

6. Zusammenfassung

Für das Verständnis der Funktion von Immunglobulinen und der Regulation ihrer Expression ist es erforderlich, die Struktur und genetische Organisation der Immunglobulingene zu kennen.

Erste Arbeiten zur genetischen Organisation equiner C_{II} -Gene wurden von WAGNER (1993) durchgeführt, wobei aber die Anzahl der Gene für die konstanten Domänen der schweren Immunglobulin G-Ketten (C_{γ} -Gene) nicht eindeutig bestimmt werden konnten. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit die Anzahl equiner C_{γ} -Gene und soweit möglich, ihre Anordnung auf dem Chromosom untersucht werden. Erst durch die Kenntnis der equinen C_{γ} -Gene können zuverlässige Aussagen über die mögliche Zahl unterschiedlicher IgG-Subklassen (IgG-Isotypen) beim Pferd gemacht werden.

In einem ersten Schritt zur molekularbiologischen Analyse der equinen C_{γ} -Gene wurden 16 Lambda-Phagen mittels einer hucy4-Sonde aus einer genomischen equinen Genbank isoliert. Die inserierten equinen DNA-Fragmente, die C_{γ} -Gene beinhalten, wurden in einen Plasmid-Vektor kloniert und anschließend isoliert. Diese isolierten equinen DNA-Fragmente wurden mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen sequenzspezifisch gespalten und mit einer hucy4- und einer musy1-Sonde hybridisiert. Die mit Hilfe der Restriktionskarten charakterisierten 16 DNA-Fragmente repräsentieren 7 unterschiedliche equine C_{γ} -Gene bzw. Genfragmente. Eine Anordnung dieser C_{γ} -Gene bzw. Genfragmente von 5' in 3' Richtung konnte aufgrund der fehlenden Überlappungen der equinen DNA-Fragmente auf diese Weise nicht vorgenommen werden.

Auf der Grundlage dieser Restriktionskarten wurden erstmals equine DNA-Sonden für C_{γ} -Gene und die 5' vor einem jeden C_{γ} -Gen gelegenen Switch-Regionen, (S_{γ} -Region) isoliert. Diese equinen DNA-Sonden ermöglichten Untersuchungen an der genomischen DNA mehrerer Pferde unterschiedlicher Rassen. Mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI konnten dabei je nach Pferd 7-9 Banden, die mit der equinen C_{γ} -Sonde hybridisierten, und 6-8 Banden mit der equinen S_{γ} -Sonde nachgewiesen werden. Diese genomischen *Bam*HI-Banden konnten den kartierten equinen S_{γ} -Regionen und C_{γ} -Genen bzw. -Genfragmenten zugeordnet werden. Dabei zeigte sich, daß im Pferdegenom fünf oder sechs equine C_{γ} -Gene vorhanden sind. Zudem konnten *Bam*HI-Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) für 2 der kartierten C_{γ} -Gene gefunden werden. Für die untersuchten Pferde wurden 4 bzw. 2 allele Formen für diese 2 C_{γ} -Gene nachgewiesen.

Um die Anzahl equiner $C\gamma$ -Gene eindeutig zu bestimmen und darüberhinaus auch deren genetische Organisation, sowie ihre relative Anordnung zu den equinen $C\mu$ -, $C\epsilon$ - und $C\alpha$ -Genen zu klären, wurden mit Hilfe der entwickelten equinen DNA-Sonden Deletionsstudien an DNA aus equi-murinen Heterohybridomen (WAGNER et al. 1995) durchgeführt. Diese monoklonalen Heterohybridome exprimieren entweder equine IgM-Antikörper, oder verschiedene, serologisch differenzierbare IgG-Antikörper.

Diese Deletionsstudien zeigen, daß das Pferd mit hoher Wahrscheinlichkeit sechs $C\gamma$ -Gene besitzt. Darüberhinaus konnte nun eine vorläufige Reihenfolge von 5' in 3' Richtung für diese equinen $C\gamma$ -Gene ermittelt werden. Zudem war zu zeigen, daß die untersuchten equinen $C\gamma$ -Gene in 3' Richtung des equinen $C\mu$ -Gens und in 5' Richtung zu den equinen $C\epsilon$ - und $C\alpha$ -Genen liegen.

Für drei equine $C\gamma$ -Gene konnte mit Hilfe der Deletionsanalysen deren Expression durch 3 Immunglobulin-produzierende Heterohybridome nachgewiesen werden. Serologisch wurden sie als IgGa, IgGb und IgG(I) eingeordnet. Ob es sich bei den anderen drei nachgewiesenen equinen $C\gamma$ -Genen um funktionelle Gene handelt, war zum jetzigen Zeitpunkt nicht zu klären. Auch die Analyse, ob diese equinen $C\gamma$ -Gene möglicherweise für die serologisch bekannten equinen IgG-Isotypen IgGc und IgG(B) kodieren, steht noch aus.

7. Summary

Gudrun Overesch: **Isolation and restriction analysis of genes encoding the constant regions of immunoglobulin G heavy chains in horses.**

To understand the function of immunoglobulins and the regulation of their expression sufficient knowledge about structure and genetic organisation of their genes is required.

Initial studies on the genetic organization of equine C_H genes were performed by WAGNER (1993), however the exact number of genes encoding the constant regions of immunoglobulin G heavy chains (C_γ genes) could not be determined. The aim of this study was to define the number of C_γ genes and their chromosomal positioning in the horse genome.

Decent knowledge about equine C_γ genes is essential for the number of different IgG subclasses (IgG isotypes) to be expected in the horse.

First steps towards the molecular analysis of equine C_γ genes comprised the isolation of 16 lambda phages from a equine genomic library using a human $\gamma 4$ probe. Equine DNA inserts containing C_γ genes were cloned into a plasmid vector and subsequently isolated.

These equine DNA fragments were cut sequence specifically with several restriction endonucleases and hybridized with a human $\gamma 4$ probe and a murine $\gamma 1$ probe. The 16 DNA fragments characterised with the help of restriction maps represented 7 different equine C_γ genes or gene fragments, respectively. Due to a lack of overlapping sequences in those equine DNA fragments it was impossible to determine an arrangement of these C_γ genes and gene fragments from 5' to 3' orientation.

Based on these restriction maps, equine DNA probes for both, C_γ genes and switch regions (S_γ regions), located in 5' orientation in front of each C_γ gene, were isolated for the first time. These equine DNA probes were used for Southern blot analysis on genomic DNA in various horses of different breeds. Using *Bam*HI as a restriction enzyme, 7-9 bands were detected with the equine C_γ probe and 6-8 bands with the equine S_γ probe, depending on the individual tested. These genomic *Bam*HI bands could be related to the mapped equine S_γ regions and C_γ genes or gene fragments.

From this, it was concluded, that there are 5 or 6 equine C_γ genes in the horse genome.

Furthermore a *Bam*HI restriction fragment length polymorphism (RFLP) was observed for two of the mapped C_γ genes. The horses tested up to now, showed 4 and 2 allelic forms of these two different C_γ genes, respectively.

To determine the number of equine $C\gamma$ genes and their genetic organization and localization with respect to the equine $C\mu$, $C\epsilon$ and $C\alpha$ genes, deletion studies with DNA from equi-murine heterohybridoma were carried out, using the equine DNA probes described above. These monoclonal heterohybridoma expressed either equine IgM antibodies or one of several serologically different IgG antibodies.

These deletion studies suggest that there are 6 $C\gamma$ genes in the horse. Furthermore a preliminary arrangement from 5' to 3' orientation was possible for these 6 equine $C\gamma$ genes. In addition, it was shown that all of these equine $C\gamma$ genes are located 3' of the $C\mu$ gene and in 5' orientation to the $C\epsilon$ and $C\alpha$ genes.

The expression of three equine $C\gamma$ genes could be demonstrated by deletion analysis of 3 heterohybridoma producing immunoglobulins. Serologically they were classified as IgGa, IgGb and IgG(T). Whether the other 3 $C\gamma$ genes are functional remains to be investigated. Moreover, it is still unknown if they might encode for the serologically defined equine IgG isotypes IgGc and/or IgG(B).