als B-Zell-Lymphome (KÖHLER, 2003), wurden diese als Ziel gewählt. Von den vier möglichen Rezeptortypen wurde der T-Zell-Rezeptor  $\gamma$  (TcR $\gamma$ ) bearbeitet, da er sich in der Humanmedizin als am besten für die Diagnostik geeignet erwiesen hat (DISS et al., 1995). Dieser Rezeptor wird während der T-Zellreifung sehr früh rekombiniert und bleibt auch in  $\alpha\beta$ -T-Zellen erhalten, während der TcR $\beta$  in T-Zell-Lymphomen häufig in der Keimbahnkonfiguration vorliegt (RAULET et al., 1985; THEODOROU et al., 1994).

Zur Durchführung wurde RNS von frisch toten Katzen verwendet und in die Amplifikation mit der Rapid Amplifikation of cDNA Ends (RACE) eingesetzt. Dies ist eine spezielle Reverse-Transkriptase-PCR-Technik (RT-PCR), mit der unbekannte Gene ausgehend von kurzen bekannten Sequenzabschnitten amplifiziert werden können.

### 5. 1 Amplifikation der cDNS des felines T-Zell-Rezeptors

#### 5. 1. 1 5'-RACE

In Vorversuchen wurden zunächst die Primer und Primerpaare, die für die PCR-Versuche notwendig waren entwickelt und getestet (siehe: 9. 1). Danach wurde versucht die cDNS des felines T-Zell-Rezeptor  $\gamma$  (fTRG) mit Hilfe der klassischen RACE zu amplifizieren. Hierbei wurden Primer verwendet, die auf einen der veröffentlichten Sequenzabschnitte zurück gingen (CHO et al., 1998; D89023). Als Ergebnis wurden Sequenzen erzeugt, die eine von der veröffentlichten Sequenz etwas abweichende C-Region enthielten, eine 62 Bp lange J-Region und ca. 330 Bp des 5'-untranslatierten Bereiches vor dieser J-Region. Insgesamt waren die längsten Klone 572 Bp lang. Die Regionen wurden später als fTRGJP und fTRGC4 bezeichnet.



**Abbildung 33:** Schematische Darstellung des 5'-Bereiches der cDNS des fTRG. Die Pfeile symbolisieren die Lage der verwendeten gensepezifischen Primer. **CAP:** CAP-Struktur; **5'UTR:** 5' nicht translatierte Region; **L:** Sequenz des Signalpeptids; **FR:** Framework Region; **CDR:** Complementarity determining Region; **V:** variable Region; **N:** N-Region; **J:** joining Region; **C:** konstante Region.

Als nächstes wurde die Amplifikation mit der SMART™ RACE Technologie versucht, da dabei vollständige cDNS-Moleküle angereichert werden sollen. Dieses Verfahren nutzt die terminale Transferase-Aktivität der Reversen Transkriptase des Molony Murine Leukemia Virus, um eine bekannte Anlagerungssequenz in die cDNS einzubauen. Diese Aktivität ist besonders am 5'-Ende der RNS ausgeprägt und es werden bevorzugt Cytosin-Reste an das 3'-Ende der cDNS angehängt. An diese hybridisieren Guanin-Reste, die im Adapter-Primer SMART II™ enthalten sind.

Im ersten Versuch mit den vorher verwendeten Primern wurden Sequenzen generiert, welche die bereits sequenzierte C-Region enthielten, allerdings in diesem Fall ungespleißt. In späteren Versuchen, diese Region funktionell nachzuweisen, gelang dies meistens nicht. Nur bei einem Klon, bei dem diese Variante in Kombination mit fTRGJ3 vorlag, war das Leseraster intakt.

Danach wurden neue Primer verwendet. Diese wurden passend zu einer durch eine 3'-RACE sequenzierten C-Region entwickelt. Die Primer für diese 3'-RACE beruhten auch auf der von CHO et al. (1998) veröffentlichten Sequenz. Mit den neuen Primern konnten funktionell rekombinierte Sequenzen des fTRG amplifiziert, kloniert und sequenziert werden. Allerdings enthielten die cDNS-Klone nicht die vollständige Sequenz der V-Region. Die längsten reichten bis zu einer Folge von 5'-GCGGG-3' 18 Bp in 3'Richtung vom Beginn des FR1 der V-Region. Andere Klone reichten bis zu einer Folge von 5'-GGGGG-3' 175 Bp nach Beginn der V-Region und 9 Bp nach Beginn von FR3. An diesen Stellen konnte wahrscheinlich das SMART II™ Oligo an die Cytosine in der synthetisierten cDNS hybridisieren, so dass die reverse Transkriptase die Sequenz des SMART II™ Oligos in die cDNS einbauen konnte. Allerdings müssten hierzu cDNS und mRNA dissoziieren. Danach konnte mit den Universal-

Primern die DNS amplifiziert werden. ..TGACTCAGCGGGCTGTGG.. mRNA  
 Da die Enden immer an den gleichen ..ACTGAGTCGCCGACACC.. cDNS  
 Guanin-reichen Stellen lagen, ist ein ..AGAGTACGCGGG SMART™ II  
 zufälliges Abbrechen der mRNA und UP-nested

ein Anhängen von Cytosinen an die cDNS durch die reverse Transkriptase als Entstehungsmechanismus unwahr-

scheinlich. Eine weitere Möglichkeit wäre noch, dass das SMART II™ Oligo in der folgenden PCR die Zweitstrang-Synthese initiiert hat, da die cDNS vor der Amplifikation nicht aufgereinigt wurde. Dies erscheint aber aufgrund des kurzen Homologie-Abschnittes von nur fünf Basenpaaren und der relativ hohen Anlagerungstemperatur von über 62 °C unwahrscheinlich. Es traten auch Sequenzen auf, an deren 5'Ende das SMART II™ Oligo mehrfach integriert war. Dies konnte nur während der reversen Transkription durch das Anhängen von Cytosin-Resten erfolgen, an die das SAMRT II™ Oligo hybridisieren konnte. Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen könnte sein, das SMART II™ Oligo erst nach der cDNS-Synthese zuzugeben und dann zur Integration seiner Sequenz in die cDNS noch einmal bei 42 °C zu inkubieren. Die erfolgreiche Reamplifikation von SMART™ RACE V mit dem Primer für die Sequenz des Signalpeptides und C-Region-spezifischen Primern beweist, dass eigentlich vollständige cDNS im Ansatz vorhanden war.

MOORE et al. (2005) berichten in ihrer Veröffentlichung, die cDNS des fTRG mit der SMART™ Technologie amplifiziert zu haben. Allerdings stammt der Vorwärtsprimer „AP1“, den sie angeben, aus dem Marathon® cDNS Amplification Kit des gleichen Herstellers (BD Biosciences). Der angegebene genspezifische Primer passt darüber hinaus nicht zu Sequenzen des fTRG, sondern zu denen des fTRB ([AY316122](#) bis [AY316133](#)). Die für das diagnostische System angegebenen Primer passen dann wieder zu Sequenzen des fTRG.

Da bisher keine vollständigen Sequenzen des fTRG generiert werden konnten, setzte man zwei genspezifische Primer bei der Amplifikation ein. Als Vorwärtsprimer waren dies FTGLf1 am Beginn der Sequenz des Signalpeptides und eFTGVf1 am Beginn von FR2. Die Sequenzen, auf die FTGLf1 zurückgeht, konnten dem Trace-

Archiv der genomischen Sequenzen der Katze entnommen werden. Bei der Klonierung der erzeugten DNS konnten jeweils zwei neue Varianten von fTRGV, -J und -C festgestellt werden. Das Ziel, die funktionelle Verwendung von fTRGC4 nachzuweisen, konnte nicht erreicht werden. Bei einem der Versuche entstanden in der C-Region Sequenzen, die über 99 % homolog zu D89023 (CHO et al., 1998) waren. Bei der Probe von 897/04 konnten mit den vorhandenen fTRGC2- und fTRGC5-entsprechenden Primern und bei der Probe von 1675/04 mit dem fTRGC4-entsprechenden Primer keine Banden erzeugt werden.

Erst durch Einsatz der CapFishing™ Technik war es möglich, vollständige Sequenzen zu generieren. Hierbei dient direkt die Cap-Struktur intakter mRNS als Ziel beim Einbau einer bekannten Sequenz in die cDNS. Erfolgreich war dieser Versuch allerdings erst, als für die cDNS-Synthese keine genspezifischen, sondern Zufalls-Primer verwendet wurden. Die mögliche Ursache könnte eine zu geringe Menge an spezifischer RNS und daher eine ineffiziente Rückübersetzung in cDNS gewesen sein. Der Erfolg am gleichen Ausgangsmaterial, das auch in der SMART™ RACE eingesetzt worden war, beweist aber, dass intakte mRNS vorhanden war. Als Ausgangsmaterial diente in beiden Fällen RNS der Tiere 897/04 und 1675/04.

Die DNS des fTRG wurde ausgehend von den verschiedenen Varianten der C-Region amplifiziert. Hierbei blieben verwertbare Banden für fTRGC3 bei 1675/04 aus, sowie für fTRGC5 und -C6 bei 897/04 aus. Ursache hierfür ist vermutlich eine relativ geringe Expression dieser Varianten in der Milz der untersuchten Tiere, so dass die Amplifikation mit der im Vergleich zur normalen RT-PCR weniger spezifischen RACE-Technik nicht gelang. Banden, die mit Primern für fTRGC4 produziert worden waren, enthielten häufig Klone mit neu kombinierten C-Regionen. Beteiligt waren an den Kombinationen fTRGC4 im 3'-Bereich und fTRGC1 oder fTRGC2 im 5'-Bereich des Exon 1.

Da die V-Variante fTRGV4 nur einmal aufgetreten ist, wurde ihren Nachweis mit spezifischen Primern an beiden Tieren durchgeführt. Als Vorwärtsprimer diente ein aufgrund der zu fTRGV4 gehörigen Sequenz des Signalpeptids entwickelter Primer und als Rückwärtsprimer eFTGr3, sowie FTGCr9 als Rückwärtsprimer in der Re-amplifikation. Der Homologie-Primer FTGCr9 wurde verwendet, um alle möglichen

---

Kombinationen von fTRGV4 mit C-Region-Varianten abzudecken. Festgestellt werden konnte aber nur die Kombination mit fTRGJ2.2 und fTRGC5.

Da fTRGC4 für beide Tiere, fTRGC3 für 1675/04 und fTRGC5 sowie -C6 für 897/04 noch nicht in Kombination mit J- und V-Regionen nachgewiesen werden konnten, wurde eine RT-PCR mit den entsprechenden Primern durchgeführt. Die resultierende DNS wurde kloniert und sequenziert. fTRGC3, -C5 und -C6 konnten dabei jeweils nachgewiesen werden. Die mit fTRGC4r2 erzeugte DNS enthielt als C-Region entweder fTRGC1 oder Kombinationen von fTRGC1 und -C4 oder -C2. In einem Fall war fTRGC5 enthalten. Daneben wurden auch in den V-Regionen neue Kombinationen festgestellt. Dies war bei vier Klonen der Fall.

In vitro-Rekombination kann besonders bei der RT-PCR an Multigenfamilien häufig auftreten. In einer Untersuchung eines MHC-Locus wurden 26 % rekombinierte Moleküle nachgewiesen (YU et al., 2006). Im hier vorliegenden Fall spielt es auch eine Rolle, dass fTRGC4 nicht-funktionell relativ häufig vorzukommen scheint, nämlich in Verbindung mit fTRGJP oder als ungespleißte Vorläufer-RNS. Werden nun Rückwärtsprimer eingesetzt, die für fTRGC4 spezifisch sind, zusammen mit Vorwärtsprimern für funktionelle Abschnitte des fTRG, können in homologen Bereichen überlappende DNS-Bruchstücke entstehen, die hybridisieren und dann als ein Strang weiter amplifiziert werden.

Die Sequenz D89023 (CHO et al. 1998) entspricht neu kombinierten Sequenzen aus fTRGC1 und fTRGC4 im eigenen Sequenzmaterial. Die Arbeitsgruppe von CHO et al. (1998) hatte die Primer zur Amplifikation der cDNS des fTRG anhand hoch konservierter Bereiche in der C-Region von Mensch und Maus entwickelt. Obwohl diese Primer sowohl zu fTRGC1 als auch zu fTRGC4 ähnlich homolog sind amplifizierte der Rückwärtsprimer fTRGC4 und der Vorwärtsprimer fTRGC1. Zwischen diesen erfolgte eine Hybridisierung und in-vitro-Rekombination. Beim Versuch, diese kombinierte Sequenz auf Genomebene nachzuweisen, konnte nur die Sequenz von fTRGC4 gefunden werden.

### **5. 1. 2 3'-RACE**

Die 3'-RACE wurde durchgeführt, um auch die C-Region des fTRG komplett zu klonieren und zu sequenzieren. Dabei gelang nur die Amplifikation von fTRGC1 und fTRGC2 problemlos. Bei den anderen Varianten bestand immer das Problem, dass trotz spezifischer Primer fTRGC1 amplifiziert wurde. Diese Region machte bei der 5'-RACE ca. die Hälfte der erhaltenen C-Region Varianten aus. Sie war auch häufig in Material enthalten, das mit Primern erzeugt worden war, die für andere C-Varianten spezifisch sind. Um dieses Problem zu umgehen wurde fTRGC4 ausgehend von fTRGJP sowie der ungespleißten Variante und fTRGC5 ausgehend von fTRGV4 amplifiziert. fTRGC3 und fTRGC6 wurden mit Primern amplifiziert, die Sequenzen im 3'UTR entsprechen.

## **5. 2 Auswertung der Sequenzen**

### **5. 2. 1 Variable Regionen**

Die erhaltenen Sequenzen der einzelnen Regionen wurden aufgrund von Homologie in Varianten und Untergruppen geordnet. Bei den Genen der V-Region wurden dabei vier Varianten festgestellt. Die Bezeichnungen von fTRGV1 bis -V4 wurden in der Reihenfolge der Entdeckung vergeben. Sie stimmen bei fTRGV1 bis -V3 zufällig auch mit den von MOOR et al. (2005) verwendeten Bezeichnungen überein. fTRGV4 war dort nicht aufgetreten.

Da man fTRGV1 bis fTRGV3 aufgrund einer Homologie von über 75 % zu einer Untergruppe zusammenfassen kann, wäre die vollständige vorläufige Bezeichnung nach WHO-Nomenklatur (WILLIAMS et al., 1993): TRGV1S1, TRGV1S2 und TRGV1S3, fTRGV4, müsste man dann als TRGV2S1 bezeichnen. Die endgültigen Bezeichnungen werden vergeben, wenn die Reihenfolge im Locus aufgeklärt ist. Da aber auch schon von MOORE et al. (2005) die anderen Bezeichnungen vergeben worden waren und zu fTRGV1 viele potentielle Subtypen auftraten wich man von dieser Nomenklatur ab. MOORE et al. (2005) hatten 80 % Homologie auf Nukleotidebene als Grenze für die Einteilung in Untergruppen gewählt. Bei den J-Regionen wurde aufgrund der besseren Übersichtlichkeit an Stelle des S in der Bezeichnung ein Punkt gesetzt: also z. B. fTRGJ1.1 statt fTRGJ1S1.

Für fTRGV1 wurde die weitere Einteilung in 15 Subtypen gewählt, da nach Angaben in der Literatur bisher an den Ketten der TRs keine somatische Hypermutation festgestellt werden konnte (HAYDAY et al., 1985; 2000; QUERTERMOUS et al., 1986b; LEFRANC und RABBITS, 1991). Hinzu kommt, dass die von MOOR et al. (2005) gefundenen Subtypen nur in einem Fall mit den eigenen übereinstimmen, so dass noch ca. 10 weitere potentielle Varianten existieren. Einige von ihnen gehen vermutlich auf Amplifikations- oder Sequenzierungsfehler zurück. Inwieweit diese Subtypen tatsächlich existieren und welche davon Allele eines Genes sind, müsste durch Sequenzierung der genomischen DNS der einzelnen Gene oder kompletter BAC-Klone des TRG-Locus der Katze überprüft werden. fTRGV1.6 scheint ein Pseudogen zu sein, da sich an Position 103 der V-Region nach der IMGT-Numerierung (LEFRANC et al., 1999, 2003) ein Stop-Kodon befindet (siehe 9. 7 und 9. 9. 1).

Die funktionellen Bereiche innerhalb der V-Region konnten mit Hilfe der Programme V-Quest und IMGT/Domain GapAlign zugeordnet werden. Probleme ergaben sich lediglich bei der genauen Platzierung des Beginns der V-Region, da in diesem Bereich die Homologie zu den gut beschriebenen Sequenzen zu gering für einen Vergleich ist. Aufgrund der Verhältnisse bei Mensch, Maus, Schaf und Rind wurde für die Sequenz des Signalpeptides eine Länge von 54 Bp bzw. 60 Bp bei fTRGV4 angenommen. Damit das konservierte Cystein an Position 23 gesetzt werden konnte, musste davor eine Lücke eingeführt werden. Aufgrund von Vergleichen der eigenen Sequenzen wurde sie an Position acht für fTRGV1 bis -V3 und an Position 1 für fTRGV4 gesetzt. Alternativ hätte das Signalpeptid um jeweils drei Basenpaare bzw. eine Aminosäure gekürzt werden können.

Im Fall von fTRGV1 und -V3 konnte mit Hilfe der genomischen Sequenzen aus dem Trace-Archiv auch Lage und Länge des Intron in der Sequenz des Signalpeptides festgestellt werden. Das zweite Exon des Signalpeptides ist wie beim Menschen 11 Bp lang. Das Intron hat bei fTRGV1 eine Länge von 95 Bp und bei fTRGV3 von 88 Bp. Das erste Exon des Signalpeptides weist 43 Bp auf. Da das Trace-Archiv der genomischen Sequenzen der Katze noch nicht vollständig ist, sind nicht zu allen gefundenen Genomabschnitten entsprechende Sequenzen im Archiv zu erwarten.

Durch Übersetzung der Nukleotidsequenz in eine Proteinsequenz konnten auch die typischen Sequenzmotive des TcR $\gamma$  (RAST und LITMAN, 1994; ARDEN et al., 1995a, b; HAYDAY, 2000) erkannt werden. Besonders das „IHWY“ am Beginn von Framework Region (FR) 2 und das „YYCA“ am Ende von FR 3. Auch die weiteren konservierten Aminosäuren, Cystein 23 und Leucin 89 (LEFRANC et al., 1999, 2003) sind vorhanden. Die in den genomischen Sequenzen gefundenen 23RSS sind der Konsens-Sequenz (SAKANO et al., 1979, 1980) sehr ähnlich. Sie liegen wie bei den anderen Spezies in 5'-Richtung der V-Regionen.

Bei der Betrachtung von CDR1 und CDR2 wurde festgestellt, dass hier die Schwerpunkte der Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen Varianten liegen. Eine weitere Region mit größeren Abweichungen findet sich in der Mitte von FR3. In CDR1 sind die Unterschiede besonders deutlich zwischen fTRGV4, das hier neun Aminosäuren lang ist und den übrigen Varianten mit fünf Aminosäuren. CDR 2 ist bei fTRGV4 sieben Aminosäuren lang und bei den anderen Varianten acht. Auch bei den Subtypen von fTRGV1 liegt ein Schwerpunkt der Sequenzunterschiede in CDR1 (siehe 9. 9).

Beim phylogenetischen Vergleich mit den als funktionell beschriebenen Sequenzen des Hundes (YAGIHARA et al., 2007) konnten zu beiden Gruppen der felines V-Gene homologe Vertreter gefunden werden. Am größten ist mit 86 % Homologie die Ähnlichkeit von fTRGV4 und cTRGV4. Sie existierten also wahrscheinlich vor der Trennung der Spezies als eigene Varianten. Die Mitglieder der anderen Gruppen sind sich innerhalb der jeweiligen Spezies ähnlicher als im Vergleich mit der anderen Spezies. Dies liegt daran, dass die kaninen Sequenzen cTRGV1 bis V3 untereinander über 80 % Homologie aufweisen und die felines unter 80 %.

Die zu fTRGV4 ähnlichen Varianten aus dem Trace-Archiv fTRGV4.1P, fTRGV4.2P und fTRGV4.3P sind wahrscheinlich Pseudogene. Bei fTRGV4.1P und -V4.2P liegen Mutationen im Bereich der typischen Proteinsequenzmotive vor, und die 23RSS enthalten Cytosin-Thymin-reiche Insertionen. Bei fTRGV4.3P besteht der Bereich oberhalb Base 87 der V-Region aus Cytosin-Thymin- und Adenin-reichen Wiederholungen (siehe 9. 8. 3).

### 5. 2. 3 N-Region

In den nachgewiesenen N-Regionen konnten die Spuren der V(D)J-Rekombination nachvollzogen werden. Es wurden sowohl Basenverluste an beiden Enden als auch zufällig eingefügte Basen gefunden. Daneben wurden sowohl am 3'-Ende der V-Region als auch am 5'-Ende der J-Region palindromische Sequenzen nachgewiesen. Sie entstehen beim unsymmetrischen Auflösen der Haarnadelstruktur während der Rekombination und liegen am Ende des jeweiligen Genes (MA et al., 2002).

Im Fall des längsten gefundenen Palindroms lag dieses jedoch nicht direkt am Ende der J-Region, sondern 4 Bp weiter in 5'-Richtung. Das Ende der betroffenen Region fTRGJ1.2 konnte zweifelsfrei bestimmt werden, da entsprechende genomische Sequenzen im Trace-Archiv vorhanden sind. Durch welchen Mechanismus diese Struktur entstanden ist, ist unklar.

Durch Übersetzung der Sequenzen in Proteinsequenzen wurde die potentielle Produktivität der Ketten überprüft. In der Regel waren 60 – 80 % der einzelnen nachgewiesenen Varianten mit einem intakten offenen Leseraster rekombiniert (siehe 9. 13). Für alle Klone zusammen wiesen 75 % ein intaktes offenes Leseraster auf. Bei drei Klonen fehlte die J-Region vollständig. Eine mögliche Erklärung für den Verlust der J-Region wäre die Entstehung eines alternativen Spleißsignal in der N-Region bei der Rekombination.

In den produktiv rekombinierten Ketten ergeben sich für die CDR3, die von der Base nach dem zweiten konservierten Cystein der V-Region bis zur Base vor dem konservierten Phenylalanin der J-Region reicht (LEFRANC et al., 1999, 2003), Längen von 15 bis 57 Bp. Der Großteil der Sequenzen weist für die CDR3 Längen von 36 bis 48 Bp auf. Diese Werte liegen in der gleichen Größenordnung, wie die für den menschlichen TRG beschriebenen 12 bis 45 Bp (ROCK et al., 1994). Die Katzen-Sequenzen weisen hier nur einige längere Vertreter auf.

## 5. 2. 4 J-Regionen

Im eigenen Sequenzmaterial waren acht J-Region-Varianten enthalten. Aufgrund von Homologien wurden sie in drei Untergruppen gegliedert, wobei fTRGJ1 fünf Mitglieder aufwies, fTRGJ2 zwei und fTRGJ3 eines. fTRGJ1 und -J2 konnten homologen Vertretern beim Hund zugeordnet werden, für fTRGJ3 war dies nicht möglich. In den erstgenannten fanden sich auch typische Sequenzmotive und das konservierte Phenylalanin. Bei fTRGJ3 fehlen die typischen Sequenzmotive sowie das konservierte Phenylalanin. Auch ein Tryptophan an geeigneter Position ist nicht vorhanden. Daher ist es fraglich, ob diese Variante ein funktionelles J-Region-Gen darstellt. Allerdings ist seine RSS der Konsens-Sequenz (SAKANO et al., 1979, 1980) sehr ähnlich.

Die Subtypen aus Untergruppe eins wurden mit den von MOORE et al. (2005) veröffentlichten Proteinsequenzen verglichen. Der dort am häufigsten aufgetretene Vertreter entsprach fTRGJ1.2. fTRGV1.1 konnte nur einmal identifiziert werden (SPL-G15). Zu den übrigen vier dort aufgeführten Varianten konnten im eigenen Material keine Vertreter gefunden werden. Dadurch ist die potentielle Gesamtzahl der Vertreter von Untergruppe eins neun. Auch das müsste durch genomische Sequenzierung überprüft werden.

Die 12RSS der auch genomisch aufgefundenen Variante fTRGJ1.2 ist der Konsens-Sequenz (SAKANO et al., 1979, 1980) sehr ähnlich, bei fTRGJ1.3 ergeben sich dagegen deutliche Abweichungen. Das könnte eine Ursache für eine ineffiziente Rekombination sein (AKAMATSU et al., 1994), was dazu führte, dass fTRGJ1.3 nur einmal nachgewiesen wurde.

Zu Untergruppe zwei wurden im Trace-Archiv zwei weitere Vertreter in Form von fTRGJ2.3 und fTRGJ2.4 gefunden (siehe 9. 8. 4). fTRGJ2.3 ergab sich bei der Suche mit fTRGJ2.2 im Trace-Archiv. Bei dieser Variante ist der Spacer zwischen Heptamer und Nonamer der 12RSS wahrscheinlich nur 10 Bp lang, was eine Ursache für ineffiziente Rekombination sein kann (AKAMATSU et al., 1994). Deswegen konnte es wahrscheinlich nicht im eigenen Sequenzmaterial nachgewiesen werden.

Das Pseudogen fTRGJP ist zu Gruppe 2 der J-Region-Gene zu rechnen (siehe 9. 12. 1). Beim Vergleich mit fTRGJ2.3 konnte festgestellt werden, dass im Bereich des Nonamers der RSS eine 19 Bp lange Deletion vorliegt. Dies macht eine funktionelle Rekombination dieser Variante unmöglich.

#### 5. 2. 4 Konstante Regionen

Bei der Analyse der gewonnen Sequenzen und im Trace-Archiv gefundenen Sequenzen wurden sechs verschiedene Vertreter der konstanten Region identifiziert. Zu allen Varianten und fast allen Exonen konnten auch genomische Vertreter gefunden werden. fTRGC1 bis -C4 bestehen aus vier Exonen, fTRGC5 und -C6 aus drei, wobei Exon 2A fehlt.

Am häufigsten im eigenen Sequenzmaterial aufgetreten war fTRGC1. Die Besonderheit dieser Variante ist der Austausch des konservierten Cystein gegen ein Serin. Diese Mutation war bei beiden bearbeiteten Tieren (1234/02 und 1675/04) sowie bei den Sequenzen aus dem Trace-Archiv vorhanden. Aufgrund dieser Mutation ist die Ausbildung einer Disulfid-Brücke innerhalb der C-Domäne nicht möglich. Allerdings lag fTRGC1 in 78 % der Fälle zusammen mit korrekt rekombinierten V- und J-Genen vor (siehe 9. 13). Wäre diese Kombination nicht funktionell und würde sie das nicht aktive Allel oder einen rekombinierten TRG-Locus in  $\alpha\beta$ -Zellen darstellen, sollten zumindest zwei Drittel oder mehr der Rekombinationsprodukte ein verschobenes Leseraster aufweisen. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass fTRGC1 durch diese Mutation seine Funktion verloren hat. Rein statistisch sind zwei Drittel der Rekombinationen nicht produktiv, da eine Verschiebung des Leserasters auftritt (JUNG et al., 2006). Die tatsächlich nachgewiesenen Zahlen weichen davon ab, da nach der Rekombination eine Selektion der Zellen erfolgt. Die meisten  $\alpha\beta$ -T-Zellen enthalten daher einen nicht produktiv rekombinierten TRG-Locus (HEILIG und TONEGAWA, 1987). Die Zahl von 78 % produktiv rekombinierter TRG-Gene muss also auf einem Selektionsvorgang beruhen. Insgesamt enthalten 75 % der gewonnenen Klone produktive Rekombinationen, was ein deutlicher Hinweis auf die Funktionalität dieser Gene ist.

Bei den übrigen Varianten sind alle konservierten Basen in Exon 1 nachzuweisen. Dieses Exon hat außerdem die gleiche Länge wie bei Mensch und Maus. Beim

Vergleich mit den funktionellen kaninen Sequenzen wurde festgestellt, dass fTRGC6 und cTRGC4 eine relativ hohe Homologie (81 %) aufweisen. Die übrigen Varianten waren innerhalb der jeweiligen Spezies ähnlicher als zwischen Hund und Katze.

In Exon 2B fiel beim Vergleich mit Schaf und Rind auf, dass das Cystein, das für die Ausbildung der Disulfid-Brücke mit der zweiten Kette des TcR $\gamma\delta$  notwendig ist, durch ein Serin bzw. Leucin ersetzt ist. Dieses Cystein fehlt auch bei der C2-Variante des Menschen, die aber dennoch funktionell ist (LEFRANC, et al., 1986; PELICCI et al., 1987a). Durch Vergleiche mit der Proteinsequenz von Schaf und Rind (MARTINEZ-JEAN, 2001, 2002) war es möglich, in Exon 3 die funktionellen Strukturen der transmembranären und intrazytoplasmatischen Abschnitte zu bezeichnen.

In fTRGC6 liegt eine Deletion der Base vor dem Stop-Kodon vor. Dadurch verlängert sich der intrazytoplasmatische Teil um 16 Aminosäuren. Inwieweit das Einfluss auf die Funktionalität des Rezeptors hat und ob diese Deletion auch bei weiteren Individuen vorliegt, muss noch geklärt werden. Allerdings ist die im Trace-Archiv gefundene Variante im kodierenden Bereich identisch. fTRGC6 wurde in der 5'-RACE neunmal nachgewiesen und davon wiesen mit fünf Klonen über die Hälfte ein produktives Leseraster auf. Dies spricht für eine Funktionalität dieser Variante.

Da fTRGC4 in der 5'-RACE auch ungespleißt nachgewiesen wurde, wurde ausgehend vom Intron vor der C-Region eine 3'-RACE durchgeführt und übrigen Exone von fTRGC4 in gespleißtem Zustand amplifiziert. Diese Variante scheint mit derjenigen identisch zu sein, die ausgehend von fTRGJP sequenziert wurde. Außerdem wurde fTRGC4 nur zusammen mit fTRGJ3 nachgewiesen.

Bei der Katze existieren ähnlich wie beim Wiederkäuer mindestens sechs verschiedene Varianten der konstanten Region. Inwieweit diese C-Regionen unterschiedliche Funktionen erfüllen, ist noch nicht untersucht. Eine Hypothese ist jedoch, dass, ähnlich wie für die V-Regionen der Maus beschrieben, zu verschiedenen Zeiten der Embryonalentwicklung unterschiedliche  $\gamma\delta$ -T-Zell-Populationen mit unterschiedlicher Funktion und festem Rezeptor-Repertoire entstehen (HERZIG et al., 2006). Da aufgrund der Klusterbildung bestimmte C-Regionen wahrscheinlicher mit bestimmten V-Regionen kombiniert werden, erscheint dies plausibel. Die genaue Funktion der verschiedenen  $\gamma\delta$ -T-Zell-Populationen muss aber noch aufgeklärt

werden, um hierüber eine genaue Aussage treffen zu können. Interessante Aspekte ergeben sich bei der Katze auch aus der Tatsache, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen an der Beseitigung entzündlicher Infiltrate beteiligt sind, indem sie über FAS-Ligand die Apoptose induzieren (DALTON et al., 2003, 2004). Besonders interessant wäre, ob sie und, wenn ja, welche Rolle sie bei der Pathogenese der Felinen Infektiösen Peritonitis spielen.

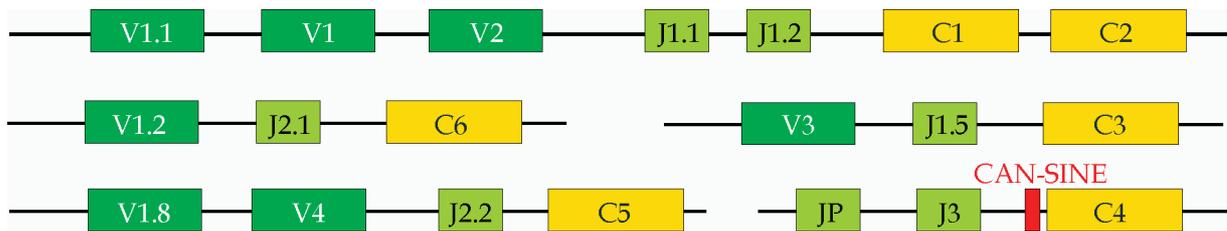
### 5.3 Überlegungen zum felinen TRG-Locus

Legt man zugrunde, dass Rekombinationen vor allem innerhalb von Klustern der TRG-Loci erfolgen (MICCOLI et al., 2003; VACCARELLI et al., 2005; HERZIG et al., 2006) und dass meist die folgende C-Region and das rekombinierte Gen gespleißt wird, kann anhand der Häufigkeit der Kombinationen im Sequenzmaterial eine hypothetische Clusterbildung ermittelt werden. Die von YAGIHARA et al. (2007) ermittelten Kombinationen beim Hund erfolgten zwar häufig zwischen den von ihm beschriebenen Klustern, allerdings ist der TRG-Locus des Hundes noch nicht vollständig aufgeklärt.

**fTRGV1** fand sich am häufigsten mit **fTRGJ1.1** und **fTRGJ1.2**, häufigste mit aufgetretene C-Region war **fTRGC1** sowie **fTRGC2**. Diese Regionen könnten daher in einem Cluster zusammengefasst werden. Bei **fTRGV2** wurde am häufigsten mit **fTRGJ1.2** und **fTRGC2** nachgewiesen, daher ist es möglicherweise ebenfalls Bestandteil des ersten Klusters. **fTRGV2** trat allerdings mit **fTRGC1** nicht auf. **fTRGV1.1** fand man vor allem in Verbindung mit **fTRGJ1.1** und **fTRGC1** und es könnte daher ebenfalls in den ersten Cluster integriert werden. **fTRGV1.2** trat nur mit **fTRGJ2.1** und **fTRGC6** auf. **fTRGC6** fand sich darüber hinaus nur in Verbindung mit **fTRGJ2.1**. Sie könnten daher einen eigenen Cluster bilden. Eine weitere häufige Kombination war **fTRGV3**, -**J1.5** und **fTRGC3**, die ebenfalls einen Cluster bilden könnten. **fTRGC5** wurde hauptsächlich mit **fTRGJ2.2** und **fTRGV4** sowie **fTRGV1.8** festgestellt, was einen weiteren Cluster darstellen würde. **fTRGC4** war mit intaktem Leseraster nur einmal mit **fTRGJ3** aufgetreten. Ansonsten wurde es als ungespleißte vRNS oder in Kombination mit **fTRGJP** nachgewiesen.

Für die übrigen potentiellen V-Regionen ist eine Aussage nicht möglich, da sie zu selten aufgetreten sind. Wie die Kombinationen auf Genomebene letztlich wirklich

aussehen, kann erst nach vollständiger Sequenzierung und Anordnung des kompletten TRG-Locus der Katze beurteilt werden.



**Abbildung 35:** Hypothetische Klusterbildung des TRG-Locus der Katze aufgrund der Häufigkeit der aufgetretenen Kombinationen im cDNS-Sequenzmaterial. **V:** variable Region; **J:** joining Region; **C:** konstante Region; **CAN-SINE:** ein für fleischfresser typisches „short interspersed element“.

## 5. 4      **Ausblick – Einsatz der Sequenzen zur Etablierung eines diagnostischen Systems**

Das Hauptziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Grundlagen zu schaffen, um auch bei der Katze die Diagnostik von Lymphomen und Leukämien mit molekularbiologischen Methoden unterstützen zu können. Entsprechende homologe Stellen innerhalb der vorliegenden Sequenz für degenerierte Homologie-Primer liegen in FR2, FR3 und FR4. Problematisch ist es allerdings, mit dem Rückwärtsprimer in FR4 auch fTRGJ3 zu erfassen. Dies müsste mit einem eigenen Primer erfolgen. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob dieser Typ in Tumoren vorkommt. Insgesamt wäre es interessant zu ermitteln, ob bestimmte Kombinationen der Genvarianten in Tumoren bevorzugt auftreten.

Wenn das diagnostische System spezifischer gestaltet werden soll, müsste man sowohl für FR2 als auch für FR4 gruppen-spezifische Primer verwenden. Am Ende von FR3 ist die Homologie vermutlich für die Verwendung nur eines Primers ausreichend. Um die Diagnostik einfach zu gestalten, sollte überprüft werden, ob die Primer gemeinsam in einem Ansatz als Multiplex-PCR verwendet werden können. Aufgrund der im Vergleich zum Menschen insgesamt etwas längeren CDR3 und der größeren Bandbreite an nachgewiesenen Längen, könnten die Probleme mit der Auflösung in der Elektrophorese geringer sein.

---

Bei Verwendung von Homologie-Primern in FR3 und FR4 wäre das Amplifikat ca. 90 Bp lang, Extremwerte müssten aufgrund der festgestellten Längen der N-Regionen bei 70 bis 110 Bp liegen. Bei Verwendung eines Primers am Beginn von FR2 und in FR4 sind es etwa 270 Bp. Hier wären die Extremwerte 250 bis 290 Bp.

Da auch Klone gefunden wurden, in denen eine J-Region fehlt, sollten Tumoren, die mit den üblichen Primern negativ getestet werden, mit Vorwärtsprimern für FR3 und Rückwärtsprimern für die C-Regionen überprüft werden. Das könnte zum Erfolg führen, wenn die Ursache für den Verlust der J-Region kein alternatives Spleißen sein sollte. Dies müsste dann als RT-PCR erfolgen, was allerdings eine bessere Erhaltung des Gewebes und der RNS erfordert. Entsprechende homologe Abschnitte sind am Beginn von Exon 1 der C-Regionen vorhanden, so dass das Amplifikat nur um ca. 30 Bp länger würde. RNS-Bruchstücke von 100 bis 150 bp sollten auch bei nicht optimaler Erhaltung aus dem Gewebe gewinnbar sein.

Insgesamt ist es möglich, mit den gewonnenen Daten aus den vorliegenden Untersuchungen diagnostische Systeme zu etablieren und zu testen. Zusätzlich bieten sie die Grundlage für weitere Arbeiten zur kompletten Aufklärung des TRG-Locus der Katze und zur Erforschen der Funktion von  $\gamma\delta$ -T-Zellen.

## 6. Zusammenfassung

Lymphome und Leukämien gehören zu den häufigsten Tumoren bei der Katze. Bei der histopathologischen Diagnose solcher lymphatischer Neoplasien steht man immer wieder vor dem Problem, reaktive Lymphozyten von Tumorzellen unterscheiden zu müssen. Da dies manchmal problematisch ist, entwickelte man in der Humanmedizin molekularbiologische Methoden, um die Diagnostik zu unterstützen.

Eine häufig angewendete Technik ist der Nachweis klonal rekombinierter Antigenrezeptorgene mit Hilfe der PCR oder des Southern Blot. Besonders bei Verwendung der PCR ist dies ein schnelles und kostengünstiges Verfahren. Es beruht darauf, dass die Gene der Immunglobuline und der T-Zell-Rezeptoren während der Lymphozytenreifung aus mehreren einzelnen Genen zusammengesetzt werden. Dies bezeichnet man als V(D)J-Rekombination.

Um eine solche Technik auch bei der Katze etablieren zu können, mussten die Gene der Antigenrezeptoren sequenziert werden. Aus ihnen wurde der T-Zell-Rezeptor  $\gamma$  (TRG) zur Bearbeitung gewählt. Mit Hilfe verschiedener RACE-PCR-Techniken konnten für diesen Rezeptor vier verschiedene variable Gene sequenziert werden, die zu zwei Untergruppen zusammengefasst werden können. Bei einem dieser Gene wurden 15 potentielle Subtypen festgestellt. Außerdem konnten acht verschiedene J-Region Gene erfasst werden, die zu drei Untergruppen gehören. Für die konstante Region wurden sechs Varianten nachgewiesen. Die Gengruppen der J-Region-Gene hatten außer fTRGJ $\beta$  homologe Vertreter beim Hund. Die V-Region-Gene sind im Vergleich bis auf eines den caninen Genen weniger ähnlich.

Im nachgewiesenen Sequenzmaterial des TRG der Katze sind ausreichend homologe Bereiche vorhanden, so dass es möglich ist, möglichst wenige Homologie-Primer zu entwickeln und mit ihnen die molekulare Diagnostik an Lymphomen und Leukämien bei der Katze durchzuführen.

## 7. Summary

Lymphomas and leukemias are important tumors of domestic cats. The problem with the histopathological diagnosis of these tumors is sometimes that the neoplastic cell populations can look like reactive cells. To overcome this problem the diagnosis may be supported by molecular techniques.

One of these techniques is the analysis of clonally recombined antigen receptor genes using PCR or southern blotting. Especially the PCR technique is fast and inexpensive. Background for the use of this technique is the assembly of the genes for immunoglobulins and T cell receptors during the development of the lymphocytes. This is called the V(D)J-recombination.

To be able to establish such a technique in the cat we had to sequence the genes of the antigen receptors. As primary target we choose the T cell receptor  $\gamma$ . By using different RACE-techniques we were able to clone and sequence four different V-region genes, which can be combined into two subgroups. One of these genes seems to have at least 15 subtypes. Additionally we found eight J-region genes which can be combined into three subgroups, and six variants of the C-region gene. The subgroups of J-region genes, excluding fTRGJ3, had homologous genes in the dog. The V-region genes are less similar to the canine genome.

These sequences show sufficiently homologous areas which can be used to establish a small number of consensus primers which can be used in the molecular diagnosis of feline lymphomas and leukemias.

## 8. Literaturverzeichnis

- AKAMATSU, Y., TSURUSHITA, N., NAGAWA, F., MATSUOKA, M., OKAZAKI, K., IMAI, M., SAKANO, H., 1994: Essential residues in V(D)J recombination signals. *J. Immunol.* 153: 4520 - 4529.
- ALLISON, J. P., MCINTYRE, B. W., BLOCH, D., 1982 : Tumor specific antigen of murine T lymphoma defined with monoclonal antibody. *J. Immunol.* 129: 2293 - 2300.
- ALLISON, T. J., WINTER, C. C., FOURNIÉ, J.-J., BONNEVILLE, M., GARBOCZI, D. M., 2001: Structure of a human  $\gamma\delta$  T-cell antigen receptor. *Nature* 411: 820 - 824.
- ALLMAN, D., SAMBANDAM, A., KIM, S., MILLER, J. P., PAGAN, A., WELL, D., MERAZ, A., BHANDOOOLA, A., 2003: Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nature Immunol.* 4: 168 - 174.
- ALT, F. A., YANCOPOULOS, G. D., BLACKWELL, T. K., WOOD, C., THOMAS, E., BOSS, M., COFFMAN, R., ROSENBERG, N., TONEGAWA, S., BALTIMORE, D., 1984: Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J.* 3: 1209 - 1219.
- ALT, F. W. UND BALTIMORE, D., 1982: Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: Implications from a chromosome with evidence of three D-J<sub>H</sub> fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 4118 - 4122.
- ALT, F. W., OLTZ, E. M., YOUNG, F., GORMAN, J, TACCIOLI G., CHEN J., 1992: VDJ recombination. *Immunol. Today* 13: 306 - 314.
- ARBER, D. A., 2000: Molecular diagnostic approach to Non-Hodgkin's Lymphoma. *J. Mol. Diagn.* 2: 178 - 190.
- ARDEN, B., CLARK, S. P., KABELITZ, D., MAK, T. W., 1995a: Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42: 455 - 500.
- ARDEN, B., CLARK, S. P., KABELITZ, D., MAK, T. W., 1995b: Mouse T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42: 501 - 530.
- ARNOLD, A., COSSMAN, J., BAKHSHI, A., JAFFE, E. S., WALDMANN, T. A., KORSMEYER, S. J., 1983: Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 309: 1593 - 1599.
- ASARNOW, D. M., GOODMAN, TH., LEFRANCOIS, L., ALLISON, J. P., 1989: Distinct antigen receptor repertoires of two classes of murine epithelium-associated T cells. *Nature* 341: 60 - 62.

- AUBIN, J., DAVI, F., NGUYEN-SALOMON, F., LEBOEUF, D., DEBERT, C., TAHER, M., VALENSI, F., CANIONI, D., BROUSSE, N., VARET, B., FLANDRIN, G., MACINTYRE, E. A., 1995: Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. *Leukemia* 9: 471 - 479.
- AVERY, P. R., AVERY A. C., 2004: Molecular methods to distinguish reactive and neoplastic lymphocyte expansions and their importance in transitional neoplastic states. *Vet. Clin. Path.* 33: 196 - 207.
- BAGG, A., BRAZIEL, R. M., ARBER, D. A., BIJWAARD, K. E., AND CHU, A. Y., 2002: Immunoglobulin heavy chain gene analysis in lymphomas. *J. Mol. Diagn.* 4: 81 - 89.
- BANK, I., DEPINHO, R. A., BRENNER, M. B., CASSIMERIS, J., ALT, F. W., CHESS, L., 1986: A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. *Nature* 322: 179 - 181.
- BEATTY, J. A., CALLANAN, J. J., TERRY, A., JARRETT, O., AND NEIL, J. C., 1998: Molecular and immunophenotypical characterisation of a feline immunodeficiency virus (FIV)-associated lymphoma: a direct role for FIV in B-lymphocyte transformation? *J. Virol.* 72: 767 - 771.
- BERMAN, J. E., MELLIS, S. J., POLLOCK, R., SMITH, C. L., SUH, H., HEINKE, B., KOWAL, C., SURTI, U., CHESS, L., CANTOR, C. R., ALT, F. W., 1988: Content and organization of the human Ig V<sub>H</sub> locus: definition of three new V<sub>H</sub> families and linkage to the Ig C<sub>H</sub> locus. *EMBO J.* 7: 727 - 738.
- BERNARD, O., HOZUMI, N., TONEGAWA, S., 1978: Sequences of mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic changes. *Cell* 15: 1133 - 1144.
- BERTNESS, V., KIRSCH, I., HOLLIS, G., JOHNSON, B., BUNN, P. A., 1985: T-cell receptor gene rearrangements as clinical markers of human T-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 313: 534 - 538.
- BERTONE, E. R., SNYDER, L. A., MOORE, A. S., 2002: Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. *Am. J. Epidemiol.* 156: 268 - 273.
- BILLADEAU, D., BLACKSTADT, M., GREIPP, P., KYLE, R. A., OKEN, M. M., KAY, N., VAN NESS, B., 1991: Analysis of B-Lymphoid malignancies using allele-specific polymerase chain reaction: A technique for sequential quantitation of residual disease. *Blood* 78: 3021 - 3029.
- BLOM, B., SPITS, H., 2006: Development of human lymphoid cells. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 287 - 320.
- BOLLINGER, O., 1874: Über Leukämien bei Hausthieren. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 59: 341 - 349.

- BOMMARDT, U., BEYER, M., HÜNIG, T., REICHARDT, H. M., 2004: Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Mol. Cell. Life Sci.* 61: 263 – 280.
- BORN, W., WHITE, J., KAPPLER, J., MARRACK, P., 1988: Rearrangement of IgH genes in normal thymocyte development. *J. Immunol.* 140: 3228 – 3232.
- BORST, J., VAN DE GRIEND, R. J., VAN OOSTVEEN, J. W., ANG, S.-L., MELIEF, C. J., SEIDMAN, J. G., BOLHUIS, R. L. H., 1987: A T-cell receptor $\gamma$ /CD3 complex found in cloned functional lymphocytes. *Nature* 325: 683 – 688.
- BOTTARO, M., BERTI, E., BIONDI, A., MIGONE, N., CROSTI, L., 1994: Heteroduplex analysis of T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 83: 3271 – 3278.
- BOURGUIN, A., TUNG, R., GALILI, N., AND SKLAR, J., 1990: Rapid, nonradioactive detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8536 – 8540.
- BRADLEY, R. D., HILLIS, D. M., 1997: Recombinant DNA sequences generated by PCR amplification. *Mol. Biol. Evol.* 14: 592 – 593.
- BRADY, S. P., MAGRO, C. M., DIAZ-CANO, S. J. AND WOLFE, H. J., 1999: Analysis of clonality of atypical cutaneous lymphoid infiltrates associated with drug therapy by PCR/DGGE. *Hum. Pathol.* 30: 130 – 136.
- BRANDES, M., WILLIMANN, K., MOSER, B., 2005: Professional antigen-presenting function by human  $\gamma\delta$  T cells. *Science* 309: 264 – 268.
- BRENNER, M. B., MCLEAN, J., DIALYNAS, D. P., STROMINGER, J. L., SMITH, J. A., OWEN, F. L., SEIDMAN, J. G., IP, S., ROSEN, F., KRANGEL, M. S., 1986: Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 322: 145 – 149.
- BRENNER, M. B., MCLEAN, J., SCHEFT, H., RIBERDY, J., ANG, S.-L., SEIDMAN, J. G., DEVLIN, P., KRANGEL, M. S., 1987: Two forms of the T-cell receptor  $\gamma$  protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 325: 689 – 694.
- BRENNER, M. B., STROMINGER, J. L., KRANGEL, M. S., 1988: The  $\gamma\delta$  T cell receptor. *Adv. Immunol.* 43: 133 – 192.
- BRINCKMANN, R., KAUFMANN, O., REINARTZ, B, DIETEL, M., 2000: Specificity of PCR-based clonality analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements for the detection of bone marrow involvement by low-grade B-cell lymphomas. *J. Pathol.* 190: 55 – 60.
- BRISCO, M. J., TAN, L. W., ORSBORN, A. M., MORLEY, A. A., 1990: Development of a highly sensitive assay, based on the polymerase chain reaction, for rare B-lymphocyte clones in a polyclonal population. *Br. J. Haematol.* 75: 163 – 167.

- BURNETT, R. C., VERNAU, W., MODIANO, J. F., OLVER, C. S., MOORE, P. F., AVERY, A. C., 2003: Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet. Pathol.* 40: 32 – 41.
- CALLANAN, J. J., JONES, B. A., IRVINE, J., WILLETT, B. J., MCCANDLISH, I. A. P. AND JARRETT, O., 1996: Histological classification and immunophenotype of lymphosarcomas in cats with naturally and experimentally acquired feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Pathol.* 33: 264 – 272.
- CALLANAN, J. J., MCCANDLISH, I. A. P., O'NEIL, B., LAWRENCE, C. E., RIGBY, M., PACITTI, A. M., JARRETT, O., 1992: Lymphosarcoma in experimentally induced feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Rec.* 130: 293 – 295.
- CARDING, S. R., EGAN, P. J., 2002:  $\gamma\delta$  T cells: Functional plasticity and heterogeneity. *Nature Rev. Immunol.* 2: 336 – 345.
- CASEY, J. W., ROACH, A., MULLINS, J. I., BURCK, K. B., NICOLSON M. O., GARDNER, M. B., DAVIDSON, N., 1981: The U3 portion of feline leukemia virus DNA identifies horizontally acquired proviruses in leukemic cats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 7778 – 7782.
- CHADBURN, A., ATHAN, E., WIECZOREK, R., KNOWLES, D. M., 1991: Detection and characterization of human T-Cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) associated T-cell neoplasms in an HTLV-I nonendemic region by polymerase chain reaction. *Blood* 77: 2419 – 2430.
- CHEN, M., DENG, A., CROWSON, A. N., SRINIVASAN, M., YEARSLEY, K. H., JEWELL, S., MORRISON, C., LONG, S., WERLING, R., MAGRO, C., 2004: Assessment of T-cell clonality via T-cell-dominant infiltrates using polymerase chain reaction and single-stranded DNA conformational polymorphism assay. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 12: 373 – 379.
- CHENCHIK, A., MOQADAM, F. & SIEBERT, P., 1995: Marathon cDNA amplification: A new method for cloning full-length cDNAs. *CLONTECHniques* X(1): 5 – 8.
- CHIEN, Y. H., IWASHIMA, M., KAPLAN, K. B., ELLIOT, J. F., DAVID, M. M., 1987: A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* 327: 677 – 682.
- CHO, K.-W., YOUN, H.-Y., OKUDA, M., SATOH, H., CEVARIO, S., O'BRIEN, S. J., WATARI, T., TSUJIMOTO, H., HASEGAWA, A., 1998: Cloning and mapping of cat (*Felis catus*) immunoglobulin and T-cell receptor genes. *Immunogenetics* 47: 226 – 233.
- CLARK, S. P., ARDEN, B., KABELITZ, D., MAK, T. W., 1995: Comparison of human and mouse T-cell receptor variable gene segment subfamilies. *Immunogenetics* 42: 531 – 540.

- CONRAD, M. L., MAWER, M. A., LEFRANC, M.-P., MCKINNEL, L., WHITEHEAD, J., DAVIS, S. K., PETTMAN, R., KOOP, B. F., 2007: The genomic sequence of the bovine T cell receptor gamma TRG loci and localization of the TRGC5 cassette. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115: 346 – 356.
- COTTER, S. M., HARDY, JR., W. D., ESSEX, M., 1975: Association of feline leukemia virus with lymphosarkoma and other disorders in the cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 166: 449 – 454.
- COURT, E. A., WATSON, A. D. J AND PEASTON, A. E., 1997: Retrospective study of 60 cases of feline lymphosarcoma. *Aust. Vet. J.* 75: 424 – 426.
- COUTO C. G., 2001: What ist new on feline Lymphoma? *J. Feline Med. Surg.* 3: 171 - 176
- CRIGHTON, G. W., 1968: Clinical aspects of lymphosarcoma in the cat. *Vet. Rec.* 82: 122 – 126.
- CRITCHLOW, S. E., BOWATER, R. P., JACKSON S. P., 1997: Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr. Biol.* 7: 588 – 598.
- DALTON, J. E., HOWELL, G., PEARSON, J., SCOTT, P., CARDING, S. R., 2004: Fas-Fas ligand interactions are essential for the binding to and killing of activated macrophages by  $\gamma\delta$  T Cells. *J. Immunol.* 173: 3660 – 3667.
- DALTON, J. E., PEARSON, J., SCOTT, P., CARDING, S. R., 2003: The interaction of  $\gamma\delta$  T cells with activated macrophages is a property of the V $\gamma$ 1 subset. *J. Immunol.* 171: 6488 – 6494.
- DEANE, M., NORTON, J. D., 1990: Immunoglobulin heavy chain variable region family usage is independent of tumor cell phenotype in human B lineage leukemias. *Br. J. Haematol.* 20: 2209 – 2217.
- DEANE, M., NORTON, J. D., 1991: Immunoglobulin gene ‘fingerprinting’: an approach to analysis of B lymphoid clonality in lymphoproliferative disorders. *Br. J. Haematol.* 77: 274 – 281.
- DIK, W. A., PIKE-OVERZET, K., WEERKAMP, F., DE RIDDER, D., DE HAAS, E. F. E., BAERT, M. R. M., VAN DER SPEK, P., KOSTER, E. E. L., REINDERS, M. J. T., VAN DONGEN, J. M. J., LANGERAK, A. W., STAAL, F. J. T., 2005: New insights on human T cell development by qantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J. Exp. Med.* 201: 1715 – 1723.
- DISS, T. C., WATTS, M. PAN, L. X., BURKE, M., LINCH, D., ISAACSON, P. G., 1995: The polymerase chain reaction in the demonstration of monoclonality in T cell lymphomas. *J. Clin. Pathol.* 48: 1045 – 1050.

- DORN, C. R., TAYLOR, D. O. N., SCHNEIDER, R., HIBBARD, H. H., KLAUBER, M. R., 1968: Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J. Nat. Cancer Inst.* 40: 307 - 318.
- DORN, C. R., TAYLOR, D. O. N., HIBBARD, H. H., 1967: Epizootiologic Characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma. *Am. J. Vet. Res.* 28: 993 - 1001.
- DREITZ, M. J., OGILVIE, G., SIM, G. K., 1999: Rearranged T lymphocyte antigen receptor genes as markers of malignant T cells. *Vet. immunol. immunopathol.* 69: 113 - 119.
- DREYER, W. J., BENNETT, J. C., 1965: The molecular basis of antibody formation: A paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54: 964 - 869.
- EDELMAN, G. M. und GALL, W. E., 1969: The antibody problem. *Annu. Rev. Biochem.* 38: 415 - 466.
- ENDO, Y., CHO, K.-W., NISHIGAKI, K., MOMOI, Y., NISHIMURA, Y., MIZUNO, T., GOTO, Y., WATARI, T., TSUJIMOTO, H., HASEGAWA, A., 1997: Molecular characteristics of malignant lymphomas in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 57: 153 - 167.
- ENDO, Y., CHO, K.-W., NISHIGAKI, K., MOMOI, Y., NISHIMURA, Y., MIZUNO, T., GOTO, Y., WATARI, T., TSUJIMOTO, H., HASEGAWA, A., 1998: Clinicopathological and immunological characteristics of six cats with granular lymphocyte tumors. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 21: 27 - 42.
- FALINI, B., FLENGHI, L., PILERI, S., PELICCI, P., FAGIOLI, M., MARTELLI, M. F., MORETTA, L., CICCONE, E., 1989: Distribution of T cells bearing different forms of the T cell receptor gamma/delta in normal and pathological human tissues. *J. Immunol.* 143: 2480 - 2488.
- FERRERO, I., MANCINI, S. J. C., GROSJEAN, F., WILSON, A., OTTEN, L., MACDONALD, H. R., 2006: TCR $\gamma$  silencing during  $\alpha\beta$  T cell development depends upon pre-TCR-induced proliferation. *J. Immunol.* 177: 6038 - 6043.
- FLEISCHMANN, J. B., 1966: Immunoglobulins. *Annu. Rev. Biochem.* 35: 835 - 872.
- FÖDINGER, M., BUCHMAYER, H., SCHWARZINGER, I., SIMONITSCH, I., WINKLER, K., JÄGER, U., KNOBLER, R., MANNAHLTER, C., 1996: Multiplex PCR for rapid detection of T-cell receptor-gamma chain rearrangements in patients with lymphoproliferative diseases. *Br. J. Haematol.* 94: 136 -139.
- FRANCIS, D. P., COTTER, S. M., HARDY, W. D., ESSEX, M., 1979: Comparison of Virus-positive and Virus-negative Cases of Feline Leukemia and Lymphoma. *Cancer Res.* 39: 3866 - 3870.

- FROHMAN, M. A., 1994: On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). PCR Methods Applic. 4: S40 - S58.
- FRY, M. M., MCGAVIN, M. D., 2007: Bone marrow, blood cells, and lymphatic system. In: McGavin M. D., Zachary J. F. (eds.): Pathologic basis of veterinary disease. Mosby, St. Louis, 4<sup>th</sup> ed., S. 743 - 832.
- FUJINO, Y., MA, Z., SATOH, H., MIZUNO, T., HISASUE, M., BABA, K., MASUDA, K., OHNO, K., ONISHI, T., TSUJIMOTO, H., 2004: Charakterization of a newly established nonproducer lymphoma cell line for feline leukemia virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 102: 429 - 439.
- FULTON, R., FORREST, D., MCFARLAN, R., ONIONS, D. AND NEIL, J. C., 1987: Retroviral transduction of T-cell antigen receptor  $\beta$ -chain and myc genes. Nature 326: 190 - 194.
- GABOR, L. J., LOVE, D. N., MALIK, R. AND CANFIELD, P. J., 2001: Feline immunodeficiency virus status of Australian cats with lymphosarcoma. Aust. Vet. J. 79: 540 - 545.
- GALY, A., TRAVIS, M., CEN, D., CHEN, B., 1995: Human T, B, Natural Killer, and Dendritic Cells arise from a common bone marrow progenitor subset. Immunity 3: 459 - 473.
- GEIGERICH, R., MEYER, F., SCHLEIERMACHER, C., 1996: "GeneFisher - software support for the detection of postulated genes" ISMB-96. Proceedings of the Fourth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, AAAI Press (ISSN 57735-002-2).
- GILFILLAN, S., DIERICH, A., LEMEUR, M., BENOIST, C., MATHIS, D., 1993: Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. Science 261: 1175 - 1178.
- GILMORE-HERBERT, M., WALL, R., 1978: Immunoglobulin light chain mRNA is processed from large nuclear RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 342 - 345.
- GIRARDI, M., 2006: Immunosurveillance and immunoregulation by  $\gamma\delta$  T cells. J. Invest. Dermatol. 126: 25 - 31.
- GIUDICELLI, V., CHAUME, D., LEFRANC, M.-P. (2004): IMGT/V-Quest, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. Nuc. Acid. Res. 32: W435 - W440.
- GIUDICELLI, V., LEFRANC, M.-P., 1999: Ontology for immunogenetics: the IMGT-ONTOLOGY. Bioinformatics 15: 1047 - 1054.
- GLUSMAN, G., ROWEN, L., LEE, I., BOYSEN, C., ROACH, J. C., SMIT, A. F. A., WANG, K., KOOP, B. F., HOOD, L., 2001: Comparative genomics of the human and mouse T cell receptor loci. Immunity 15: 337 - 349.

- GOTTLIEB, T. M. UND JACKSON, S. P., 1993: The DNA-dependent protein kinase: Requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 72: 131 – 142.
- GOUDIE, R. B., 1989: A strategy for demonstrating the clonal origin of small numbers of T lymphocytes in histopathological specimens. *J. Pathol.* 158: 261 – 265.
- GOUDIE, R. B., KARIM, S. N., MILLS, K., ALCORN, M. AND LEE, F. D., 1990: A sensitive method of screening for dominant T cell clones by amplification of T cell gamma gene rearrangements with the polymerase chain reaction. *J. Pathol.* 162: 191 – 196.
- GREER, C. E., PETERSON S. L., KIVIAT, N. B. MANOS M. M., 1990: PCR amplification from paraffin-embedded tissues – effects of fixative and fixation time. *Am. J. Clin. Pathol.* 95: 117 – 124.
- GREINER, T. C., RAFFELD, M., LUTZ, C., DICK, F., JAFFE, E. S., 1995: Analysis of T cell receptor- $\gamma$  gene rearrangements by denaturing gradient gel electrophoresis of GC-clamped polymerase chain reaction products. *Am. J. of Pathol.* 146: 46 – 55.
- GRUFFYDD-JONES, T. J., HOPPER, C. D., HARBOUR, D. A., LUTZ, H., 1988: Serological evidence of feline immunodeficiency virus infection in UK cats from 1975 – 76. *Vet. Rec.* 123: 569 – 570.
- HAAS, W., PEREIRA, P., TONEGAWA, S., 1993: Gamma/delta cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 637 – 685.
- HAKS, M. C., LEFEBVRE, J. M., LAURITSEN, J. P., CARLETON, M., RHODES, M., MIYAZAKI, T., KAPPES, D. J., WIEST, D. L., 2005: Attenuation of  $\gamma\delta$ TCR signaling efficiently diverts thymocytes to the  $\alpha\beta$  lineage. *Immunity* 22: 595 – 606.
- HARDY, JR., W. D., 1981: Haematopoietic tumors of cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 17: 921 – 940.
- HARDY, W. D., GEERING, G., OLD, L. J., DE HARVEN, E., BRODEY, R. S. AND MCDONOUGH, S., 1969: Feline leukemia virus: occurrence of viral antigen in the tissues of cats with lymphosarcoma and other diseases. *Science* 166: 1019 – 1021.
- HAYDAY, A. C., 2000:  $\gamma\delta$  Cells: A right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 975 – 1026.
- HAYDAY, A. C., SAITO, H., GILLIES, S. D., KRANZ, D. M., TANIGAWA, G., EISEN, H. N., TONEGAWA, S., 1985: Structure, organization, and somatic rearrangement of T cell gamma genes. *Cell* 40: 259 – 269.
- HAYES, S. M., LI, L., LOVE, P. E., 2005: TCR Signal strength influences  $\alpha\beta/\gamma\delta$  lineage fate. *Immunity* 22: 583 – 593.
- HAYES, S. M., SHORES, E. W., LOVE, P. E., 2003: An architectural perspective on signaling by the pre-,  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell receptors. *Immunol. Rev.* 191: 28 – 37.

- HEDRICK, S. M., COHEN, D. I., NIELSEN, E. A., UND DAVIS, M. M., 1984: Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 308: 149 - 153.
- HEILIG, J. S., TONEGAWA, S., 1987: T-cell  $\gamma$  gene is allelically but not isotypically excluded and is not required in known functional T-cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 8070 - 8074.
- HEIN, W. R., MACKAY, C. R., 1991: Prominence of  $\gamma\delta$  T cells in the ruminant immune system. *Immunol. Today* 12: 30 -34.
- HERZIG, C., BLUMERMAN, S., LERFRANC, M.-P., BALDWIN, C., 2006: Bovine T cell receptor gamma variable and constant genes: combinatorial usage by circulating  $\gamma\delta$  cells. *Immunogenetics* 58: 138 - 151.
- HISASUE, M., NISHIGAKI, K., KATAE, H., YURI, K., MIZUNO, T., FUJINO, Y., SETOGUCHI, A., HASEGAWA, A., WATARI, T., MASUDA, K., OHNO, K., AND TSUJIMOTO, H., 2000: Clonality analysis of various hematopoietic disorders in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 1059 - 1065.
- HOFKER, M. H., WALTER, M. A., COX, D. W., 1989: Complete physical map of the human immunoglobulin heavy chain constant region gene complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 5567 - 5571.
- HOZUMI, N., TONEGAWA, S., 1976: Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 3628 - 3632.
- HUTSON, C. A., RIDEOUT, B. A. PEDERSEN, N. C., 1991: Neoplasia associated with feline immunodeficiency virus infection in cats of Southern California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199: 1357 - 1361.
- ISHIGURO, N., MATSUI, T., SHINAGAWA, M., 1994a: Differentiation analysis of bovine T-lymphosarcoma. *Vet. Immunol. Immunopathol* 41: 1 - 17.
- ISHIGURO, N., SHINAGAWA, T., MATSUI, T., SHINAGAWA, M., 1994b: Putative bovine B cell lineage tumor in sporadic bovine leukosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 42: 185 - 197.
- ITOHARA, S., FARR, A., LAFAILLE, J. J., BONNEVILLE, M., TAKAGAKI, Y., HAAS, W., TONEGAWA, S., 1990: Homing of a  $\gamma\delta$  thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature* 343: 754 - 757.
- ITOHARA, S., NAKANISHI, N., KANAGAWA, O., KUBO, R., TONEGAWA, S., 1989: Monoclonal antibodies specific to native murine T-cell receptor  $\gamma\delta$ : Analysis of  $\gamma\delta$  T cells during thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 5094 - 5098.

- JACKSON, M. L., WOOD, S. L., MISRA, V., AND HAINES, D. M., 1996: Immunohistochemical identification of B and T Lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded feline lymphosarcomas: Relation to feline leukemia virus status, Tumor site, and patient age. *Can. J. Vet. Res.* 60: 199 – 204.
- JACKSON, S. P., 2002: Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23: 687 – 696.
- JARRETT, W. F. H., CRAWFORD, E. M., MARTIN, W. B., DAVIE, F., 1964b: A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarkoma). *Nature* 202: 567 – 568.
- JARRETT, W. F. H., CRIGHTON, G. W. AND DALTON, R. G., 1966: Leukaemia and lymphosarkoma in animals and man I. – lymphosarcoma or leukaemia in the domestic animals. *Vet. Rec.* 79: 693 – 699.
- JARRETT, W. F. H., MARTIN, W. B., CRIGHTON, G. W., DALTON, R. G. STEWART, M. F., 1964a: Transmission experiments with leukaemia (lymphosarkoma). *Nature* 202: 566 – 567.
- JOACHIMS, M. L., CHAIN, J. L., HOOKER, S. W., KNOTT-CRAIG, C. J., THOMPSON, L. F., 2006: Human  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  thymocyte development: TCR gene rearrangements, intracellular TCR $\beta$  expression, and  $\gamma\delta$  developmental potential – differences between men and mice. *J. Immunol.* 176: 1543 – 1552.
- JONES, J. M. UND GELLERT, M., 2002: Ordered assembly of the V(D)J synaptic complex ensures accurate recombination. *EMBO J.* 21: 4162 – 4171.
- JUDO, M. S. B., WEDEL, A. B., WILSON, C., 1998: Stimulation and suppression of PCR-mediated recombination. *Nuc. Acid. Res.* 26: 1819 – 1825.
- JUNG, D. UND ALT, F. W., 2004: Unraveling V(D)J recombination: Insights into gene regulation. *Cell* 116: 299 – 311.
- JUNG, D., GIALLOURAKIS, C., MOSTOSLAVSKY, R., ALT, F. W., 2006: Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 541 – 570.
- KANG, J., COLES, M., CADO, D., RAULET, D. H., 1998 : The developmental fate of T cells is critically influenced by TCR $\gamma\delta$  expression. *Immunity* 8: 427 – 438.
- KÖHLER, K., 2003: Untersuchungen zur Klassifikation maligner Lymphome sowie zur differentiellen Expression von Virusproteinen bei FeLV-positiven malignen Lymphomen der Katze. Fachverlag Köhler
- KOIZUMI, H., LIU, C.-C., ZHENG, L. M., JOAG, S. V., BAYNE, N. K., HOLOSHITZ, J., YOUNG, J. D. E., 1991: Expression of perforin and serin esterases by human  $\gamma/\delta$  T cells. *J. Exp. Med.* 173: 499 – 502.

- KOMORI, T., OKADA, A., STEWART, V., ALT, F. W., 1993: Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* 261: 1171 - 1175.
- KORSMEYER, S. J., ARNOLD, A., BAKHSHI, A., RAVETCH, J. V., SIEBENLIST, U., HIETER, P. A., SHARROW, S. O., LEBIEN, T. W., KERSEY, J. H., POPLACK, D. G., LEDER, P., WALDMANN, T. A., 1983: Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen expression in acute lymphocytic leukemias of T-cell and B-cell precursor origins. *J. Clin. Invest.* 71: 301 - 313.
- KRANGEL, M. S., 2003: Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nature Immunol.* 7: 624 - 630.
- KRANZ, D. M., SAITO, DISTECHE, C. M., SWISSHEIM, K., PRAVTCHEVA, F., RUDEL, F. H., EISEN, H. N., TONEGAWA, S., 1985b: Chromosomal locations of the murine T-cell receptor alpha-chain gene and the T-cell gamma gene. *Science* 227: 941 - 945.
- KRANZ, D. M., SAITO, H., HELLER, M., TAKAGAKI, Y., HAAS, W., EISEN, H. N., TONEGAWA, S., 1985a: Limited diversity of the rearranged T cell gamma ( $\gamma$ ) gene. *Nature* 313: 752 - 755.
- KREUZER, R., 2005: Charakterisierung des genetischen Defektes der GM1-Gangliosidose beim Alaskan Husky. VVB Laufersweiler Verlag, Wettenberg, ISBN 3-89687-426-8.
- LAFAILLE, J. J., DECLOUX, A., BONNEVILLE, M., TAKAGAKI, Y., TONEGAWA, S., 1989: Junctional sequences of T cell receptor  $\gamma\delta$  genes: Implications for  $\gamma\delta$  T cell lineages and for a novel intermediat of V-(D)-J joining. *Cell* 59: 859 - 870.
- LANA, S. E., JACKSON, T. L., BURNETT, R. C., MORLEY, P. S., AVERY, A. C., 2006: Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *J. Vet. Med. Intern. Med.* 20: 329 - 334.
- LANIER, L. L., RUITENBERG, J. J., PHILLIPS, J. H., 1986: Human CD3+ lymphocytes that express neither CD4 nor CD8 antigens. *J. Exp. Med.* 164: 339 - 344.
- LANIER, L. L., RUITENBERG, J., BOLHUIS, R. L. H., BORST, J., PHILLIPS, J. H., TESTI, R., 1988: Structural and serological heterogeneity of  $\gamma\delta$  T cell antigen receptor expression in thymus and peripheral blood. *Eur. J. Immunol* 18: 1985 - 1992.
- LAURITSEN, J. P. H., HAKS, M. C., LEFEBVRE, J. M., KAPPES, D. J., WIEST, D. L. 2006: Recent insights into the signals that control  $\alpha\beta/\gamma\delta$ -lineage fate. *Immunol. Rev.* 209: 176 - 190.
- LEFRANC, M.-P., 1999: The IMGT Unique numbering for immunoglobulins, T-cell receptors, and Ig-like domains. *The Immunologist* 7: 132 - 136.

- LEFRANC, M.-P., 2001: Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Exp. Clin. Immunogenetic* 18: 100 - 116.
- LEFRANC, M.-P., CHUCHANA, P., DARIAVACH, P., NGUYEN, C., HUCK, S., BROCKLY, F., JORDAN, B., LEFRANC, G., 1989: Molecular mapping of the human T cell receptor gamma (TRG) genes and linkage of the variable and constant regions. *Eur. J. Immunol.* 19: 989 - 994.
- LEFRANC, M.-P., FORSTER, A., BAER, R., STINSON, M. A., RABBITS, T. H., 1986b: Diversity and rearrangement of the human T cell rearranging  $\gamma$  genes: Nine germ-line variable genes belonging to two subgroups. *Cell* 45: 237 - 246.
- LEFRANC, M.-P., FORSTER, A., RABBITS, T. H., 1986a: Genetic polymorphism and exon changes of the constant regions of the human T-cell rearranig gene  $\gamma$ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 9596 - 9600.
- LEFRANC, M.-P., GINESTOUX, C., 2006: Locus representation: Mouse (*Mus musculus*) TRG. IMGT Repertoire. IMGT, the international ImMunoGenetics information system® <http://imgt.cines.fr>. Created: 28/05/1997. Last updated: 2006.
- LEFRANC, M.-P., GUIDICELLI, V., KAAS, K., DUPRAT, E., JABADO-MICHALOUD, J., SCAVINER, D., GINESTOUX, C., CLÉMENT, O., CHAUME, D., LEFRANC, G., 2005b: IMGT, the international ImMunoGeneTics information system®. *Nuc. Acids Res.* 33: D593 - D597.
- LEFRANC, M.-P., POMMIÉ, C., RUIZ, M., GUIDICELLI, V., FOULQUIER, E., TRUONG, L., THOUVENIN-CONTET, V., LEFRANC, G., 2003: IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* 27: 55 - 77.
- LEFRANC, M.-P., POMMIÉ, V., KAAS, K., DUPRAT, E., BOSC, N., GUIRAUDOU, D., JEAN, C., RUIZ, M., DA PIÉDADE, I., ROUARD, M., FOULQUIER, E., THOUVENIN, V., LEFRANC, G., 2005a: IMGT unique numbering fur immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* 29: 185 - 203.
- LEFRANC, M.-P., RABBITS, T. H., 1985: Two tandemly organized human genes encoding the T-cell  $\gamma$  constant-region sequences show multiple rearrangement in different T-cell types. *Nature*: 316: 464 - 466.
- LEFRANC, M.-P., RABBITS, T. H., 1991: Genetic organization of the human T cell receptor *gamma* locus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 173: 3 - 9.
- LENNOX, E. S. und COHN, M., 1967: Immunoglobulins. *Annu. Rev. Biochem.* 36: 365 - 406.

- LEVESQUE, K. S., BONHAM, L., LEVY, L. S., 1990: *flvi-1*, a common integration domain of feline leukemia virus in naturally occurring lymphomas of a particular type. J. Virol. 64: 3455 – 3462.
- LEVY, R., WARNKE, R., DOREFMAN, R. F., HAIMOVICH, J., 1977: The monoclonality of human B-cell lymphomas. J. Exp. Med. 145: 1014 – 1028.
- LINKE, B., BOLZ, I., FAYYAZI, A., VON HOFEN, M., POTT, CH., BERTRAM, J., HIDDEMANN, W. AND KNEBA, M., 1997: Automated high resolution PCR fragment analysis for identification of clonally rearranged immunoglobulin heavy chain genes. Leukemia 11: 1055 – 1062.
- LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, J. E. (2000): RNA processing, nuclear transport, and post-transcriptional control. In: LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, J. E., Molecular cell biology, Freeman, New York 4<sup>th</sup> ed., S. 404 – 452.
- LORENZEN, J., HANSMANN, M.-L. UND FISCHER R., 1994a: Klonalitätsnachweis bei lymphoproliferativen Erkrankungen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion. Pathologe 15: 96 – 102.
- LORENZEN, J., JUX, G., ZHAO-HÖHN, M., KLÖCKNER, A., FISCHER, R., AND HANSMANN, M.-L., 1994b: Detection of T-cell clonality in paraffin-embedded tissues. Diagn. Mol. Pathol. 3: 93 – 99.
- LOUWERENS, M., LONDON C., A., PEDERSEN, N. C., LYONS, L. A., 2005: Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. J. Vet. Intern. Med. 19: 329 – 335.
- LYNAS, C., HOWE, D., 1998: Simple, reliable detection of T cell clones by PCR-LIS-SSCP analysis of TCR $\gamma$  rearrangement. Mol. Cell. Probes 12: 41 – 48.
- MA, Y., PANNICKE, U., SCHWARZ, K., LIEBER, M. R., 2002: Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. Cell 108: 781 – 794.
- MACKAY, C. R. UND HEIN, W. R., 1989: A large proportion of bovine T cells express the  $\gamma\delta$  T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. Int. Immunol. 1: 540 – 545.
- MALIK, R., KENDALL, K., CRIDLAND, L., CULSTON, S., STUART, A. J., SNOW, D. AND LOVE, D. N., 1997: Prevalences of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus infections in cats in Sydney. Aust. Vet. J. 75: 323 – 328.
- MARTINEZ-JEAN, C., 2001: Protein display: Bovine (*Bos taurus*) TRGC. IMGT Repertoire. IMGT, the international ImMunoGenetics information system® <http://imgt.cines.fr>. Created: 25/06/2001.

- MARTINEZ-JEAN, C., 2002: Protein display: Sheep (*Ovis aries*) TRGC. IMGT Repertoire. IMGT, the international ImMunoGenetics information system® <http://imgt.cines.fr>. Created: 14/09/2001. Version 01/07/2002.
- MARTINEZ-JEAN, C., 2007: Protein display: Human TRA, TRB, TRG and TRD C-REGIONS. IMGT Repertoire. IMGT, the international ImMunoGenetics information system® <http://imgt.cines.fr>. Created: 14/09/2001. Version: 18/01/2007.
- MARTINEZ-JEAN, C., WU, Y., LEFRANC, M.-P., GINESTOUX, C., 2006 : Gene and allele table: Sheep (*Ovis aries*) TRGC. IMGT Repertoire. IMGT, the international ImMunoGenetics information system® <http://imgt.cines.fr>. Created: 11/06/2001. Version 08/12/2006.
- MATZ, M., SHAGIN, D., BOGDANOVA, O., BRITANOVA, S., LUKYANOV, S., DIATCHENKO, L., CHENCHIK, A., 1999: Amplifikation of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nuc. Acid Res.* 27: 1558 - 1560.
- MCBLANE, J. F., VAN GENT, D. C., RAMSDEN, D. A., ROMEO, C., CUOMO, C. A., GELLERT, M., OETTINGER, M. A. 1995: Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG 1 and RAG 2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83: 387 - 395.
- MCCARTHY, K. P., 1997: Molecular diagnosis of lymphomas and associated diseases. *Cancer Metastasis Rev.* 16: 109 - 125 .
- MCCARTHY, K. P., SLOANE, J. P., KABAROWSKI, J. H. S., MATUTES, E., WIEDEMANN, L. M., 1992: A simplified method of detection of clonal rearrangements of the T-cell receptor- $\gamma$  chain gene. *Diagn. Mol. Pathol.* 1: 173 - 179.
- MCCARTHY, K. P., SLOANE, J. P., WIEDEMANN, L. M., 1990: Repid method for distinguishing clonal from polyclonal B cell populatins in surgical biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.* 43: 429 - 432.
- MCCORMACK, W. T., TJOELKER, L. W., CARLSON, L. M., PETRYNIAK, B., BARTH, C. F., HUMPHRIES, E. H., THOMPSON, C. B., 1989: Chicken Igl gene rearrangement involves deletion of a circular episome and addition of single nonrandom nucleotides to both coding segments. *Cell* 56: 785 - 791.
- MEIER, V. S., RUFLE, A., GUDAT, F., 2001: Simultaneous evaluation of T- and B-cell clonality, t(11; 14) and t(14; 18), in a single reaction by a four color multiplex polymerase chain reaction assay and automated high-resolution fragment analysis. *Am. J. Pathol.* 159: 2031 - 2043.
- MESSIK, J. B., CALDERWOOD MAYS, M. B., 2000: Classification of lymphomas. In FELDMANN, B. F., ZINKL, J. G., JAIN, N. C. (eds.): *Schalm's veterinary hematology*. Lippicott Williams & Wilkins, Baltimore, 5<sup>th</sup> ed., S. 604 - 613.

- MEYERHANS, A., VERTANIAN, J.-P., WAIN-HOBSON, S., 1990: DNA recombination during PCR. *Nuc. Acid. Res.* 18: 1687 – 1691.
- MICCOLI, M. C., ANTONACCI, R., VACCARELLI, G., LANAVE, C., MASSARI, S., CRIBIU, E. P., CICCARESE, S., 2003: Evolution of TRG clusters in cattle and sheep genomes as drawn from the structural analysis of the ovine TRG2@ locus. *J. Mol. Evol.* 57: 52 – 62.
- MIGHELL, A. J., SMITH, N. R., ROBINSON, P. A., MARKHAM, A. F., 2000: Vertebrate pseudogenes. *FEBS Letters* 468: 109 – 114.
- MOMOI, Y., NAGASE, M., OKAMOTO, Y., OKUDA, M., SASAKI, N., WATARI, T., GOITSUKA, R., TSUJIMOTO, H., AND HASEGAWA A., 1993: Rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in canine lymphoma/ leukemia Cells. *J. Vet. Med. Sci.* 55: 775 – 780.
- MOONEY, S. C., PATNAIK, A. K., HAYES, A. A., MACEWEN, E. G., 1987: Generalized lymphadenopathy resembling lymphoma in cats: Six cases (1972 – 1976). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190: 897 – 899.
- MOORE, P. F., WOO, J. C., VERNAU, W., KOSTEN, S., GRAHAM, P. S., 2005: Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106: 167 – 178.
- MÜLHARDT, C., 2002a: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. Auflage, S. 25 – 28.
- MÜLHARDT, C., 2002b: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. Auflage, S. 71 – 104.
- MUNDY, C. L., PATENGE, N., MATTHEWS, A. G. W., OETTINGER, M. A., 2002: Assembly of the RAG1/RAG2 synaptic complex. *Moll. Cell. Biol.* 22: 69 – 77.
- MUNRO, N. J., SNOW, K., KANT, J. A. AND LANDERS, J. P., 1999: Molecular diagnostics on microfabricated electrophoretic devices: From slab gel- to capillary- to microchip-based assay for T- and B-cell lymphoproliferative disorders. *Clin. Chem.* 45: 1906 – 1917.
- MURRE, C., WALDMANN, R. A., MORTON, C. C., BONGIOVANNI, K. F., WALDMANN T. A., SHOWS, T. B., SEIDMAN, J. G., 1985: Human  $\gamma$ -chain genes are rearranged in leukaemic T cells and map to the short arm of chromosome 7. *Nature* 316: 549 – 552.
- NAGAOKA, H., YU, W., NUSSENZWEIG, M. C., 2000: Regulation of RAG expression in developing lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 187 – 190.

- NAKATA, M., SMYTH, M. J., NORIHISA, Y., KAWASAKI, A., SHINKAI, Y., OKUMURA, K., YAGITA, H., 1990: Constitutive expression of pore-forming protein in peripheral blood  $\gamma/\delta$  T cells: Implications for their cytotoxic role in vivo. *J. Exp. Med.* 172: 1877 - 1880.
- NOSSAL, G. J. V., 2003: The double helix and immunology. *Nature* 421: 440 - 443.
- NOWELL, P. C., 1976: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23 - 28.
- OETTINGER, M. A., SCHATZ, D. G., GORKA, C., BALTIMORE, D., 1990: RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248: 1517 - 1523.
- PALLARÈS, N., FOLCH, G., 2002: Protein display: Human TRG V-REGIONs. IMGT Repertoire. IMGT, the international ImMunoGenetics information system® <http://imgt.cines.fr>. Created: 17/10/1997. Version: 01/07/2002.
- PALLARÈS, N., LEFEBVRE, S., CONTET, V., MASUDA, F., LEFRANC, M.-P., 1999: The Human Immunoglobulin Heavy Variable Genes. *Exp. Clin. Immunogenet.* 16: 36 - 60.
- PALLARÈS, N., 1998: Protein display: Human TRG J-REGIONs. IMGT Repertoire. IMGT, the international ImMunoGenetics information system® <http://imgt.cines.fr>. Created: 17/10/1997. Version: 11/06/1998.
- PARDOLL, D. M., FOWLKES, B. J., BLUESTONE, J. A., KRUISBEEK, A., MALOY, W. L., COLIGAN, J. E., SCHWARTZ, R. H., 1987: Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. *Nature* 326: 79 - 81.
- PEDERSEN, N. C., HO, E. W., BROWN, M. L., YAMAMOTO, J. K., 1987: Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* 235: 790 - 793.
- PELICCI, P. G., SUBAR, M., WEISS, A., DELLA-FAVERA, R., LITTMAN, D. R., 1987a: Molecular diversity of the human T-gamma constant region genes. *Science* 237: 1051 - 1055.
- PELICCI, P.-G., ALLAVENA, P., SUBAR, M., RAMBALDI, A., PIRELLI, A., DI BELLO, M., BARBUI, T., KNOWLES, D. M., DALLA-FAVERA, R., MANTOVANI, A., 1987b: T cell receptor ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) gene rearrangement and expression in normal and leukemic large granular lymphocytes/natural killer cells. *Blood* 70: 1500 - 1508.
- POLLARD, P., OWEN, G. AND WORWOOD, M., 1993: PCR-based immunogenotyping at the Ig heavy chain CDR3 locus: improvements in resolution. *Br. J. Haematol.* 84: 169 - 171.

- PONTI, R., QUAGLINO, P., NOVELLI, M., FIERRO, M. T., COMESSATTI, A., PERONI, A., BONELLO, L., BERNENGO, M. G., 2005: T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangement by multiplex polymerase chain reaction/heteroduplex analysis in patients with cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides/Sézary syndrome) and benign inflammatory disease: correlation with clinical, histological and immunophenotypical findings. *Br. J. Dermatol.* 153: 565 - 573.
- PROTAT, C., LEFRANC, M.-P., GINESTOUX, C., 2006: Correspondence between labels for IG and TR domains in IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/LIGM-DB. IMGT scientific chart. IMGT, the international ImMunoGenetics information system® <http://imgt.cines.fr>. Created: 05/10/2004. Version: 06/11/2006
- QUERTERMOUS, TH., MURRE, C., DIALYNAS, D., DUBY, A. C., STROMINGER, J. K., WALDMANN, TH. A., SEIDMAN, J. G., 1986a: Human T-cell  $\gamma$  chain genes: Organization, diversity, and rearrangement. *Science* 231: 252 - 255.
- QUERTERMOUS, TH., STRAUSS, W., MURRE, C., DIALYNAS, D. P., STROMINGER, J. L., SEIDMAN, J. G., 1986b: Human T-cell  $\gamma$  genes contain N segments and have marked junctional variability. *Nature* 322: 184 - 187.
- RAGAINI, L., ASTE, G., CAVICCHIOLI, L., BOARI, A., 2003: Inflammatory bowel disease mimicking alimentary lymphosarkoma in a cat. *Vet. Res. Comm.* 27 Suppl.: 791 - 793.
- RAMASAMY, J., BRISCO, M., MORLEY, A. A., 1992: Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. *J. Pathol.* 45: 770 - 775.
- RAST, J. P., LITMAN, G. W., 1994: T-cell receptor gene homologs are present in the most primitive jawed vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9248 - 9252.
- RAULET, D. H., GARMAN, R. D., SAITO, H. Y., TONEGAWA, S., 1985: Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature* 314: 103 - 107.
- REINACHER, M., 1997: Praxisrelevante Tumoren bei der Katze. *Prakt. Tierarzt, coll. vet.* XXVII; 10 - 12.
- REINACHER, M., THEILEN, G., 1987: Frequency and significance of feline leukemia virus infection in necropsied cats. *Am. J. Vet. Res.* 48: 939 - 945.
- REINACHER, M., WITTMER, G., KOBERSTEIN, H., FAILING K., 1995: Untersuchungen zur Bedeutung der FeLV-Infektion für Erkrankungen bei Sektionskatzen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 108: 58 - 60.
- RES, P., MARTÍNEZ-CÁCERES, E., JALECO, A. C., STAAL, F., NOTEBOOM, E., WEIJER, K., SPITS, H., 1996: CD34<sup>+</sup>C38<sup>dim</sup> cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* 87: 5196 - 5206.

- REZUKE, W. N., ABERNATHY, E. C. AND TSONGALIS, G. J., 1997: Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications. *Clin. Chem.* 43: 1814 - 1823.
- ROCK, E. P., SIBBALD, P. R., DAVIS, M. M., CHIEN, Y.-H., 1994: CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J. Exp. Med.* 179: 323 - 328.
- ROONEY, S., SEKIGUCHI, JA, ZHU, C., CHENG, H.-L., MANIS, J., WHITLOW, S., DEVIO, J., FOY, D., CHAUDHURI, J., LOMBARD, D., ALT, F. W., 2002: Leaky scid phenotype associated with defective V(D)J coding end processing in Artemis-deficient mice. *Mol. Cell* 10: 1379 - 1390.
- ROTHENFLUH, H. S., BLANDEN, R. V., STEELE, E. J., 1995: Evolution of V genes: DNA sequence structure of funktional germline genes and pseudogenes. *Immunogenetics.* 42: 159 - 171.
- RUIZ, M., PALLARÈS, N., CONTET, V., BARBIÉ, V., LEFRANC, M.-P., 1999 : The human immunoglobulin heavy diversity (IGHD) and joining (IGHJ) segments. *Exp. Clin. Immunogenet.* 16: 173 - 184.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A., 1988: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487 - 491.
- SAITO, H., KRANZ, D. M., TAKAGAKI, Y., HAYDAY, A. C., EISEN, H. N., TONEGAWA, S., 1984a: Complete primary strukture of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 309: 757 - 762.
- SAITO, H., KRANZ, D. M., TAKAGAKI, Y., HAYDAY, A. C., EISEN, H. N., TONEGAWA, S., 1984b: A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 312: 36 - 40.
- SAKANO, H., HUPPI, K., HEINRICH, G., TONEGAWA, S., 1979: Sequenzen at the somatic recombination sites of immunoglobulin light chain genes. *Nature* 280: 288 - 294.
- SAKANO, H., MAKI, R., KUROSAWA, Y., ROEDER, W., TONEGAWA, S., 1980: Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin hev-y-chain genes. *Nature* 286: 676 - 683.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D., 2001: Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed., Cold Spring Laboratory Press, 2-234, 1.31 - 1.38.
- SCHATZ, D. G., OETTINGER, M. A., BALTIMORE, D., 1989: The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59: 1035 - 1048.
- SCAVINER, D., 2001: Protein display: Mouse ( *Mus musculus*) TRG J-REGIONS. IMGT Repertoire. IMGT, the international ImMunoGenetics information system® <http://imgt.cines.fr>. Created: 01/03/2001.

- SCHATZ, D. G., SPANOPOULOU, E., 2005: Biochemistry of V(D)J recombination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 290: 49 - 85.
- SCHIBLER, U., MARCU, K. B., PERRY, R. P., 1978 : The synthesis and processing of the messenger RNAs specifying heavy and light chain immunoglobulins in MPC-11 cells. *Cell* 15: 1495 - 1509.
- SCHILLING, J., CLEVINGER, B., DAVIE, J. M., HOOD, L., 1980: Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy chain V-region gene segments. *Nature* 283: 35 -40.
- SEGAL, G. H., WITTEWER, C. T., FISHLEDER, A. J., STOLER, M. H., TUBBS, R. R., KJELDSBERG, C. R., 1992: Identification of monoclonal B-cell populations by rapid cycle polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* 141: 1291 - 1297.
- SHELTON, G. H., MCKIM, K. D., COOLEY, P. L., DICE, P. F., RUSSEL, R. G., GRANT, C. K., 1989: Feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infections in a cat with lymphoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194: 249 - 252.
- SIEDAMGROTZKY, 1871: Lienale lymphatische Leukämie bei einer Katze. *Ber. Vet. Wesen Sachsen* 16: 67.
- SIGNORETTI, S., MURPHY, M., CANGI, M. G., PUDDU, P., KADIN, M. E., LODA, M., 1999: Detection of clonal T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangements in paraffin embedded tissue by polymerase chain reaction and nonradioactive singel-strand conformational polymorphism analysis. *Am. J. Pathol.* 154: 67 - 75.
- SKLAR, J., LONGTINE, J., 1992: The clinical significance of antigen receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasia. *Cancer* 70 (6): 1710 - 1718.
- SPAGNOLO, D. V., ELLIS, D. W., JUNEJA, S., LEONG, A. S-Y., MILIAUSKAS, J., NORRIS, D. L., TURNER, J., 2004: The role of molecular studies in lymphoma diagnosis: a review. *Pathology* 36: 19 - 44.
- STEIN, H., HERBST, H., ANAGNOSTOPOULOS, I., NIEDOBITEK, G., DALLENBACH, F., KRATZSCH, H. C., 1991: The nature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells, their association with EBV, and their relationship to anaplastic larg-cell lymphoma. *Ann. Oncol. Suppl.* 2: 33 - 38.
- STEINHAEUER, D., 2000: Pathologische Befunde bei FIV-infizierten Sektionskatzen. Fachverlag Köhler.
- STROMINGER, J. L., 1989: Developmental biology of T cell receptors. *Science* 244: 943 - 949.
- SUNTZ, M., 2007: Untersuchungen zu Vorkommen und Bedeutung latenter Infektionen mit dem Felinen Leukämievirus (FeLV) bei Sektionskatzen. *Vet. Med. Diss., Gießen.*

- TACCIOLI, G. E., RATHBUN, G., OLTZ, E., STAMATO, T., JEGGO, P. A., ALT, F. W., 1993: Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. *Science* 260: 207 - 210.
- TAMURA, K., YAGIHARA, H., ISOTANI, M., ONO, K., WASHIZU, T., BONKOBARA, M., 2006: Development of the polymerase chain reaction assay based on the canine genome database for detection of monoclonality in B cell lymphoma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110: 163 - 167.
- TERRY, A., CALLANAN, J. J., FULTON, R., JARRETT, O. AND NIEL, J. C., 1995: Molecular analysis of tumors from feline Immunodeficiency virus (FIV)-infected cats: An indirect role for FIV? *Int. J. Cancer* 61: 227 - 232.
- THEODOROU, I., BIGORGNE, C., DELFAU, M.-H., LAHET, C., COCHET, G., VIDAUD, M., RAPHAEL, M., GAULARD, P., FARCET, J.-P., 1996: VJ Rearrangements of the TCR $\gamma$  locus in peripheral T-cell lymphomas: Analysis by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Pathol.* 178: 303 - 310.
- THEODOROU, I., RAPHAËL, M., BIGORGNE, C., FOURCADE, C., LAHET, C., COCHET, G., LEFRANC, M.-P., GAULARD, P., FRACET, J.-P., 1994: Recombination pattern of the TCR $\gamma$  locus in human peripheral T-cell lymphomas. *J. Pathol.* 174: 233 - 242.
- THÉRIAULT, C., GALOIN, S., VALMARY, S., SELVES, J., LAMANT, L., RODA, D., RIGAL-HUGUET, F., BROUSSET, P., DELSOL, G., AL SAATI, T., 2000: PCR analysis of immunoglobulin heavy chain and TcR- $\gamma$  chain gene rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders: results of a Study of 525 cases. *Mod. Pathol.* 13: 1269 - 1279.
- TONEGAWA, S., 1983: Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575 - 581.
- TRAINOR, K. J., BRISCO, M. J., STORY, C. J. AND MORLEY, A. A., 1990: Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA-level. *Blood* 75: 2220 - 2222.
- TSATSANIS, C., FULTON, R., NISHIGAKI, K., TSUJIMOTO, H., LEVY, L., TERRY, A., SPANDIDOS, D., ONIONS, D. AND NEIL, J. C., 1994: Genetic determinants of feline leukemia virus-induced lymphoid tumors: patterns of proviral insertion and gene rearrangements. *J. Virol.* 68: 8296 - 8303.
- VACCARELLI, G., MICCOLI, M. C., LANAVE, C., MASSARI, S., CRIBIU, E. P., CICCARESE, S., 2005: Genomic organization of the sheep TRG1@ locus and comparative analysis of Bovidae and human variable genes. *Gene* 357: 103 - 114.
- VAIL, D. M., MOORE, A. S., OGILVIE, G. K., VOLK, L. M., 1998 : Feline lymphoma (145 Cases) : Proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats. *J. Vet. Intern. Med.* 12: 349 -354.

- VAN DONGEN, J. J. M., WOLVERS-TETTERO, I. L. M., 1991: Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. Clin. Chim. Acta 198: 1 - 92.
- VAN GENT, D. C., MCBLANE, J. F., RAMSDEN, D. A., SADOFSKY, M. J. HESSE, J. E., GELLERT, M. 1995: Initiation of V(D)J recombination in an cell-free system. Cell 81: 925 - 934.
- VERNAU, W., MOORE, P. F., 1999: An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. Vet. Immunol. Immunopathol. 69: 145 - 164.
- VERNOOIJ, B. T. M., LENSTRA, J. A., WANG, K., HOOD, L., 1993: Organization of the murine T-cell receptor  $\gamma$  locus. Genomics 17: 566 - 574.
- WAINSCOAT, J. S. AND FEY, M. F., 1990: Assessment of clonality in human tumors. A review. Cancer Res. 50: 1355 - 1360.
- WALTER, M. A., SURTI, U., HOFKER, M. H., COX, D. W., 1990: The physical organization of the human immunoglobulin heavy chain gene complex. EMBO J. 9: 3303 - 3313.
- WAN, J. H., TRAINOR, K. J., BRISCO, M. J. MORLEY, A. A., 1990: Monoclonality in B cell lymphoma detected in paraffin wax embedded sections using the polymerase chain reaction. J. Clin. Pathol. 43: 880 - 890.
- WERNER, J. A., WOO, J. C., VERNAU, W., GRAHAM, P. S., GRAHN, R. A., LYONS, L. A., MOORE, P. F., 2005: Charakterization of feline immunoglobulin heavy chain variable region genes for the molecular diagnosis of B-cell neoplasia. Vet. Pathol. 42: 596 - 607.
- WILLARD, M. D., 1999: Feline inflammatory bowel disease: A review. J. Feline Med. Surg. 1: 155 - 164.
- WILLIAMS, A. F., STROMINGER, J. L., BELL, J., MAK, T. W., KAPPLER, J., ARDEN, B., LEFRANC, M.-P., HOOD, L., TONEGAWA, S., DAVIS, M. (1993): Nomenclatur for T-cell receptor (TCR) gene segments of the immun system. Bulletin of the WHO 71: 113 - 115.
- WU, F-Y., IJIMA, K., TSUJIMOTO, H., TAMURA, Y., HIGURASHI, M., 1995: Chromosomal translocations in two feline T-cell lymphomas. Leuk. Res. 19: 857 - 860.
- WU, Y., LEFRANC, M.-P., GINESTOUX, C., 2006b: Locus representation: Sheep (*Ovis aries*) TRG. IMGT Repertoire. IMGT, the international ImMunoGenetics information system® <http://imgt.cines.fr>. Created: 19/10/2006.
- WU, Y., LEFRANC, M.-P., GINESTOUX, C., 2006a: Recombination signals of the human IG and TR V, D and J genes. IMGT Repertoire. IMGT, the international ImMunoGenetics information system® <http://imgt.cines.fr>. Created: 15/06/2006.

- YAGIHARA, H., TAMURA, K., ISOTANI, M., ONO, K., WASHIZU, T., BONKOBARA, M., 2007: Genomic organization of the T-cell receptor  $\gamma$  gene and PCR detection of its clonal rearrangement in canine T-cell lymphoma/leukemia. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115: 375 – 382.
- YAMAMOTO, J. K., HANSEN, H., HO, E. W., MORISHITA, T. Y., OKUDA, T., SAWA, T. R., NAKAMURA, R. M., PEDERSEN, N. C., 1989: Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194: 213 – 220.
- YANAGI, Y., YOSHIKAI, Y., LEGETT, K., CLARK, S. P., ALEKSANDER, I., MAK, T. W., 1984: A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* 308: 145 – 149.
- YU, R. C., und ALAIBAC, M., 1996: A rapide polymerase chain reaction-based technique for detecting clonal T-cell ceceptor gene rearrangements in cutaneous T-cell lymphomas of both the  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  varieties. *Diagn. Mol. Pathol.* 5: 121 – 126.
- YU, W., RUSTERHOLTZ, K. J., KRUMMEL, AM. T., LEHMANN, N., 2006: Detection of high levels of recombination generated during PCR amplification of RNA templates. *BioTechniques* 40: 499 – 507.

## 9. Anhang

### 9.1 Verwendete Primer

#### 9.1.1 Sequenz und Position verwendeter Primer

Tabelle 41: Sequenz, Position und Amplifikationsrichtung der verwendeten Primer

Bezeichnung	Basensequenz (5' - 3')	Richtung	Position
<b>Primer, die auf die Sequenz von CHO et al. zurückgehen</b> (Die Positionsangaben beziehen sich auf die Sequenz D89023)			
FeTcRGf1	AAC CTC CAT AAG GCT GGA A	Sense	19 - 37
FeTcRGr1	CCC TGC GG GA TCC A	Antisense	116 - 131
FeTcRGf2	CAA TTG CTG AAG TAA ACC TCC A	Sense	5 - 26
FeTcRGr2	TCC CTG CTG GGA TTC CAG A	Antisense	114 - 132
FeTcRGr3	CCC CTG GAA GTC CAT TTC AGA	Antisense	304 - 324
FTGR4 <sup>1</sup>	GAC CCC TCC TTT ATT AC	Antisense	278 - 296
FeTcRGr5	TGA AGG AAA AAG AAT CTC TTG AT	Antisense	251 - 273
<b>Primer in fTRGC1, Exon 1</b>			
eFTGf1	CAT ATC TTT CTC TTC TTG AGG AT	Sense	85 - 107
eFTGf2	AGG ATG GCA AAA CAA TTC TGA C	Sense	144 - 166
eFTGf3	TCC CTG ATG TTA TCG AGA TAG ATT GG	Sense	112 - 138
eFTGf4	CTC CAT AAG GCT GGA ACA TAT CTT TCT C	Sense	69 - 96
FTGC1f1	ATG TTA TCG AGA TAG ATT GGA AAG AAC	Sense	118 - 144
eFTGr1	ATT GAA GGA AAC AGA ATC TCT TG	Antisense	300 - 322
eFTGr2	CAT TTG TGT TCT TTG CCC ATT GAC TC	Antisense	237 - 262
eFTGr3	GTC AGC CAG GTG TAT TTC ATG TAT GTG	Antisense	200 - 226
eFTGr4	CAT GGT GTT TCC CTG TTG GGA CGT	Antisense	165 - 188
eFTGr5	CTC TTG TTC AAA CCT TCT TTT ATT CTT	Antisense	278 - 305
FTGC1r1	CAT GGT GTT TCC CTG TTG GGA CG	Antisense	166 - 188
<b>Primer in fTRGC2, Exon 1</b>			
eFTGC2f1	GAG GAT TTT TTC CCT GAT GGT ATC AAT G	Sense	102 - 129
FTGC2r1	TGT TTC CCT GCT GGG ATT TCA ATA TTA C	Antisense	156 - 183
<b>Primer in fTRGC3, Exon 1</b>			
eFTGC3f1	GCC CAC GAT TTT TCT TCC TTC AGC	Sense	32 - 55
eFTGC3f2	GAG GAC TTT TAC CCT GAC GTT ATC AC	Sense	102 - 127
FTGC3r1	GTA TGT GTC CTT AGT CTT CAT GGT GTC A	Antisense	179 - 206
<b>Primer für eine weitere vermutete C-Region, Exon 1</b>			
FTGC4f1	TCC CAA GCC CAC AAT TTT TCT TAC TTC A	Sense	26 - 53
FTGC4F1	ACT TCT CCC AAG CCC ACA ATT TTT CTT A	Sense	21 - 48
FTGC4r1	TAT GGA GGT TTA CTT CAG CAA TTG AAG T	Antisense	48 - 76
FTGC4r2	ATG GCG TTT CCC TGC TGG GAT TC	Antisense	165 - 187

<sup>1</sup> Cho et al., 1998

Fortsetzung Tabelle 41: Sequenz, Position und Amplifikationsrichtung der verwendeten Primer

Bezeichnung	Basensequenz (5' - 3')	Richtung	Position
<b>Primer in fTRGC4, Exon 1 und Intron - 1</b>			
FTGC5f1	CGT CCT GTT GAG AAC ATT TCC CCA	Sense	6 - 29
FTGC5f2	TGT CTT CTT GAG GAT TTT TTC CCT GG	Sense	93 - 118
FTGC5r1	GAA AAA TTG TAG GCT TTG GGG AAA TGT T	Antisense	18 - 45
FTGC5r1b	AAA AAT TGT AGG CTT TGG GGA AAT GTT C	Antisense	17 - 44
FTGCr6	CCT GCT GGG ATT CCA GAA TTG TTT	Antisense	154 - 177
FTGIf1	CTG GTA AGC ACT AAT CCT ATG GCA AC	Sense	- 125 -- 100
FTGIf2	CTC TGT TCA GGG CTG CTT CCA AAG	Sense	- 84 -- 61
eFTGr4b	CAT GGT GTT TCC CTG CTG GGA TTTC	Antisense	164 - 188
eFTGr5b	CTC TTG ATC GGC CCC TCC TTT ATT AC	Antisense	279 - 305
<b>Primer in fTRGC5, Exon 1</b>			
FTGC6f1	TTC TTC CTT CAC CTG CTG AAA GAA C	Sense	43 - 67
FTGC6r1	CAG TC TAT GGA GTG TTC TTT CAG CAG G	Antisense	54 - 81
<b>Primer in fTRGC6, Exon1</b>			
FTGC7f1	TCA AGA TAG ACT GGA AAG AAA AGA ACA	Sense	124 - 150
FTGC7r1	CTG CTG GGA TAT CAG AAT TCT TTT GCT G	Antisense	149 - 175
<b>Homologie-Primer für alle Varianten der C-Region</b>			
eFTGCf5	G(AC)T AAA AA(CT) CCT GAT GAA G	Sense	- 1 - 18
FTGCf6	GAT GAA GAC ACT TCT CCC AAG CCC AC	Sense	12 - 47
FTGCr7	GTG GGC TTG GGA GAA GG TCT TC	Antisense	15 - 37
FTGCr8	GGG CTT GGG AGA AGT GTC TTC ATC	Antisense	12 - 35
FTGCr9	AAT CCT CAA GAA GAG AAA GAT ATG TTC C	Antisense	81 - 106
<b>Primer für die cDNS-Synthese</b>			
FTGcDNA1	CGG TCA GCC AGG TCT ATT TC	Antisense	209 - 228
FTGcDNA2	AGG AAG AAA AAT TGT GGG CTT	Antisense	30 - 50
FTGcDNA3	ATC AGG GAA AAA ATC CTC AAG	Antisense	99 - 119
<b>Primer in der V-Region</b>			
eFTGVf1	CAT CCA CTG GTA CCT CCA CCA GGA	Sense	FRW2: 1 - 24
FTGV4f1	CCA GCG AGC CTG AGG ATA CAC A	Sense	FRW3: 61 - 89
FTGV4f2	GGA AAC GAC AGA GGG ATT TGC	Sense	FRW3: 41 - 61
<b>Primer in der Sequenz des Signalpeptid</b>			
FTGLf1	GGA AGC AGA ACC ATG CTG GGT C	Sense	- 12 - 10
FTGLf2	GGA GGT AGA ATC ATG CTG TGT C	Sense	- 12 - 10
FTGLf3	GTA TTC AAC CAC CTC TCC TGA CAA G	Sense	- 35 - - 11
<b>Primer in der 3'-nicht translatierten Region</b>			
FTGI3r1	CCC CAG GGG CCG CCA A	Antisense	972 - 987
FTGI3r2	AAG TTC AGG TAG CAA GGA GGA AG	Antisense	905 - 922
FTGI3r3	CAA AGA TGG CAG CTT CCA GAA	Antisense	1040 - 1062
FTGC5I3r1	GAG CCC CAG GGG ACA TGA C	Antisense	718 - 736

Fortsetzung Tabelle 41: Sequenz, Position und Amplifikationsrichtung der verwendeten Primer

Bezeichnung	Basensequenz (5' - 3')	Richtung	Position
<b>Primer im J-Region-Pseudogen</b> (Positionsangabe ausgehend von C-Region)			
FTGVf1	CTT CCA AGA GAA CTC AGA AG	Sense	-148 – -129
FTGP1f1	GGT CGT GCC GTG AAG CTT AGC	Sense	-100 – -80
FTGP1f2	GTA GAA CCGT CTA ACC AGG CTG GAT C	Sense	-69 – -43
<b>Primer für die klassische RACE</b> (5'/3' RACE Kit, Roche Diagnostics, Mannheim)			
Oligo-dT-Ankerprimer	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CT <sub>(16)</sub> V	cDNA-Synthese	
PCR-Ankerprimer	GAC CAC GCG TAT CGA GT CGA C	Adapterprimer	
<b>Primer für die SMART™ RACE Methode</b> (BD Biosciences, Heidelberg)			
SMART II™	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG	Erststrang Adapter	
UPL	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT	5'-Adapterprimer	
UPS	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG		
UP-nested	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT		
<b>Primer für CapFishing™</b> (BioCat, Heidelberg)			
5'-RACE-Primer	GTC TAC CAG GCA TTC GCT TCA T	5'-Adapterprimer	
<b>Standardprimer für Plasmide, die auf pUC zurückgehen:</b>			
M13f	GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A	Sense	-46
M13r	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	Antisense	-46

V: Adenin, Guanin oder Cytosin; A: Adenin; C: Cytosin; G: Guanin; T: Thymin; f: forward (vorwärts); r: reverse (rückwärts).

## 9.1.2 Verwendete Primerpaare

Tabelle 42: Daten verwendeter Primerpaare für die Anwendung mit *Taq*-Polymerase

Bezeichnung	T <sub>m</sub>	Bezeichnung	T <sub>m</sub>	T <sub>a</sub>	T <sub>p</sub>	t	Größe	Intervall	Template/ Bemerkung
FeTcRGr1	55,0	FeTcRGr1	52,6	45		60	113	-	DNS, 940/02
		FeTcRGr2	59,2	55		60	127	-	DNS, 940/02
		FTGR4	50,4	55		60	231	-	DNS, 940/02
FeTcRGr2	57,8	FeTcRGr2	59,2	55	55	60	128	49 - 59 54 - 60	DNS, 940/02
		FeTcRGr3	59,8		62	60	320	56 - 64	pFTGL7
		FTGR4	50,4	55		60	245	54 - 60	DNS, 940/02
		FeTcRGr5	55,1	59		60	269	50 - 60	DNS, 940/02
eFTGf1	54,7	eFTGr1	56,2		61	15	238	54 - 60 58 - 64	FTGC1
		eFTGr3	64,9	61		15	142	60 - 70	DNS 1234/02
eFTGf2	58,4	eFTGr1	56,2		60	15	179	54 - 60	FTGC1
		eFTGr3	64,9	60		15	83	58 - 66	DNS 1234/02
eFTGf3	62,1	eFTGr2	64,1	61		15	151	58 - 68	DNS 1234/02
		eFTGr3	64,9	64		15	115	58 - 66	DNS 1234/02
		eFTGr5	60,7	62		15	194	60 - 68	DNS 1234/02
		eFTGr5b	65,3	60		15	194	60 - 66	DNS 1234/02
eFTGf4	64,3	eFTGr4	66,9	64		15	120	60 - 68	DNS 1234/02

Fortsetzung Tabelle 42: Daten verwendeter Primerpaare für die Anwendung mit *Taq*-Polymerase.

Bezeichnung	T <sub>m</sub>	Bezeichnung	T <sub>m</sub>	T <sub>a</sub>	T <sub>p</sub>	t	Größe	Intervall	Template/ Bemerkung
<b>Primer für verschiedene Varianten der C-Region</b>									
FTGC1f1		eFTGr3	64,9	58		15	109	58 – 68	3'RACE 9 / s. E.
FTGC2f1	62,3	eFTGr1	56,2	60		15	221	60 – 70	DNS 1234/02
		eFTGr3	64,9	59		15	125	58 – 68	3'RACE 9
FTGC3f1	64,7	eFTGr4b	65,8	62		15	157	60 – 70	DNS 1234/02
		eFTGr3	64,9	64		15	195	58 – 68	3'RACE 9
FTGC3f2	63,7	eFTGr2	64,1			15	161		DNS 1234/02 k. Amp.
		eFTGr3	64,9	66		15	125	60 – 70	DNS 1234/02
FTGC4f1	66,1	eFTGr3	64,9	64		15	201	60 – 70	DNS 940/02
		eFTGr5b	65,3	60		15	280	55 – 65	DNS 1234/02
FTGC4F1	65,9	eFTGr3	64,9	64		15	206	60 – 70	3'RACE 8
FTGC5f1	64,6	FTGCr6	63,2	63		15	172	60 – 70	DNS 940/02
FTGC5f2	63,6	eFTGr3	64,9	62		15	134	58 – 68	3'RACE 8 C5
FTGlf1	64,1	eFTGr3	64,9	66		30	351	60 – 70	DNS 1234/02
FTGlf2	65,7	eFTGr3	64,9		68	30	310	60 – 70	eFTGV17
		FTGC4r2	66,7	64		20	271	60 – 70	DNS 940/02
FTGC6f1	63,3	eFTGr3	64,9	64		15	184	58 – 68	3'RACE 8
FTGC7f1	61,1	eFTGr3	64,9	58		15	103	58 – 68	3'RACE 8 / s. E.
<b>Homologie-Primer für die C-Regionen</b>									
eFTGCf5	45,8	eFTGr3	64,9	52		15	227	46 – 56	DNS 1234/02
FTGCf6	67,8	eFTGr3	64,9	66		15	215	60 – 70	DNS 940/02
		FTGC1r1	65,4	67		15	177	58 – 68	DNS 1234/02
		FTGC2r1	64,7	66		15	172	58 – 68	DNS 1234/02
		FTGC3r1	65,3	67		15	195	58 – 68	DNS 1234/02
		FTGC4r2	66,7	59		15	176	58 – 68	DNS 1234/02
		FTGC6r1	66,6	65		10	70	-	CAPIII Screen.
		FTGC7r1	65,6	67		15	164	58 – 68	DNS 1234/02
FTGCr9	62,0	62		10	95	58 – 68	DNS 1234/02		
<b>Primer für die cDNS-Synthese</b>									
FTGcDNA1	58,8	eFTGf1	54,7	59		15	144	50 – 60	DNS 940/02
FTGcDNA2	56,6	FTGLf1	64,8	50		60	ca. 480	-	PCR54/05.2
FTGcDNA3	54,3	FTGCf6	67,8	50		15	108	-	CAP-II
<b>Primer im J-Region-Pseudogen</b>									
FTGVf1	53,2	FeTcRGr2	59,2	55		30	288	55	5'RACE 5
FTGP1f1	64,8	FeTcRGr3	59,8	>62		30	424	55 – 65	cDNS 1234/02
FTGP1f2	64,7	FTGC4r2	66,7	64		15	256	60 – 70	5'RACE 5
<b>Primer in der V-Region</b>									
eFTGVf1	66,8	eFTGr4	66,9		69	60	ca. 460	62 – 70	SRV.1.c
		eFTGr5b	65,3	62		60	ca. 580	56 – 64	SRV.1.c / s. E.
FTGV4f1	64,9	eFTGr3	64,9	68		30	ca. 340	58 – 68	PCR13/03
FTGV4f2	60,2	eFTGr3	64,9	64		30	ca. 380	58 – 68	PCR13/03

Fortsetzung Tabelle 42: Daten verwendeter Primerpaare für die Anwendung mit *Taq*-Polymerase

Bezeichnung	T <sub>m</sub>	Bezeichnung	T <sub>m</sub>	T <sub>a</sub>	T <sub>p</sub>	t	Größe	Intervall	Template/ Bemerkung
<b>Primer in der Sequenz des Signalpeptids</b>									
FTGLf1	64,8	FTGCr7	64,7	68		60	ca. 450	60 – 70	SRVI
		FTGCr8	65,0	64			ca. 450	58 – 68	CAP-II
		FTGC2r1	64,7	59		60	ca. 600	58 – 68	PCR54/05.2
		FTGC6r1	66,6	68		60	ca. 500	58 – 68	PCR54/05.2
FTGLf2	64,0	FTGCr7	64,7			60	ca. 450	60 – 70	SRVI/ k. Amp.
FTGLf3	63,2	FTGC6r1	66,6	64		60	ca. 520	58 – 68	CAP II
		FTGCr9	62,0		65	60	ca. 480	-	Screening
<b>Primer in der 3'-nicht translatierten Region</b>									
FTGI3r1	62,1	FTGC3f1	64,7	65		60	956	58 – 68	3'RACE 9
		FTGC3f2	63,7	65		60	886	58 – 68	3'RACE 9
		FTGC6f1	63,3	60		60	820	58 – 68	3'RACE 8
		FTGC7f1	61,1			60	739	58 – 68	3'RACE 8 k. Amp.
FTGI3r2	61,2	FTGC3f1	64,7	66		60	1031	58 – 68	3'RACE 9
		FTGC3f2	63,7	65		60	961	58 – 68	3'RACE 9
		FTGC6f1	63,3	59		60	895	52 – 62 58 – 68	3'RACE 8
		FTGC7f1	61,1			60	814	58 – 68	3'RACE 8 k. Amp.
FTGI3r3	59,3	FTGC3f1	64,7			60	1016	58 – 68	3'RACE 9 k. Amp.
		FTGC6f1	63,3			60	880	52 – 62 58 – 68	3'RACE 8 k. Amp.
		FTGC7f1	61,1	56		60	799	52 – 62	3'RACE 8
FTGC5I3r1	61,7	FTGC5f1	64,6			60	731	58 – 68	3'RACE 8 k. Amp
		FTGC5f2	63,6	62		60	644	58 – 68	3'RACE 8
<b>Primer für die klassische RACE</b>									
PCR-Anker- primer	64,0	eFTGf1	54,7		62	60	1040	54 – 60 58 – 64 61 – 71	FTGC1
		FTGC3f2	63,7		69	60		60 – 70	FTGC3.2
<b>Primer für die SMART™ RACE</b>									
UP-nested	60,6	eFTGr2	64,1		62,5	60		61 – 70	eFTGV1
		eFTGr3	64,9		69	60		60 – 70	eFTGV1
		eFTGr4	66,9		69	60		62 – 70	eFTGV1
		eFTGr4b	65,8		68	60		62 – 72	eFTGV1
		FTGCr7	64,7	67,5		60		60 – 70	SRVI
		FTGC1r1	65,4	64		60			
		FTGC2r1	64,7	66		60			
		FTGC3r1	65,3	66		60			
FTGC4r1	63,7	64		60					

Fortsetzung Tabelle 42: Daten verwendeter Primerpaare für die Anwendung mit *Taq*-Polymerase

Bezeichnung	T <sub>m</sub>	Bezeichnung	T <sub>m</sub>	T <sub>a</sub>	T <sub>p</sub>	t	Größe	Intervall	Bemerkung
<b>Primer für die SMART™ RACE</b>									
UP-nested	60,6	FTGC5r1	64,3	66		60		60 – 70	SRVI
		FTGC6r1	66,6	65		60			
		FTGC7r1	65,6	68		60			
<b>Primer für CapFishing™ (BioCat, Heidelberg)</b>									
5'-RACE-Primer	60,0	FTGC1r1	65,4	60		60	ca. 750	58 – 68	CAP II
		FTGC2r1	64,7	59		60	ca. 750		
		FTGC3r1	65,3	60		60	ca. 750		
		FTGC4r1	63,7	62		60	ca. 650		
		FTGC4r2	66,7	64		60	ca. 750		
		FTGC5r1	64,3	61		60	ca. 650		
		FTGC6r1	66,6	60		60	ca. 650		
		FTGC7r1	65,6	60		60	ca. 750		
		FTGCr7	64,7		66	30	ca. 600		
FTGCr8	65,0		65	30	ca. 600				
<b>Standard-Plasmidprimer</b>									
M13f	64,0	M13r	61,0		65	60		60 – 70	pDrive

T<sub>m</sub>: berechnete mittlere Schmelztemperatur; T<sub>a</sub>: an genomischer DNS oder an Erstamplicaten ermittelte optimale Schmelztemperatur des Primerpaares mit *Taq*-Polymerase in °C; T<sub>p</sub>: am Plasmid mit entsprechendem Insert ermittelte optimale Schmelztemperatur des Primerpaares mit *Taq*-Polymerase in °C; t: Amplifikationszeit in Sekunden; Größe: Länge des Amplikon in Bp. Intervall: getestetes Temperaturintervall in °C. s. E.: schlechter Ertrag. k. Amp.: kein Amplifikat

## 9.2 Temperaturbedingungen für die Gradienten-PCR

Tabelle 43: Temperaturbedingungen für die Gradienten-PCR

Temperaturintervall °C	Position auf dem Heizblock											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
46 – 56	46,0	46,3	46,9	47,7	48,8	50,3	52,0	53,4	54,5	55,3	55,8	56,0
49 – 59	49,0	49,3	49,8	50,7	51,8	53,3	55,0	56,4	57,5	58,3	58,8	59,0
50 – 60	50,0	50,3	50,9	51,7	52,8	54,3	56,0	57,4	58,5	59,3	59,8	60,0
52 – 62	52,0	52,3	52,9	53,7	54,8	56,8	58,0	59,4	60,5	61,2	61,8	62,0
54 – 60	54,0	54,2	54,5	54,9	55,7	56,6	57,6	58,3	59,1	59,5	59,9	60,0
55 – 61	55,0	55,2	55,5	56,0	56,7	57,6	58,6	59,4	60,1	60,5	60,9	61,0
55 – 65	55,0	55,3	55,8	56,7	57,8	59,3	61,0	62,4	63,5	64,2	64,8	65,0
56 – 64	56,0	56,2	56,7	57,3	58,3	59,4	60,8	62,0	62,8	63,4	63,8	64,0
58 – 64	58,0	58,2	58,5	59,0	59,7	60,6	61,6	62,4	63,1	63,5	63,9	64,0
58 – 66	58,0	58,2	58,7	59,3	60,3	61,5	62,8	64,0	64,8	65,4	65,8	66,0
58 – 68	58,0	58,3	58,9	59,7	60,9	62,3	64,0	65,4	66,5	67,3	67,8	68,0
60 – 66	60,0	60,2	60,5	61,0	61,7	62,6	63,6	64,5	65,1	65,5	65,9	66,0
60 – 68	60,0	60,2	60,7	61,3	62,3	63,5	64,8	66,0	66,8	67,4	67,8	68,0
60 – 70	60,0	60,3	60,9	61,7	62,9	64,3	66,0	67,5	68,5	69,3	69,8	70,0
61 – 70	61,0	61,3	61,7	62,5	63,5	64,9	66,8	67,7	68,7	69,3	69,8	70,0

Fortsetzung Tabelle 43: Temperaturbedingungen für die Gradienten-PCR

Temperaturintervall °C	Position auf dem Heizblock											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
61 - 71	61,0	61,3	61,8	62,7	63,8	65,3	67,0	68,4	69,5	70,2	70,8	71,0
62 - 70	62,0	62,2	62,7	63,3	64,3	65,5	66,8	68,0	68,8	69,4	69,8	70,0
62 - 72	62,0	62,3	62,9	63,7	64,9	66,3	68,0	69,5	70,5	71,3	71,8	72,0

## 9.3 Verwendete DNS-Längenstandards

### 9.3.1 pUC19/*MspI*

Zur Erzeugung des DNS-Längenstandards pUC19/*MspI* wurde ein zirkuläres Plasmid des Typs pUC19 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers in Library Efficiency® DH5 $\alpha$ ™ Cells (Invitrogen, Karlsruhe) transformiert und über Nacht auf Agarplatten angezchtet. Eine blaue Kolonie wurde in 100 ml LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler bei 200 rpm inkubiert.

Nach dem Abzentrifugieren wurde mit aus dem NucleoSpin® Plasmid übrig gebliebenen Puffern eine alkalische Lyse der Bakterien durchgeführt (siehe 3. 6. 5). Aus dem Überstand fällte man die DNS mit einem Zehntel Volumen

3 M Natriumacetatlösung und dem gleichen Volumen 100 %igem Isopropanol. Das entstandene Pellet wurde luftgetrocknet und mit einer entsprechenden Menge 0,5 × Tris-Puffer rehydriert. Nach der photometrischen Bestimmung der DNS-Konzentration erfolgte der Verdau mit der Restriktionsendonuklease *MspI* (Fermentas St. Leon-Rot) unter Standardbedingungen. Nach Deaktivierung des Enzyms durch Inkubation für 20 Minuten bei 65 °C wurde der Ansatz mit 0,5 × Tris-Puffer auf eine Konzentration von 100 ng/ $\mu$ l eingestellt und mit Ladepuffer versetzt.

### 9.3.2 DNS-Längenstandart MF

Der Längenstandard MF beruht auf dem Plasmid pCR2.1 aus dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Karlsruhe). Hierfür wurde eine blaue Kolonie aus einem Klonierungsversuch zu Übungszwecken verwendet. Die entstehenden Fragmentgrößen wurden anhand der durch den Hersteller angegebenen Sequenz mit dem Programm DNAsis 6.00 bestimmt. Anzucht und Plasmidisolierung erfolgten wie unter

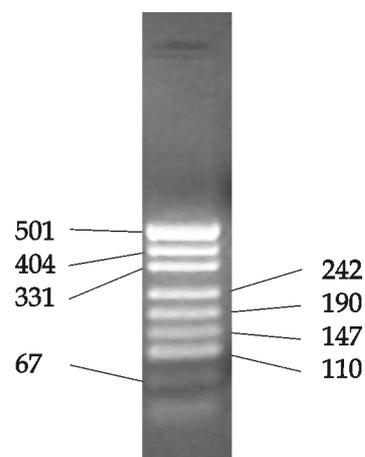
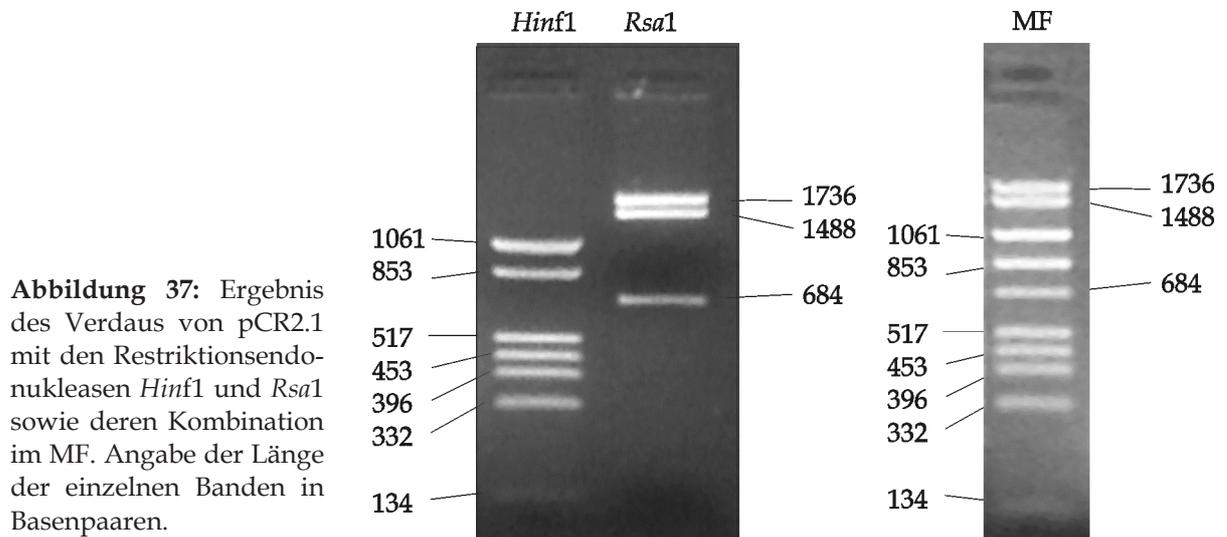
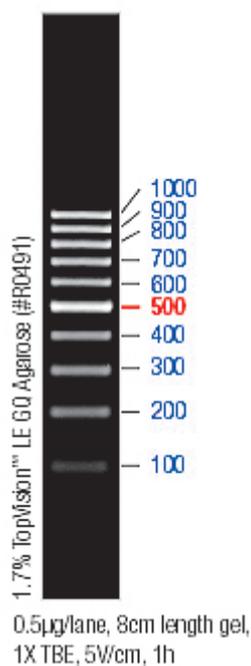


Abbildung 36: pUC19/*MspI* mit Angabe der Länge der verschiedenen Banden in Basenpaaren.

9. 3. 1 angegeben. Von dem isolierten Plasmid wurden 60 % mit der Restriktionsendonuklease *Hinf1* und 40 % mit *Rsa1* unter Standardbedingungen verdaut. Nach Deaktivierung des Enzyms durch Inkubation für 20 Minuten bei 65 °C wurden beide Ansätze gemischt und mit Ladepuffer versetzt.



### 9. 3. 3 Kommerzieller DNS-Längenstandard



**Abbildung 38:** DNS Längenstandard O'GeneRuler™ 100 Bp Ladder (Fermentas, St. Leon-Roth).

## 9.4 Primer und Reaktionsbedingungen für die Kolonie-PCR

Tabelle 44: Reaktionsbedingungen für die Kolonie-PCR

Vorwärts- primer	Rückwärts- primer	T (°C)	T (s)	Z	Größe (Bp)	Bemerkung
M13f	M13r	65	60	30	297	Größenangabe im rezirkulierten Plasmid ohne DNS Fragment.
FeTcRGf2	FeTcRGr2	57	30	35	128	
eFTGf4	eFTGr4	67	15	35	120	
UP-nested	eFTGr4	69	60	35	k. A.	
UP-nested	eFTGr3	69	60	35	k. A.	
eFTGVf1	eFTGr4	63	30	35	ca. 460	
eFTGVf1	eFTGr4b	63	30	35	ca. 460	
eFTGf3	eFTGr2	61	15	35	151	
eFTGVf1	eFTGr3	67	30	35	ca. 500	
UP-nested	FTGCr7	68	30	35	k. A.	
UP-nested	FTGC7r1	68	30	35	k. A.	
FTGLf1	FTGCr7	67	30	35	ca. 450	
5'-RACE- Primer	FTGCr7	65	30	35	ca. 600	
FTGLf1	FTGCr9	65	30	35	ca. 670	
<b>Primersysteme für die Kolonien aus der 3'-RACE</b>						
FeTcRGf1	FTGr4	55	30	35	231	
eFTGf1	eFTGr1	58	30	35	238	
FTGC1f1	eFTGr3	62	15	35	109	
FTGC3f1	eFTGr3	64	15	35	195	
FTGC3f2	FTGI3r2	65	60	35	946	
FTGC5f2	eFTGr3	64	15	35	134	
FTGC5f2	FTGC5I3r1	64	60	35	650	
FTGC6f1	eFTGr3	64	15	35	184	
FTGC7f1	eFTGr3	57	15	35	103	
FTGC7f1	eFTGr3	58	15	35	103	

T: Anlagerungstemperatur; t: Elongationszeit; Z: Zyklenzahl;

## 9.5 Reaktionsbedingungen für die Amplifikation

### 9.5.1 SMART™ RACE

#### 9.5.1.1 Mastermix für die SMART™ RACE

Tabelle 45: Mastermix für die Erstamplifikation bei der SMART™ RACE

Reagenz	Konzentration	Volumen (µl)	Endkonzentration
DEPC-Wasser		27,0	
PCR-Puffer (incl. 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 ×	10,0	
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,5	2,0 mM (insges.)
dNTP	10 mM jew.	1,0	0,2 mM jeweils
UPM	2,5 µM	5,0	0,25 µM
genspezifischer Primer	10 µM	1,0	0,2 µM
Phusion™	2 U/µl	0,5	1,0 U/Ansatz
cDNS		5,0	
<b>Gesamtvolumen</b>		<b>50,0</b>	

Tabelle 46: Mastermix für die Reamplifikation bei der SMART™ RACE

Reagenz	Konzentration	Volumen (µl)	Endkonzentration
DEPC-Wasser		31,0	
PCR-Puffer (incl. 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 ×	10,0	
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,5	2,0 mM (insges.)
dNTP	10 mM jew.	1,0	0,2 mM jeweils
UP-nested	10 µM	1,0	0,2 µM
genspezifischer Primer	10 µM	1,0	0,2 µM
Phusion™	2 U/µl	0,5	1,0 U/Ansatz
cDNS		5,0	
<b>Gesamtvolumen</b>		<b>50,0</b>	

### 9. 5. 1. 2 Amplifikationsbedingungen bei der SMART™ RACE

Tabelle 47: Protokoll für die Amplifikation bei SMART™ RACE III, IV und V

Schritt	Erstamplifikation				Reamplifikation	
	t	T	Modifikationen	Z	T	Z
Anlagern	30	70	- 0,5 °C/ Zyklus	15	70	12
Elongieren	30	72			72	
Anlagern	30	62,5		21	64	24
Elongieren	30	72	+ 2 s/ Zyklus		72	

Nur die Abweichungen vom Standardprotokoll werden aufgeführt. t: Zeit in Sekunden; T: Temperatur in °C; Z: Anzahl der Wiederholungen

Tabelle 48: Reaktionsbedingungen für die Amplifikation bei SMART™ RACE VI

Schritt	Zeit (s)	Temperatur (°C)						Modifikation pro Zyklus
		Erstamplifikation		C1r1		C4r1, C7r1		
		T	Z	T	Z	T	Z	
Anlagern	30	72	16	72	16	72	15	- 0,5 °C
Elongieren	30	72		72		72		
Anlagern	30	64	24	64	28	64,5	28	
Elongieren	30	72		72		72		+ 1 s

Nur die Abweichungen vom Standardprotokoll werden aufgeführt. T: Temperatur in °C; Z: Anzahl der Wiederholungen.

### 9. 5. 2 Reamplifikationen mit FTGLf1

Tabelle 49: Reaktionsbedingungen für die Reamplifikation mit FTGLf1

Schritt	Zeit (s)	Alle Primer		C4r1		C2r1		C6r1 C5r1		C5r1			
		T	Z	T	Z	T	Z	T	Z	T	Z		
PCR		50/04		50/04b		56/04		58/04, 62/04		63/04			
Probe		SRVI										SRVc	
Anlagern	30	70*		65*	12	65*	12	70*	10	65*	12		
Elongieren	30	72		Unverändert									
Anlagern	30	61		59	28	59	30	65	30	59	30		
Elongieren	30	72		Unverändert									

Nur die Abweichungen vom Standardprotokoll werden aufgeführt. \*: - 0,5 °C pro Zyklus; T: Temperatur in °C; Z: Anzahl der Wiederholungen.

### 9. 5. 3 CapFishing™

Tabelle 50: Protokoll für die Erstamplifikation beim CapFishing™

Schritt	Zeit	Temperatur	Modifikationen	Anzahl der Wiederholungen
Denaturierung	30 s	98 °C		1
Schmelzen	10 s	98 °C		20
Anlagern	10 s	72 °C	- 0,1 °C/ Zyklus	
Elongieren	20 s	72 °C		
Schmelzen	10 s	98 °C		25
Anlagern	10 s	69 °C		
Elongieren	20 s	72 °C		
Elongation	5 min.	72 °C		1
Kühlen	∞	4 °C		1

Tabelle 51: Reaktionsbedingungen für die Reamplifikation beim CapFishing™

Schritt	FTGCr9 FTGCr7			FTGC1r1, FTGC2r1, FTGC3r1 FTGC4r1			FTGC4r2 FTGC5r1 FTGC5r1b			FTGC6r1 FTGC7r1		
	t	T	Z	t	T	Z	t	T	Z	t	T	Z
Anlagern	10	72*	12	10	72*	16	10	72*	14	10	72#	10
Anlagern	10	66	10	10	64	10	10	65	10	10	68	10
Schmelzen	5	98	20	5	98	22	5	98	22	5	98	24
Anlagern	10	64		10	62		10	63		10	66	

Nur die Abweichungen vom Standardprotokoll werden aufgeführt. \* - 0,5 °C pro Zyklus; # - 0,4 °C pro Zyklus; t: Zeit in Sekunden; T: Temperatur in °C; Z: Anzahl der Wiederholungen.

### 9. 5. 4 fTRGV4 und zusätzliche Amplifikationen

Tabelle 52: Reaktionsbedingungen für die Amplifikation von fTRGV4 und für die zusätzlichen Amplifikationen

Erstamplifikation und Reamplifikation von fTRGV4				FTGC4r2			FTGC3r1			FTGC6r1 FTGC7r1		
Schritt	t	T	Z	t	T	Z	t	T	Z	t	T	Z
Anlagern	10	72*	16	10	70*	12	10	68*	14	10	71*	14
Anlagern	10	64	10	10	64	25	10	61	15	10	64	15
Anlagern	10	62	22				10	60	10	10	63	10

Nur die Abweichungen vom Standardprotokoll werden aufgeführt. Elongationszeit für Phusion™ 20 Sekunden und für BioTherm™ 30 Sekunden. \* - 0,5 °C pro Zyklus; t: Zeit in Sekunden; T: Temperatur in °C; Z: Anzahl der Wiederholungen..

### 9. 5. 5 3'-RACE

Tabelle 53: Zusammensetzung der Mastermixe für Erstamplifikation der 3'-RACE

Reagenz	Konzentration	Erster Mastermix		Zweiter Mastermix	
		Volumen (µl)	Endkonzentration	Volumen (µl)	Endkonzentration
DEPC-Wasser		16,5		16,75	
PCR-Puffer (incl. 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 ×	5,0		5,0	
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,5	2,5 mM insges.	0,5	2,5 mM
dNTP	10 mM jew.	0,5	0,2 mM jeweils	0,5	0,2 mM
Genspezifischer P.	10 µM	0,25	0,1 µM	1,2	0,24 mM
PCR-Ankerprimer	10 µM	–	0,04 µM	0,8	0,16 mM
Phusion™	2 U/µl	0,25	0,5 U/Ansatz	0,25	1 U insges.
cDNS		2,0			
Gesamtvolumen		25,0		25,0	

#### 9. 5. 5. 1 Reaktionsbedingungen für die 3'-RACE I

Tabelle 54: Reaktionsbedingungen für der Amplifikation bei der 3'-RACE

Schritt	3'-RACE 2			RACE von fTRGJP			3'-RACE 5 FTGC2f1			3'-RACE 8 und 9		
	t	T	Z	t	T	Z	t	T	Z	t	T	Z
Denaturieren	30	98	1	30	98	1	30	98	1	30	98	1
Schmelzen	10	98	10	10	98	10	10	98	10	10	98	20
Anlagern	30	<b>63</b>		30	<b>55</b>		10	<b>50</b>		30	<b>46</b>	
Elongieren	40	72		40	72		30	72		40	72	
Zugabe des zweiten Mastermix.										mit 0,2 µl PCR-Ankerprimer		
Denaturieren	15	98	1	15	98	1	15	98	1	15	98	1
Schmelzen	10	98	35	10	98	12	10	98	16	10	98	12
Anlagern	30	<b>58</b>		30	<b>70*</b>		10	<b>70*</b>		10	<b>70*</b>	
Elongieren	40	72		40	72		30	72		30	72	
Zugabe von:										0,6 µl PCR-Ankerprimer		
Schmelzen				10	98	24	5	98	25	5	98	25
Anlagern				30	<b>64</b>		10	<b>62</b>		10	<b>64</b>	
Elongieren				40	72		30	72		30	72	
Schlusselongation: 72 °C für 300 Sekunden und Kühlen bei 4 °C.												

\* – 0,5 °C pro Zyklus; t: Zeit; T: Temperatur; Z: Anzahl der Wiederholungen..

### 9. 5. 5. 2 Reaktionsbedingungen für die 3'-RACE II

Tabelle 55: Reaktionsbedingungen für die 3'-RACE ab 3'-RACE 8

Schritt	FTGC1f1		FTGC3f1		FTGC5f1		FTGC7f1	
	T	Z	T	Z	T	Z	T	Z
Anlagern	68*	16	72*	10	72*	12	68*	12
Anlagern	60	10	67	10	66	10	62	10
Anlagern	58	20	65	20	64	20	60	20

Nur die Abweichungen vom Standardprotokoll werden aufgeführt. \* - 0,5 °C pro Zyklus; t: Zeit; T: Temperatur; Z: Anzahl der Wiederholungen..

### 9. 5. 5. 3 Reaktionsbedingungen für die 3'-RACE III

Tabelle 56: Weitere Reaktionsbedingungen für die Reamplifikation der 3'-RACE

Schritt	3'-RACE 15 FTGCf6			3'-RACE 15 FTGV4f1		
	t	T	Z	t	T	Z
Anlagern	10	45	20	10	55	20
Zugabe des 2. Mastermix und Denaturierung für 150 Sekunden bei 94 °C						
Anlagern	10	70*	20	10	70*	20
Zugabe von 1 µl PCR-Ankerprimer						
Anlagern	10	60	20	10	60	20
Abschlusselongation für 300 Sekunden bei 72 °C und Kühlen bei 4 °C.						

Nur die Abweichungen vom Standardprotokoll werden aufgeführt. Das Schmelzen erfolgte jeweils für 15 Sekunden bei 92 °C, die Elongation für 80 Sekunden bei 72 °C \* Temperaturreduktion um 0,5 °C pro Zyklus; # - 0,3 °C pro Zyklus; t: Zeit in Sekunden; T: Temperatur in °C; Z: Anzahl der Wiederholungen.

Tabelle 57: Mastermix für 3'-RACE 15

Reagenz	Konzentration	Erster Mastermix		Zweiter Mastermix	
		Volumen (µl)	Endkonzentration	Volumen (µl)	Endkonzentration
DEPC-Wasser		22,15		22,15	
PCR-Puffer (incl. 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	10 ×	3,0		3,0	
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,6	2,0 mM insges.	0,6	2,0 mM
dNTP	10 mM jew.	1,0	0,4 mM jeweils	1,0	0,4 mM
Genspezifischer P.	10 µM	1,0	0,3 µM	2,4	0,36 mM
PCR-Ankerprimer	10 µM	–	0,0 µM	0,6	0,24 mM
BioTherm™	5 U/µl	0,25	1,25 U	0,25	2,5 U
cDNS		2,0		–	
Gesamtvolumen		30,0		30,0	

## 9. 6 Ergebnisse der Nukleinsäureextraktion

Tabelle 58: Konzentration und Reinheit der mit Puregene® extrahierten DNS

Identifikation	Konzentration (ng/µl)	R <sub>260/280</sub>	Extinktion <sub>260</sub>	Verdünnung
1234/02	100,5	1,3	0,01	1 : 200
940/02	510	1,9	0,05	1 : 200

Tabelle 59: Konzentration und Reinheit der mit Purescript® extrahierten gesamt-RNS

Identifikation/Datum*	Konzentration (ng/µl)	R <sub>260/280</sub>	Extinktion <sub>260</sub>	Verdünnung
315/04 (30. 8. 03)	900	1,6	0,113	1 : 200
902/03 (28. 10. 03)	1800	1,7	0,23	1 : 200
1234/02 (28. 10. 03)	1000	1,7	0,12	1 : 200
1658/03 (28. 10. 03)	1000	1,7	0,12	1 : 200
Abessinier (10. 12. 03)	750	1,5	0,09	1 : 200
940/02 (24. 2. 04)	800	1,7	0,103	1 : 200
897/04 Milz (3. 7. 04)	950	1,6	0,119	1 : 200
897/04 Thymus (3. 7. 04)	700	1,8	0,088	1 : 200
1675/04 Blut (23. 5. 05)	650	1,6	0,080	1 : 200
1675/04 Milz (23. 5. 05)	700	1,5	0,087	1 : 200
1675/04 Milz (24. 11. 05)	860	1,6	0,22	1 : 100
897/04 Milz (21. 12. 05)	720	1,9	0,18	1 : 100
1675/04 Milz (8. 8. 06)	1200	1,8	0,31	1 : 100
1448/04 Milz (19. 9. 06)	1100	1,6	0,28	1 : 100

\* Tag der Extraktion.

## 9.7 Erzeugte Klone

Tabelle 60: : Liste der sequenzierten Klone mit Zugangsnummer bei GeneBank

Bezeichnung	Identität			Zugangsnummer	Produktivität	Herkunft	Bemerkung	
	V	J	C					
<b>Klassische 5'-RACE</b>								
pFTGII.136	–	P	4	AM502844	J-Region-Pseudogen	315/03	Über 99% homolog.	
pFTGII.159	–	P	4	AM502843				
pFTGII.163*	–	P	4	AM502842				
pFTGII.164*	–	P	4	AM502839				
pFTGII.169	–	P	4	–				
pFTGIII.2	–	P	4	AM502845	902/03	Identisch zu pFTGII		
pFTGIII.3*	–	–	4	AM502840	vRNS			
<b>SMART™ RACE III und IV</b>								
FTGV1	–	–	4	AM502846	vRNS	1234/02	Über 99 % homolog .	
FTGV2	–	–	4	AM502837	vRNS			
FTGV17	–	–	4	AM502838	vRNS			
FTG1	1	1.1	1	–	✓			Über 99% Homologie, bis auf N-Region.
FTG3	1	1.1	1	–	✓			
FTG4	–	–	1	–	vRNS			
fTG23	1	1.1	1	–	✓	897/04 Milz	100 % Homologie in V-Region, auch zu FTG.	
fTG34	1	1.4	1	–	–			
<b>SMART™ RACE V und VI</b>								
fTGII.1	1	1.1	1	–	✓	897/04 Thymus	Inverse Wiederholung von fTRGJ2.4! 100 % Homologie in V-Region, auch zu FTG und fTG.	
fTGII.2*	1	2.4	1	AM747390	LR o.b.B			
fTGII.4	1	1.1	1	–	–			
fTGII.5	1	1.2	1	–	–			
fTRGIII.2	1	1.2	1	–	–			Ab.
fTRGIII.7	1	1.2	1	–	✓			
VJC1.3	1	1.1	1	–	–	1675/04	V-Anteil sehr kurz	
VJC1.8	1	1.1	1	–	✓			
VJC4b.2	1	1.1	1	–	✓			Weitgehend homolog zu den obigen.
VJC4b.5	1	1.1	1	–	✓			
VJC4b.7	1	1.1	1	–	✓			V-Anteil sehr kurz
VJC7.1	1.2	2.1	6	AM746408	–			18 Bp der V-Region fehlen, >99% homolog.
VJC7.2	1.2	2.1	6	–	–			
VJC7.6	1.2	2.1	6	–	–			V-Anteil sehr kurz.

\* doppelt sequenziert; \*\* dreifach sequenziert; vRNS: ungespleißte Vorläufer RNS; LR o. b. B.: Leseraster intakt. Ab.: Abessinier; Stop: Stop-Kodon in V-Region; IR: in vitro-Rekombination.

Fortsetzung Tabelle 60: Liste der sequenzierten Klone mit Zugangsnummer

Bezeichnung	Identität			Zugangsnummer	Produktivität	Herkunft	Bemerkung
	V	J	C				
<b>Weitere Amplifikationen</b>							
PCR57.2.4	1	1.1	1	AM746398	✓	Ab.	
PCR57.2.13	1.1	1.1	1	AM746404	✓		
PCR57.3.3	3	1.5	3	AM746440	–	897/04	
PCR57.3.6	2	–	2	AM746426	LR o.b.B.		Keine J-Region enthalten!
PCR57.3.12	3	1.5	3	AM746441	–		
PCR57.3.21	2	1.2	2	AM746427	✓		
PCR57.3.22	1	1.2	2	AM746374	✓		
PCR57.3.23	2	–	2	AM746428	LR o.b.B.		Keine J-Region enthalten!
PCR57.3.30	2	1.2	2	AM746429	✓		
VJC4.4	1	1.1	1	–	✓		
VJC4.5	1	1.1	1	–	✓		
VJC4.6	1	1.1	1/4	–	✓		1234/02
21.83	1	1.1	1/4	AM746373	✓	100%ig identisch	
21.84	1	1.1	1/4	–	✓		
21.87	1	1.1	1/4	–	✓		
50.10	1.1	1.1	1	AM746372	✓	1675/04	
50.11	1.1	1.1	1	AM746399	✓		
50.14	1.1	1.1	1	AM746400	✓		
50.15	1.1	1.1	1	AM746401	✓		
52.2	1.1	1.1	1	AM746402	✓	1675/04	
52.7	1.1	1.1	1	AM746403	✓		
58.15	1	1.2	2	AM746375	✓		
62.1	1.8	2.2	5	AM746415	–		
62.2	1.8	2.2	5	AM746416	–		
62.3*	1.4	3	4	AM746410	LR o.b.B.	897/04	
62.4	1.8	2.2	5	AM746417	–	1675/04	
62.5	1.8	2.2	5	AM746418	–		
62.6*	3	3	4	AM489520	–	897/04	
<b>CapFishing™ II</b>							
C1C9.1	1	1.1	1	AM746380	–	1675/04	
C1C9.2*	3/2	1.2	2/1	AM746455	LR o.b.B.		V und C: IR
C1C9.4*	1	1.1	1	AM746381	✓		
C1C9.6	1	1.1	1	AM746382	✓		
C1C1.2	1.6	1.1	1	AM746413	Stop		
C1C1.3	1	1.1	1	AM746376	✓		
C1C4.1	1	1.1	1	AM746377	✓		
C1C4.2	1	1.1	1	AM746378	✓		

\* doppelt sequenziert; \*\* dreifach sequenziert; vRNS: ungespleißte Vorläufer RNS; LR o. b. B.: Leseraster intakt. Ab.: Abessinier; Stop: Stop-Kodon in V-Region; IR: in vitro-Rekombination.

Fortsetzung Tabelle 60: Liste der sequenzierten Klone mit Zugangsnummer

Bezeichnung	Identität			Zugangsnummer	Produktivität	Herkunft	Bemerkung
	V	J	C				
<b>Fortsetzung CapFishing™ II</b>							
C1C4.3*	1.9	1.2	1	AM746419	✓	1675/04	
C1C4.4	1	1.1	1	AM746379	✓		
C1C26.1	2	1.2	2	AM489518	–		
C1C26.2	2	1.2	2	AM746432	–		
C1C367.1	2	2.1	5	AM746433	✓		
C1C367.2	1.2	2.1	6	AM489516	✓		
C1C367.3*	4	2.2	5	AM489508	✓		
C1C24.1*	1.2	2.1	6	AM746407	✓		
C1C23.19	2	1.2	2	AM746430	✓		
C1C23.20*	3	1.5	1	AM489519	✓		
C1C23.21*	1	1.1	1/4	AM746383	–		C: IR; durch FTGC3r1 amplifiziert
C1C23.22	2	1.2	2	AM746431	–		
C1C23.23*	1	1.1	1/2	AM489517	✓		C: IR; durch FTGC3r1 amplifiziert
C1C467.1*	1.1	2.2	5	AM489515	✓		frame shift in C-Region
C1C467.8*	1.5	1.2	1/4	AM746411	–		C: IR
C1C467.10*	1.3	2.1	6	AM746409	✓		
C1C467.15*	2	1.2	2/4	AM746434	✓	C: IR	
C1C467.20	2/3	–	–	AM746456	k. A.	V: IR	
C1C467.21*	1.11	2.1	6	AM746421	✓		
C1C467.29	2/1	1.1	1/4	AM746457	LR o.b.B	V und C: IR	
<b>CapFishing™ III</b>							
C2C1.1	2	1.2	2	AM746435	–	897/04	
C2C1.2	2	1.2	2	AM746436	✓		
C2C1.3	1	1.2	2	AM746385	–		
C2C2.1	1	1.2	1	AM746386	✓		
C2C2.2	1.5	1.2	1	AM746412	✓		
C2C2.3	1	1.1	1	AM746387	✓		
C2C3.1	1	1.2	3	AM746388	✓		
C2C3.2	1	1.1	1	AM746389	–		
C2C3.3	2	1.2	2	AM746437	✓		
C2C4.1	1	1.1	1/4	AM746390	Stop		897/04
C2C4.3*	2	1.4	2/4	AM746438	✓		C: IR
C2C4.4	1.14	1.1	1/4	AM746424	✓		C: IR
C2C4.5*	1.13	1.3	5/4	AM746423	✓		C: IR
C2C4.6	1.10	1.2	1/4	AM746420	✓		C: IR
C2C4.7	2	1.2	2/4	AM746439	✓		C: IR

\* doppelt sequenziert; \*\* dreifach sequenziert; vRNS: ungespleißte Vorläufer RNS; LR o. b. B.: Leseraster intakt. Ab.: Abessinier; Stop: Stop-Kodon in V-Region; IR: in vitro-Rekombination.

Fortsetzung Tabelle 60: Liste der sequenzierten Klone mit Zugangsnummer

Bezeichnung	Identität			Zugangsnummer	Produktivität	Herkunft	Bemerkung	
	V	J	C					
<b>Amplifikation noch fehlender Varianten</b>								
V4.1.1	4	2.2	5	AM746448	Stop	897/04	Alle bis auf die N-Region identisch. Auch identisch zu C1C367.3.	
V4.1.2	4	2.2	5	AM746449	Stop			
V4.1.3	4	2.2	5	AM746450	✓			
V4.1.4	4	2.2	5	AM746451	✓			
V4.2.1	4	2.2	5	AM746452	✓			1675/04
V4.2.2	4	2.2	5	AM746453	✓			
V4.2.3	4	2.2	5	AM746454	✓			
C5V1.2*	1/2	1.2	2	AM746458	–	897/04	V: IR	
C5V1.3	1	1.1	1/4	AM746391	✓			
C5V1.4	1	1.2	1	AM746392	✓			
C5V1.5	1	1.2	1/4	AM746393	–			
C5V1.6	1	1.2	1	AM746394	✓			
C5V2.2*	3	1.5	5/2	AM746445	✓			1675/04
C5V2.3	2	1.2	2	AM746425	–			
C5V2.4	1	–	1	AM746395	–			
C5V2.5	1	1.1	1/2	AM746396	✓			
C5V2.6*	3	1.5	1	AM746446	✓			
C3V.1	3	1.5	3	AM746443	✓			
C3V.2	3	1.5	3	AM746444	✓			
C6V.1	1.7	2.2	5	AM746414	✓	897/04		
C6V.2	1.1	2.2	5	AM746406	✓			
C7V.1	1	2.1	6	AM746397	✓			
C7V.2	1.12	2.1	6	AM746422	–			
<b>3'-RACE</b>								
FTGC1	–	–	1	AM489509		1234/02	Die Klone sind > 99 % identisch.	
FTGC2**	–	–	1					
FTGC3*	–	–	1					
fTGP1.1	–	–	4	–		897/04	Die beiden Klone sind identisch. >99% Homologie zu fTRGC4	
fTGP1.4*	–	–	4					
FTGC2.9*	–	–	2	AM489510		1234/02	Die Klone sind > 99 % identisch.	
FTGC2.24**	–	–	2					
FTGC2.25	–	–	2					
C1.1	–	–	1	AM747391		1675/04		
C1.2	–	–	1					
C3.1*	–	–	3	AM489511		897/04		
C3.2**	–	–	3					
C5.1*	–	–	4	AM489512		1675/04		
C5.2*	–	–	4					

\* doppelt sequenziert; \*\* dreifach sequenziert; vRNS: ungespleißte Vorläufer RNS; LR o. b. B.: Leseraster intakt. Ab.: Abessinier; Stop: Stop-Kodon in V-Region; IR: in vitro-Rekombination.

Fortsetzung Tabelle 60: Liste der sequenzierten Klone mit Zugangsnummer

Bezeichnung	Identität			Zugangsnummer	Herkunft	Bemerkung
	V	J	C			
Fortsetzung 3'RACE						
15.1**	4	2.2	5	AM489513	1448/04	
15.2*	4	2.2	5			
15.3**	4	2.2	5			
C7.1*	–	–	6	AM489514	1675/04	
C7.2*	–	–	6			

\* doppelt sequenziert; \*\* dreifach sequenziert; vRNS: ungespleißte Vorläufer RNS; LR o. b. B.: Leseraster intakt. Ab.: Abessinier; Stop: Stop-Kodon in V-Region; IR: in vitro-Rekombination.

## 9. 8 Ergebnisse der Suche im Trace-Archiv

### 9. 8. 1 Suche nach den Sequenzen für das Signal-Peptid

Tabelle 61: Sequenzen aus dem Trace-Archiv, die mögliche Signal-Peptid Information enthalten

Bezeichnung	Gen	Bezeichnung	Gen
<a href="#">gnl   ti   750315017</a>	fTRGV1	<a href="#">gnl   ti   662677123</a>	fTRGV1
<a href="#">gnl   ti   664152861</a>	neue Variante	<a href="#">gnl   ti   632756027</a>	83 % Homologie zu fTRGV2 und fTRGV3;
<a href="#">gnl   ti   667332944</a>	fTRGV3	<a href="#">gnl   ti   663092402</a>	
<a href="#">gnl   ti   840402958</a>	fTRGV1 (95 %)		

### 9. 8. 2 Suche nach 3'UTR verschiedener C-Regionen

Tabelle 62: : Sequenzen aus dem Trace-Archiv zu Exon 3 und 3'UTR der konstanten Region

Bezeichnung	Gen	Bezeichnung	Gen
<a href="#">gnl   ti   643826979</a>	fTRGC1	<a href="#">gnl   ti   815912366</a>	fTRGC3
<a href="#">gnl   ti   683220733</a>	fTRGC1	<a href="#">gnl   ti   651960355</a>	fTRGC3
<a href="#">gnl   ti   641292529</a>	fTRGC3	<a href="#">gnl   ti   647078756</a>	fTRGC3
<a href="#">gnl   ti   667939510</a>	fTRGC3	<a href="#">gnl   ti   628555117</a>	fTRGC3
<a href="#">gnl   ti   919695793</a>	fTRGC3	<a href="#">gnl   ti   717441054</a>	fTRGC3
<a href="#">gnl   ti   921863945</a>	fTRGC2	<a href="#">gnl   ti   836923593</a>	fTRGC3
<a href="#">gnl   ti   653040988</a>	fTRGC2	<a href="#">gnl   ti   964961887</a>	fTRGC6
<a href="#">gnl   ti   651919000</a>	fTRGC3	<a href="#">gnl   ti   750349118</a>	fTRGC6
<a href="#">gnl   ti   685029904</a>	fTRGC5	<a href="#">gnl   ti   664013832</a>	fTRGC6
<a href="#">gnl   ti   827523308</a>	fTRGC5	<a href="#">gnl   ti   651631074</a>	fTRGC2
<a href="#">gnl   ti   686689379</a>	fTRGC1	<a href="#">gnl   ti   646757641</a>	fTRGC6
<a href="#">gnl   ti   682322820</a>	fTRGC6	<a href="#">gnl   ti   920671284</a>	fTRGC3

### 9. 8. 3 V-Regionen

Tabelle 63: Sequenzen aus dem Trace-Archiv zu fTRGV

Bezeichnung	Gen	Homologie	Bezeichnung	Gen	Homologie
<a href="#">gnl   ti   651428252</a>	fTRGV1	100 %	<a href="#">gnl   ti   838072588**</a>	fTRGV4	86 %
<a href="#">gnl   ti   685364778</a>	fTRGV3	100 %	<a href="#">gnl   ti   827924706**</a>	fTRGV4	85 %
<a href="#">gnl   ti   667332944</a>	fTRGV3	99 %	<a href="#">gnl   ti   643947952***</a>	fTRGV4	83 %
bis Base 211 der V-Region	<a href="#">gnl   ti   664152861</a>	79 %	<a href="#">gnl   ti   646819523***</a>	fTRGV4	83 %
	fTRGV2	79 % teilw.	<a href="#">gnl   ti   644534307***</a>	fTRGV4	83 %
	fTRGV3	73 % teilw.	<a href="#">gnl   ti   631627457****</a>	fTRGV4	85 % ab Base 87 der V- Region
<a href="#">gnl   ti   663092402*</a>	fTRGV1	70 %	<a href="#">gnl   ti   843445389****</a>		
	fTRGV2	71 %	<a href="#">gnl   ti   686318445****</a>		
	fTRGV3	73 %			

\*fTRGV5P; \*\*fTRGV4.1P; \*\*\* fTRGV4.2P; \*\*\*\* fTRGV4.3P

### 9. 8. 4 J-Regionen

Tabelle 64: Sequenzen aus dem Trace-Archiv zu fTRGJ

Bezeichnung	Gen	Homologie	Bezeichnung	Gen	Homologie
<a href="#">gnl   ti   908344703</a>	fTRGJ1.2	100 %	<a href="#">gnl   ti   716917754*</a>	fTRGJ2.2	86 %
<a href="#">gnl   ti   662694619</a>	fTRGJ1.2	100 %	<a href="#">gnl   ti   836113710*</a>	fTRGJ2.2	86 %
<a href="#">gnl   ti   651427199</a>	fTRGJ1.2	100 %	<a href="#">gnl   ti   646818114*</a>	fTRGJ2.2	86 %
<a href="#">gnl   ti   648454096</a>	fTRGJ1.2	100 %	<a href="#">gnl   ti   964951196*</a>	fTRGJ2.2	86 %
<a href="#">gnl   ti   664918802</a>	fTRGJ1.2	100 %	<a href="#">gnl   ti   755161287**</a>	fTRGJ2.2	88 %
<a href="#">gnl   ti   831609940</a>	fTRGJ1.2	100 %	<a href="#">gnl   ti   915239161***</a>	fTRGJ2.4	100 %
<a href="#">gnl   ti   644376597</a>	fTRGJ1.2	100 %	<a href="#">gnl   ti   652438676***</a>	fTRGJ2.4	100 %
<a href="#">gnl   ti   787059430</a>	fTRGJ1.3	100 %	<a href="#">gnl   ti   816582797</a>	fTRGJ3	98 %
<a href="#">gnl   ti   965511985</a>	fTRGJ1.3	100 %	<a href="#">gnl   ti   913549611</a>	fTRGJ3	98 %
<a href="#">gnl   ti   915242736*</a>	fTRGJ2.2	86 %	<a href="#">gnl   ti   833354436</a>	fTRGJ3	98 %
<a href="#">gnl   ti   716919583*</a>	fTRGJ2.2	86 %			

\*fTRGJ2.3; \*\* ist die genomische Sequenz des fTRGJP; \*\*\* gefunden mit Klon fTGII.2

## 9. 8. 5 C-Regionen

Tabelle 65: Sequenzen aus dem Trace Archiv zu fTRGC

fTRGC1					
Bezeichnung	Exon	Homologie	Bezeichnung	Exon	Homologie
<a href="#">gnl   ti   763808656</a>	1	99 %	<a href="#">gnl   ti   687166513</a>	2B	100%
<a href="#">gnl   ti   749454182</a>	1	99 %	<a href="#">gnl   ti   643826979</a>	3, 3'UTR	99 %
<a href="#">gnl   ti   628551162</a>	2A	99 %	<a href="#">gnl   ti   683220733</a>	3, 3'UTR	99 %
<a href="#">gnl   ti   689910526</a>	2B	100 %	<a href="#">gnl   ti   686689379</a>	3, 3'UTR	99 %
fTRGC2					
<a href="#">gnl   ti   646417525</a>	1	99 %	<a href="#">gnl   ti   653040988</a>	3, 3'UTR	98 %
<a href="#">gnl   ti   664367233</a>	2A	97 %	<a href="#">gnl   ti   921863945</a>	3, 3'UTR	98 %
<a href="#">gnl   ti   818549846</a>	2B	100 %	<a href="#">gnl   ti   651631074</a>	3, 3'UTR	99 %
fTRGC3					
<a href="#">gnl   ti   820833221</a>	1	99 %	<a href="#">gnl   ti   667939510</a>	3, 3'UTR	97 %
<a href="#">gnl   ti   664229455</a>	1	99 %	<a href="#">gnl   ti   641292529</a>	3, 3'UTR	97 %
<a href="#">gnl   ti   686629734</a>	1	99 %	<a href="#">gnl   ti   651919000</a>	3, 3'UTR	97 %
<a href="#">gnl   ti   914369325</a>	2A	100 %	<a href="#">gnl   ti   919695793</a>	3, 3'UTR	97 %
<a href="#">gnl   ti   823574800</a>	2A	100 %	<a href="#">gnl   ti   815912366</a>	3, 3'UTR	95 %
<a href="#">gnl   ti   652466940</a>	2A	96 %	<a href="#">gnl   ti   647078756</a>	3, 3'UTR	95 %
<a href="#">gnl   ti   920671285</a>	2B	100 %	<a href="#">gnl   ti   651960355</a>	3'UTR	96 %
<a href="#">gnl   ti   667939511</a>	2B	100 %	<a href="#">gnl   ti   628555117</a>	3'UTR	96 %
<a href="#">gnl   ti   651919001</a>	2B	100 %	<a href="#">gnl   ti   717441054</a>	3'UTR	96 %
			<a href="#">gnl   ti   836923593</a>	3'UTR	97 %
fTRGC4					
<a href="#">gnl   ti   712587905</a>	1	94 % Intron	<a href="#">gnl   ti   825928304</a>	1	100 %
<a href="#">gnl   ti   643950140</a>	1	100%	<a href="#">gnl   ti   645767289</a>	2A	99 %
<a href="#">gnl   ti   667358032</a>	1	100 %	<a href="#">gnl   ti   965536614</a>	2A	99 %
<a href="#">gnl   ti   967479580</a>	1	100 %	<a href="#">gnl   ti   631963963</a>	2B	100 %

Fortsetzung Tabelle 65: Sequenzen aus dem Trace Archiv zu fTRGC

fTRGC4					
Bezeichnung	Exon	Homologie	Bezeichnung	Exon	Homologie
<a href="#">gnl   ti   651727766</a>	2B	100 %	<a href="#">gnl   ti   651506785</a>	3'UTR	97 %
<a href="#">gnl   ti   651575182</a>	2B	100 %			
fTRGC5					
<a href="#">gnl   ti   920529606</a>	1	99 %	<a href="#">gnl   ti   686588799</a>	2B	100 %
<a href="#">gnl   ti   686686218</a>	1	99 %	<a href="#">gnl   ti   820830382</a>	2B	99 %
<a href="#">gnl   ti   664267057</a>	1	99 %	<a href="#">gnl   ti   685029904</a>	3, 3'UTR	99 %
<a href="#">gnl   ti   651988780</a>	1	100 %	<a href="#">gnl   ti   827523308</a>	3, 3'UTR	95 %
fTRGC6					
<a href="#">gnl   ti   648258825</a>	1	100 %	<a href="#">gnl   ti   682322820</a>	3, 3'UTR	96 %

### 9. 8. 6 Kanine Sequenzen

Tabelle 66: Liste der beschriebenen kaninen Varianten mit Beispielen aus dem Trace Archiv

Gen	Bezeichnung	Gen	Bezeichnung
cTRGV1	<a href="#">gnl   ti   238417131</a>	cTRGJ4	<a href="#">AF079123</a>
cTRGV2	<a href="#">gnl   ti   327894397</a>	cTRGJ5	<a href="#">AB117155</a>
cTRGV3	<a href="#">gnl   ti   296303619</a>	cTRGJ6	<a href="#">AY748325</a>
cTRGV4	<a href="#">gnl   ti   301128056</a>	cTRGC1	<a href="#">gnl   ti   317411011</a>
cTRGJ1	<a href="#">AF079119</a>	cTRGC2	<a href="#">gnl   ti   351366853</a>
cTRGJ2	<a href="#">AB117155</a>	cTRGC3	<a href="#">gnl   ti   333063480</a>
cTRGJ3	<a href="#">AB117156</a>	cTRGC4	<a href="#">gnl   ti   390005260</a>

cTRG: kaniner T-Zell-Rezeptor  $\gamma$

## 9.9 Nukleotidsequenzen der Subtypen von fTRGV1

	↖L	*	20	*	40	*	↖FR1	60	
fTRG-V1	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					
fTRG-V1.3	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					
fTRG-V1.1	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					
fTRG-V1.2	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					
fTRG-V1.5	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					
fTRG-V1.7	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					
fTRG-V1.4	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					
fTRG-V1.8	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					
fTRG-V1.6	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					
fTRG-V1.11	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					
fTRG-V1.12	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					
fTRG-V1.10	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					
fTRG-V1.9	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					
fTRG-V1.13	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					
fTRG-V1.14	:	ATGCTGGGTCCCCTCGCCCTCCTGTGTGCCCTCCTGTTTCCAGGTGGCGTGGCAGCGATC	:	60					

	*	80	*	100	*	120	
fTRG-V1	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			
fTRG-V1.3	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			
fTRG-V1.1	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			
fTRG-V1.2	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			
fTRG-V1.5	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			
fTRG-V1.7	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			
fTRG-V1.4	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			
fTRG-V1.8	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			
fTRG-V1.6	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			
fTRG-V1.11	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			
fTRG-V1.12	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			
fTRG-V1.10	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			
fTRG-V1.9	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			
fTRG-V1.13	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			
fTRG-V1.14	:	AGTCTGACTCAGCGGGCTGTGGTGGTGGAGCGCGTGGTGGCTTGGCCACCTGTCCTGC	:	120			

	↖CDR1	*	140	↖FR2	*	160	*	180	
fTRG-V1	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					
fTRG-V1.3	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					
fTRG-V1.1	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					
fTRG-V1.2	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					
fTRG-V1.5	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					
fTRG-V1.7	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					
fTRG-V1.4	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					
fTRG-V1.8	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					
fTRG-V1.6	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					
fTRG-V1.11	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					
fTRG-V1.12	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					
fTRG-V1.10	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					
fTRG-V1.9	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					
fTRG-V1.13	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					
fTRG-V1.14	:	CAAGCCAGCGCCTACGTCGCTACATCCACTGGTACCTCCACCAGGAGGGGACTGCGCCC	:	180					

	*	↖CDR2	*	220	↖FR3	*	240	
fTRG-V1	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				
fTRG-V1.3	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				
fTRG-V1.1	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				
fTRG-V1.2	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				
fTRG-V1.5	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				
fTRG-V1.7	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				
fTRG-V1.4	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				
fTRG-V1.8	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				
fTRG-V1.6	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				
fTRG-V1.11	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				
fTRG-V1.12	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				
fTRG-V1.10	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				
fTRG-V1.9	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				
fTRG-V1.13	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				
fTRG-V1.14	:	AAGAGGATCCTCATGCTGGACATGTCAAGGTTATCTGTGCAGAGATATGGGGGCTTGCAA	:	240				

Abbildung 39: Vergleich der Sequenzen der Subtypen von fTRGV1 mit Angabe der funktionellen Abschnitte.

-FR3-

	*	260	*	280	*	300	
fTRG-V1	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			
fTRG-V1.3	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			
fTRG-V1.1	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			
fTRG-V1.2	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			
fTRG-V1.5	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			
fTRG-V1.7	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			
fTRG-V1.4	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			
fTRG-V1.8	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			
fTRG-V1.6	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			
fTRG-V1.11	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			
fTRG-V1.12	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			
fTRG-V1.10	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			
fTRG-V1.9	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			
fTRG-V1.13	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			
fTRG-V1.14	:	GCGGACAAAATCGATGCCAAGAAAGGCAAGGAAAGCAACAGCTGTGAACTGTCAGTGAAG	:	300			

	*	320	*	↪CDR3	340	
fTRG-V1	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		
fTRG-V1.3	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		
fTRG-V1.1	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		
fTRG-V1.2	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		
fTRG-V1.5	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		
fTRG-V1.7	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		
fTRG-V1.4	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		
fTRG-V1.8	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		
fTRG-V1.6	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		
fTRG-V1.11	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		
fTRG-V1.12	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		
fTRG-V1.10	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		
fTRG-V1.9	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		
fTRG-V1.13	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		
fTRG-V1.14	:	AAGTTCAGAAAGAGCGACGAGGGCGTGTACTACTGTGCTGCCTGGGA	:	347		

Fortsetzung der Abbildung 39: Vergleich der Sequenzen der Subtypen von fTRGV1 mit Angabe der funktionellen Abschnitte.

	↪L	*	↪FR1	*	40	↪CDR1*	↪FR2	60	
fTRG-V1	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGLATLSCQASAV	VRYIHWY	LHQEGTAP	:	60
fTRG-V1.3	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGLATLSCQASAV	VRYIHWY	LHQEGTAP	:	60
fTRG-V1.1	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGLANLSCQASAS	VSYIHWY	LHQEGTAP	:	60
fTRG-V1.2	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGLANLSCQASAS	VSYIHWY	LHQEGTAP	:	60
fTRG-V1.5	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGLANLSCQASAS	VSYIHWY	LHQEGTAP	:	60
fTRG-V1.7	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGLATLSCQASAV	VGYIHWY	LHQEGTAP	:	60
fTRG-V1.4	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGLATLSCQASAV	ARYIHWY	LHQEGTAP	:	60
fTRG-V1.8	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGLATLSCQASAV	VGYIHWY	LHQEGTAP	:	60
fTRG-V1.6	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGLATLSCQASAV	VRYIHWY	LHQEGTAP	:	60
fTRG-V1.11	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGLANLSCQASAS	VSYIHWY	LHQEGTAP	:	60
fTRG-V1.12	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGLANLSCQASAS	VSYIHWY	LHQEGTAP	:	60
fTRG-V1.10	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGLANLSCQASAS	VSYIHWY	LHQEGTAP	:	60
fTRG-V1.9	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGSATLSCQASAV	VRYIHWY	LHQEGTAP	:	60
fTRG-V1.13	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGLATLSCQASAV	VGYIHWY	LHQEGTAP	:	60
fTRG-V1.14	:	MLGPLALLCALLF	PGGVAAT	SLTQRAVVVERV	VGGLATLSCQASAV	VGYIHWY	LHQEGTAP	:	60

	↪CDR2	↪FR3	*	100	*	↪CDR3	
fTRG-V1	:	KRILMLDMSRLSVQRYGGL	KADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	115
fTRG-V1.3	:	KRILRLDMSRLSVQRYGGL	EADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	115
fTRG-V1.1	:	KRILRLDMSRLSVQRYGGL	EADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	115
fTRG-V1.2	:	KRILRLDMSRLSVQRYGGL	EADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	115
fTRG-V1.5	:	KRILMLDMSRLSVQRYGGL	KADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	115
fTRG-V1.7	:	KRILMLDMSRLSVQRYGGL	EADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	115
fTRG-V1.4	:	KRILRLDMSRLSVQRYGGL	EADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	115
fTRG-V1.8	:	KRILMLDMSRLSVQRYGGL	EADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	115
fTRG-V1.6	:	KRILMLDMSRLSVQRYGGL	KADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	114
fTRG-V1.11	:	KRILMLDMSRLSVQRYGGL	KADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	115
fTRG-V1.12	:	KRILRLDMSRLSVQRYGGL	EADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	115
fTRG-V1.10	:	KRILRLDMSRLSVQRYGGL	KADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	115
fTRG-V1.9	:	KRILMLDMSRLSVQRYGGL	KADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	115
fTRG-V1.13	:	KRILRLDMSRLSVQRYGGL	EADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	115
fTRG-V1.14	:	KRILRLDMSRLSVQRYGGL	EADKIDAKK	GKESNSCELSVKKLQKS	DEGVYICAAW	:	115

Abbildung 40: Vergleich der Abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Subtypen von fTRGV1.

## 9. 10 Liste der Prototypen der Regionen

### 9. 10. 1 Liste der Prototypen für die V-Regionen

Tabelle 67: Liste der Prototypen für die V-Regionen

Gen	Klonbezeichnung	Gen	Klonbezeichnung
fTRGV1	C1C23.23	fTRGV1.9	C1C4.3
fTRGV1.1	50.14	fTRGV1.10	C2C4.6
fTRGV1.2	C1C367.2	fTRGV1.11	C1C467.21
fTRGV1.3	C1C467.10	fTRGV1.12	C7V2
fTRGV1.4	62.3	fTRGV1.13	C2C4.5
fTRGV1.5	C1C467.8	fTRGV1.14	C2C4.4
fTRGV1.6	C1C1.2	fTRGV2	C1C26.1
fTRGV1.7	C6V1	fTRGV3	C1C23.20
fTRGV1.8	62.1	fTRGV4	C1C367.3

### 9. 10. 2 Liste der Prototypen für die J-Regionen

Tabelle 68: Liste der Prototypen für die J-Regionen

Gen	Klonbezeichnung	Gen	Klonbezeichnung
fTRGJ1.1	52.2	fTRGJ1.5	C3V.1
fTRGJ1.2	fTGII.1	fTRGJ2.1	VJC7.1
fTRGJ1.3	C2C4.5	fTRGV2.2	62.1
fTRGV1.4	C2C4.3	fTRGV3	62.3

## 9. 11 Vergleich mit anderen Spezies

### 9. 11. 1 Ergebnisse des Vergleiches der V-Regionen mit V-Quest und IMGT/GapAlign

Tabelle 69: Homologiewerte zwischen fTRG und TRG-Sequenzen anderer Spezies, die als Ergebnis beim Vergleich mit V-best erzeugt wurden

Gen	Gen	Homologie	Gen	Gen	Homologie
fTRGV1	hTRGV2	52 %	fTRGV3	hTRGV5	53 %
	hTRGV4	52 %		hTRGV1	53 %
	hTRGV3	51 %		hTRGV3	52 %
fTRGV2	hTRGV3	50 %	fTRGV4	mTRGV6	67 %
	hTRGV5	50 %		mTRGV4	48 %
	hTRGV4	49 %			

hTRG: humaner T-Zellrezeptor  $\gamma$ ; mTRG: muriner T-Zellrezeptor  $\gamma$ .

**Tabelle 70:** Homologiewerte zwischen Proteinsequenzen des fTRG und TRG-Sequenzen anderer Spezies, die als Ergebnis beim Vergleich mit IMGT/Domain GapAlign erzeugt wurden

Protein	Protein	Homologie	Protein	Protein	Homologie
fTRGV1	hTRGV4	39 %	fTRGV3	bTRGV5S17	35 %
fTRGV2	bTRGV5S17	33 %	fTRGV4	mTRGV6	57 %

hTRG: humaner T-Zellrezeptor  $\gamma$ ; mTRG muriner T-Zellrezeptor  $\gamma$ . bTRG: boviner T-Zellrezeptor  $\gamma$ .

### 9. 11. 2 Vergleich der V-Regionen mit denen weiterer Spezies

**Tabelle 71:** Homologiewerte aus dem Vergleich der felinen V-Regionen mit solchen weiterer Spezies

Gen	Homologie	Zugangsnummer	Gen	Homologie	Zugangsnummer
fTRGV1			fTRGV3		
oTRGV6	66 %	<a href="#">DQ992074.1</a>	oTRGV6	66 %	<a href="#">DQ992074.1</a>
ocTRGV1.1	65 %	<a href="#">D38135</a>	bTRGV6S1	67 %	<a href="#">AY644518.1</a>
sTRGV5S1	69 %	<a href="#">AB185445</a>	bTRGV6S2	67 %	<a href="#">AY644518.1</a>
bTRGV6S1	66 %	<a href="#">AY644518.1</a>	bTRGV5S1	<62 %	<a href="#">AY644518.1</a>
bTRGV6S2	66 %	<a href="#">AY644518.1</a>	sTRGV5S1	71 %	<a href="#">AB185445</a>
fTRGV2			fTRGV4		
oTRGV6	71 %	<a href="#">DQ992074.1</a>	oTRGVP	78 %	<a href="#">DQ992075.1</a>
bTRGV6S1	67 %	<a href="#">AY644518.1</a>	sTRGV3S1	79 %	<a href="#">AB185443.1</a>
sTRGV5S1*	69 %	<a href="#">AB185445</a>	Schimpanse Chromosom 7	81 %	<a href="#">AC189701.3</a>

oTRG: T-Zellrezeptor  $\gamma$  des Schafes; bTRG: T-Zellrezeptor  $\gamma$  des Rindes; sTRG: T-Zellrezeptor  $\gamma$  des Schweins; ocTRG: T-Zellrezeptor  $\gamma$  des Kaninchen.

### 9. 11. 3 Vergleich der J-Regionen mit denen des Hundes

**Tabelle 72:** Vergleich der felinen J-Regionen mit den kaninen

fTRGJ	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	J2.1	2.2	J3
cTRGJ1	14 %	13 %	17 %	21 %	14 %	64 %	70 %	14 %
cTRGJ2	75 %	74 %	83 %	78 %	84 %	16 %	38 %	16 %
cTRGJ3	37 %	10 %	17 %	17 %	10 %	74 %	81 %	14 %
cTRGJ4	76 %	76 %	81 %	76 %	82 %	16 %	22 %	16 %
cTRGJ5	73 %	71 %	79 %	75 %	78 %	40 %	42 %	18 %
cTRGJ6	44 %	37 %	51 %	39 %	40 %	83 %	90 %	13 %

cTRG: T-Zellrezeptor  $\gamma$  des Hundes.

### 9. 11. 4 Ergebnisse des Vergleiches der C-Regionen mit IMGT/GapAlign

Tabelle 73: Homologiewerte zwischen Proteinsequenzen de fTRGC-Exon 1 und TRG-Sequenzen anderer Spezies, die als Ergebnis beim Vergleich mit IMGT/Domain GapAlign erzeugt wurden

Protein	Protein	Homologie	Protein	Protein	Homologie
fTRGC1	mTRGC4	71%	fTRGC4	mTRGC2	73%
fTRGC2	mTRGC1	74%	fTRGC5	mTRGC2	76%
fTRGC3	mTRGC2	71%	fTRGC6	hTRGC1	66%

hTRG: humaner T-Zellrezeptor  $\gamma$ ; mTRG muriner T-Zellrezeptor  $\gamma$ .

### 9. 11. 5 Homologiewerte beim Vergleich von fTRGC Exon 1 mit cTRGC.

Tabelle 74: Vergleich des ersten Exons der C-Region bei Hund und Katze

fTRGC	1	2	3	4	5	6
cTRGC1	83 %	83 %	83 %	84 %	85 %	82 %
cTRGC2	84 %	83 %	83 %	84 %	85 %	79 %
cTRGC3	84 %	84 %	83 %	84 %	85 %	80 %
cTRGC4	83 %	83 %	82 %	80 %	84 %	81 %

cTRG: T-Zellrezeptor  $\gamma$  des Hundes.

### 9. 11. 6 Homologiewerte beim Vergleich von fTRGC1 Exon 3 mit denjenigen weiterer Spezies

Tabelle 75: Vergleich von Exon 3 der C-Region der Katze mit anderen Spezies

Gen	Gen	Homologie	Gen	Gen	Homologie
fTRGC1					
hTRGC1	<a href="#">NG_001336</a>	74 %	bTRGC5	<a href="#">AY644517</a>	79 %
oTRGC2	<a href="#">DQ992074.1</a>	73 %	mTRGC1	<a href="#">AF037352</a>	76 %
oTRGC3	<a href="#">DQ992075.1</a>	77 %	mTRGC2	<a href="#">AF021335</a>	77 %
fTRGC6					
hTRGC2	<a href="#">NG_001336</a>	74 %	oTRGC1	<a href="#">DQ992075.1</a>	77 %
hTRGC1	<a href="#">NG_001336</a>	73 %	bTRGC5	<a href="#">AY644517</a>	77 %
oTRGC4	<a href="#">DQ992074.1</a>	71 %	bTRGC4	<a href="#">AY644518</a>	70 %

hTRG: humaner T-Zellrezeptor  $\gamma$ ; mTRG muriner T-Zellrezeptor  $\gamma$ . bTRG: boviner T-Zellrezeptor  $\gamma$ , oTRG: oviner T-Zellrezeptor  $\gamma$ . Angegeben sind jeweils nur Homologiewerte, aus Vergleichen, in denen die Sequenz weitgehend über die ganze Länge entsprechende Homologie aufwies.

## 9. 12 Homologiewerte der weiteren felinen Regionen

### 9. 12. 1 Homologiewerte der felinen J-Regionen

Tabelle 76: Homologiewerte aus dem Vergleich der felinen J-Regionen.

fTRGJ	1.2	1.3	1.4	1.5	2.1	2.2	2.3	2.4	P	J3
1.1	91 %	83 %	87 %	87 %	39 %	41 %	37 %	39 %	16 %	16%
1.2		86 %	96 %	91 %	10 %	22 %	15 %	22 %	15 %	15%
1.3			87 %	91 %	27 %	21 %	16 %	20 %	16 %	19%
1.4				89 %	12 %	23 %	16 %	23 %	16 %	16%
1.5					10 %	36 %	15 %	22 %	15 %	17%
2.1						89 %	79 %	71 %	76 %	11%
2.2							86 %	86 %	83 %	11%
2.3								95 %	88 %	15 %
2.4									80 %	12 %
P										12 %

### 9. 12. 2 Homologiewerte der felinen C-Regionen

Tabelle 77: Homologiewerte aus dem Vergleich des ersten Exons der C-Region-Varianten

	fTRGC2	fTRGC3	fTRGC4	fTRGC5	fTRGC6
fTRGC1	88 %	87 %	87 %	89 %	81 %
fTRGC2		86 %	86 %	92 %	81 %
fTRGC3			86 %	90 %	81 %
fTRGC4				88 %	81 %
fTRGC5					83 %

## 9. 13 Kombinationen und Häufigkeiten der V-, J- und C-Regionen

Tabelle 78: Kombinationen von aufgetretenen fTRGJ- und fTRGC-Varianten

fTRGJ	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	2.1	2.2	3
fTRGC1	41 (38%)	11 (10%)		1	2			
fTRGC2		17 (16%)		1				
fTRGC3		1			4 (4%)			
fTRGC4								2
fTRGC5			1		1	1	15 (14%)	
fTRGC6						9 (8%)		

Tabelle 79: Häufigkeit der Kombinationen von aufgetretenen fTRGV- und fTRGJ-Varianten

fTRGJ	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	2.1	2.2	3
fTRGV1	32 (30%)	11 (10%)		1		1		
fTRGV1.1	7 (6%)						2	
fTRGV1.2						5 (5%)		
fTRGV1.3						1		
fTRGV1.4								1
fTRGV1.5		2						
fTRGV1.6	1							
fTRGV1.7							1	
fTRGV1.8							4 (4%)	
fTRGV1.9		1						
fTRGV1.10		1						
fTRGV1.11						1		
fTRGV1.12						1		
fTRGV1.13			1					
fTRGV1.14	1							
fTRGV2		14 (13%)		1		1		
fTRGV3					7 (6%)			1
fTRGV4							8 (7%)	

Zusätzlich traten bei den 112 sequenzierten Klonen drei ohne J-Region und einer mit fTRGJ2.4 und inverser Wiederholung auf, bei einem wurde nur die V-Region sequenziert, so dass hier nur 107 Sequenzen ausgewertet werden konnten.

Tabelle 80: Häufigkeiten der einzelnen Varianten in produktiv und nicht produktiv rekombiniertem Zustand

Gen	prod.	n. prod.	Ges.	Gen	prod.	n. prod.	Ges.
fTRGV1	34 (76%)	11	45	fTRGV3	5 (63%)	3	8
fTRGV1.1	9 (100%)	0	9	fTRGV4	6 (75%)	2	8
fTRGV1.2	2	3	5	fTRGJ1.1	34 (83%)	7	41
fTRGV1.3	1	0	1	fTRGJ1.2	18 (62%)	11	29
fTRGV1.4	1	0	1	fTRGJ1.3	1	0	1
fTRGV1.5	1	1	2	fTRGJ1.4	1	1	2
fTRGV1.6	0	1	1	fTRGJ1.5	5 (71%)	2	7
fTRGV1.7	1	0	1	fTRGJ2.1	6 (60%)	4	10
fTRGV1.8	0	4	4	fTRGJ2.2	9 (60%)	6	15
fTRGV1.9	1	0	1	fTRGJ3	1?	1	2
fTRGV1.10	1	0	1	fTRGC1	43	12	55
fTRGV1.11	1	0	1	fTRGC2	11	7	18
fTRGV1.12	0	1	1	fTRGC3	3	2	5
fTRGV1.13	1	0	1	fTRGC4	1	1	2
fTRGV1.14	1	0	1	fTRGC5	12	6	18
fTRGV2	10 (63%)	6	16	fTRGC6	5	4	9

f.: produktiv rekombiniert; n. f.: nicht produktiv rekombiniert; ges: Gesamtzahl der Klone.

## 9. 14 Bezugsquellen

### 9. 14. 1 Bezugsquellen für Chemikalien, Enzyme und Kits

#### **Biozym, Oldendorf (Vertreter von Gentra Inc., Mineapolis MN, USA)**

Puregene® Kit, Kat.-Nr.: 202005

Purescript® Kit, Kat.-Nr.: 212010

SeaKem® LE Agarose, Kat.-Nr.: 840.00

FailSave™ PCR System, Kat.-Nr.: 103601

#### **BD Biosciences Heidelberg, Palo Alto, CA, USA**

SMART™ RACE cDNA Amplification Kit, Kat.-Nr. 632914

#### **BioCat, Heidelberg (Vertreter von Seegene, Kangnam-gu Seoul, Korea und von Finnzymes, Espoo Finland)**

CapFishing™ Full-lengt cDNA Premix Kit, Kat.-Nr. E1030-SG

Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase, Kat.-Nr. F-530S-FI

#### **Invitrogen, Karlsruhe**

Superscript™ II Reverse Transkriptase, Kat.-Nr. 18064-022

Library Efficiency® DH5α™ Competent Cells, Kat.-Nr.: 18263-012

TOPO TA Cloning® Kit, Kat.-Nr.: 12355-038

#### **Macherey & Nagel, Düren**

NucleoSpin® Extract II, Kat.-Nr.: 740590.250

NucleoSpin® Plasmid, Kat.-Nr.: 740588.250

#### **MBI Fermentas, St. Leon-Rot**

DNS Längenstandard FastRuler™, Low Range, Kat.-Nr.: SM1103

DNS LängenStandard O'GeneRuler™ 100 Bp Ladder, Kat.-Nr.: SM1143

DNS Längenstandard ΦX174 DNS/*Bsu*RI, Kat.-Nr.: SM0253

*Eco*RI, Kat.-Nr.: ER0271

*Hin*fl, Kat.-Nr.: ER0801

pUC19 DNS, Kat.-Nr.: SD0061

*Rsa*I, Kat.-Nr.: ER1121

#### **Natutec, Frankfurt**

BioTherm™ DNS-Polymerase, Kat.-Nr.: GC-002-002

#### **Novagen-Merck Biosciences GmbH, Darmstadt**

AccepTor™ Vector Kit, Kat.-Nr.: 70595-4

**peQLab, Erlangen**

dNTP-Set "Long Range", Kat.-Nr.: 20-2110

dNTP-Set, Kat.-Nr.: 20-2011

peQGOLD AMV, Reverse Transkriptase, Kat.-Nr.: 03-1010

SAWADY Taq-DNS-Polymerase, Kat. Nr.: 01-1030

**Promega, Mannheim**

RNasin<sup>®</sup>, Ribonuclease Inhibitor, Kat.-Nr.: N2111

**Qiagen, Hilden**

Oligotex<sup>®</sup> Direct mRNA Kit, Kat.-Nr.: 70022

QIAshredder<sup>®</sup>-Säulen, Kat.-Nr.: 79654

**Roche Diagnostics GmbH, Mannheim**

5'/3'RACE Kit, Kat.-Nr.: 03353621001

**Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe**

2-Mercaptoethanol p. a., Kat.-Nr.: 4227.3

2-Propanol, Rotipuran<sup>®</sup> p. a., Kat.-Nr.: 6752.2

Ampicillin Natriumsalz, Kat.-Nr.: KO29.1

Borsäure p. a., Kat.-Nr.: 6943.3

Bromphenolblau, Kat.-Nr.: A512.1

DEPC  $\geq$  97 %, Kat.-Nr.: K028.1

EDTA-Dinatrium-Dihydrat p. a., Kat.-Nr.: 8043.1

Ethanol, Rotipuran<sup>®</sup> p. a., Kat.-Nr.: 9065.4

Ethidiumbromid-Lösung 1% (10mg/ml): Kat.-Nr.: 2218.2

IPTG, Kat.-Nr.: 2316.2

LB-AGAR (Luria Miller), Kat.-Nr.: X969.2

LB-Medium (Luria Miller), Kat.-Nr.: X968.2

Natriumacetat p. a., Kat.-Nr.: 6773.2

Roti<sup>®</sup>-Chlorophorm/Isoamylalkohol, Kat.-Nr.: X984.1

Roti<sup>®</sup>-Phenol, Kat.-Nr.: 0038.1

Tris-Puffer Ultra Pure, Kat.-Nr.: 5429.2

X-Gal, Kat.-Nr.: 2315.3

Xylenzyanol, Kat.-Nr.: C.I. 42135

**Serva, Heidelberg**

Ficoll<sup>®</sup> 400, Kat.-Nr: 39763.02

## 9. 14. 2 Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel

### **Assab Medizin AB, Stockholm, Schweden**

Brutschrank 77.09 615A 303 GF

### **Biometra, Göttingen**

BioDoc Analyse Geldokumentation System

### **Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf**

Multicycler PTC 200

Multicycler PTC 200 Gradient

PCR Soft Tubes, 0,5 ml, Flachdeckel, Kat.-Nr.: 710911

PCR Soft Tubes, 0,2 ml, Flachdeckel, Kat.-Nr.: 710920

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 1000 µl: Kat.-Nr.: 781002

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 200 µl: Kat.-Nr.: 780202

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 100 µl: Kat.-Nr.: 780102

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 20 µl: Kat.-Nr.: 780022

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 10 µl: Kat.-Nr.: 780017

### **Consort, Belgien**

Microcomputer Electrophoresis Power Supply

### **Eastman Kodak Inc., USA**

Kodak Gel-Dokumentation System Version 1.0

### **Eppendorf GmbH, Hamburg**

Eppendorfszentrifuge 5415C

### **Haereus, Hanau**

Zentrifuge-Labofuge 400R

### **H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim**

Varioklav® Dampfsterilisator Typ 500 EV

### **Janke & Kunkel GmbH & Co KG JKA Labortechnik, Stauffen**

Schüttler HS501D

### **Keutz, Reiskirchen**

Flachgel-Elektrophoresekammer „Midi“, horizontal, Kat.-Nr.: 0030191-00

Gießvorrichtung, Kat.-Nr.: 0030191-03

**MAGV, Rabenau**

Falcon™ Rundboden-Röhrchen, Kat.-Nr.: 352059  
1mal Petrischalen, ohne Nocken, Kat.-Nr.: 632180

**Mettler GmbH, Giessen**

Präzisionswaage PM 4600 Delta Range  
Präzisionswaage AE100

**Privileg, Quelle, Gießen**

Mikrowellengerät 7020

**Reichert-Jung, Nußloch**

Kryomikrotom Frigocut 2.700

**Shimadzu Europa GmbH, Duisburg**

Shimadzu UV-1202, UV-VIS Spektrophotometer

**Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich**

UV-Transluminator 312 nm  
UV-Transluminator 254 nm

**Horst Zaun, Königswinter (Oberpleis)**

Semperguard, Latex puderfrei, Kat.-Nr.: 8247 0482  
Semperguard, Nitril USH puderfrei, Kat.-Nr.: 8106 02082

## **9. 15      Lösungen und Puffer**

### **9. 15. 1      PCR**

DEPC-Wasser – RNase-freies Wasser

1 ml Diethylpyrocarbonat gibt man zu 1l Aqua dest.. Über Nacht auf Magnetprüher inkubieren. Danach autoklavieren.

### **9. 15. 2      Elektrophorese**

10×TBE-Puffer

108,8 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MW 121,14)

55,0 g Borsäure (MW 61,83)

8,3 g EDTA-Na<sub>2</sub> (MW 372,24)

ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren

**40×TAE-Puffer**

193,6 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MW 121,14)

108,8 g Na-Acetat (MW 82,03)

15,2 g EDTA-Na<sub>2</sub> (MW 372,24)

ad 1000 ml Aqua dest. autoklavieren

**15%ige Ficoll®-Lösung für Ladepuffer**

1,5 g Ficoll® 400

ad 10 ml Aqua dest.,

Schütteln bis zur vollständigen Auflösung.

Zugabe von 25 mg Xylenzyanol oder 25 mg Bromphenolblau

**2%ige und 3 %ige Agarosegele**

100 ml 1×TBE (10 ml 10×TBE und 90 ml Aqua dest.)

2g bzw. 3g Agarose

Die Agarose in 1×TBE Puffer in der Mikrowelle aufkochen bis zur vollständigen Auflösung. Auf ca. 60 °C abkühlen lassen und 8 µl 0,1%ige Ethidiumbromidlösung zufügen. Gel blasenfrei in Gießvorrichtung mit einem oder zwei Kämmen (20 Zähne) gießen. Nach dem Erstarren des Gels die Kämmen entfernen.

**9. 15. 3 Klonierung****LB Medium**

25 g Fertigmedium

ad 1000 ml Aqua dest.

Autoklavieren, auf ca. 55 °C abkühlen lassen und 100µg/ml Ampicillin hinzufügen.

Bis zur Verwendung bei 4°C lagern.

**LB Agar**

40 g Fertigmedium

ad 1000 ml Aqua dest.

Autoklavieren, auf ca. 55 °C abkühlen lassen und 100µg/ml Ampicillin hinzufügen.

In sterile Petrischalen gießen, erstarren lassen und anschließend bei 4°C lagern.

## Lebenslauf

31. Mai 1974	Geburt in Schwabach als 5. Kind meiner Eltern;
1980 – 1984	Besuch der Grundschule in Schwabach;
1984 – 1985	Besuch der Hauptschule in Schwabach;
1985 – 1995	Besuch des Wolfram-von-Eschenbach-Gymnasium in Schwabach;
30. Juni 1995	Abitur;
1995 – 1996	Zivildienst bei der AWO in Schwabach;
1996 – 2002	Studium der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen;
28. März 2002	3. Teil der Tierärztlichen Prüfung;
29. April 2002	Beginn der Arbeit an der Dissertation am Institut für Veterinär-Pathologie, Aufnahme der Weiterbildung zum Fachtierarzt für Pathologie;
13. Mai 2002	Erteilung der Approbation als Tierarzt;
1. Juli – 30. November 2002	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen;
1. Oktober 2002 – 30. September 2004	Graduiertenstipendium der JLU Gießen;
Oktober 2003 – Februar 2007	Teilnahme am Ph.D.-Programm der Fachbereiche Medizin und Veterinärmedizin der JLU Gießen;
1. Oktober 2004 – 31. Mai 2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Veterinär-Pathologie der JLU Giessen;
Oktober 2005 – Februar 2007	Leitung einer Seminargruppe in den Seminaren „allgemeine Pathologie“ und „spezielle Pathologie“;
Seit 1. August 2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin;

## Danksagung

Zum Abschluss möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle Herrn Prof. Dr. M. Reinacher für die Überlassung des Themas, die ständige freundliche Unterstützung und die Korrektur des Manuskriptes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Hecht für viele praktische Tipps im Labor und bei der Auswertung der Sequenzen.

Des weiteren möchte ich besonders einigen Mitarbeitern im Labor und im Institut für Veterinär-Pathologie danken, besonders Herrn Dr. R. Kreuzer, Herrn Dr. M. Suntz, Herrn M. Henrich sowie Frau S. Engel.

Allen anderen Mitarbeitern am Institut für Veterinär-Pathologie, insbesondere Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt und Herrn Dr. K. Köhler, möchte ich für die freundliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit danken.

Außerdem gilt mein Dank meiner Familie, Kerstin Eichenauer und dem vierbeinigen Anhang, die mich während der Arbeit an dieser Dissertation ertragen mussten.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch ein Graduiertenstipendium der Justus-Liebig-Universität Gießen und durch das Ph.D. Programm der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

**ISBN 978-3-939902-58-4**



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH  
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375  
e-mail: [Geschaeftsstelle@dvg.net](mailto:Geschaeftsstelle@dvg.net) · Homepage: <http://www.dvg.net>**