

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie

(Direktor: Prof. Dr. E. Köttgen)

Charité

Campus Virchow Klinikum

Humboldt Universität zu Berlin

Untersuchungen zur Beteiligung
zellulärer und genetischer Mechanismen
bei Immunregulation und -modulation

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia legendi

für das Fach Pathobiochemie

an der Medizinischen Fakultät Charité

vorgelegt von

Dr. med. Angelika Daser

Januar 2000

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	2
I. Aspekte der Regulation und Dysregulation zellulärer Immunität	
1. Einleitung	4
2. NK1.1 T Zellen sind nicht die Quelle des initialen IL-4	7
3. Intervention im trimolekularen MHC - Peptid - TCR - Komplex sollte eine pathologischen Immunantwort blockieren können	9
II. Genetik immunologischer Erkrankungen	
1. Einleitung	12
2. Die allergische Soforttypreaktion gegen Birkenpollen in der Maus: Definition zweier Mausinzuchtstämme als High- und Low-Responder und Phänotypisierung informativer Nachkommen	14
3. Der MHC ist auf homozygotem Hintergrund immundominant	17
4. Der Genomscan weist auf ein Kandidatengen auf Chromosom 6 hin	19
5. Das Interleukin-5 Rezeptor Gen ist polymorph mit funktioneller Implikation für High- und Low-Response	24
6. Strukturelle und regulatorische Varianz sind an der Expression des allergischen Phänotyps beteiligt	32
7. Genomanalysen zeigen Cluster und spezifische Loci bei unterschiedlichen immunologischen Erkrankungen	37
III. Referenzen	41
IV. Anhang mit den im Text zusammengefaßten Originalarbeiten	

Zusammenfassung

Durch Immunregulation und -modulation sorgt das Immunsystem dafür, daß von außen in den Organismus gelangende Agentien nicht zu dauerhaften Schäden führen. Wesentliche Funktionen des Immunsystems stützen sich dabei auf die zelluläre Immunität. Gerät dieses komplizierte Regelwerk aus dem Gleichgewicht, können schwere Erkrankungen autoimmuner oder atopischer Genese resultieren.

Der erste Teil der Arbeit befaßt sich mit zwei Aspekten der zellulären Immunantwort. Allergische Immunantworten sind durch die Typ 2 T Zellantwort charakterisiert. Für die Induktion einer Typ 2 Antwort wird Interleukin-4 benötigt, dessen Herkunft nicht geklärt ist. NK1.1 positive T Zellen als Quelle des initialen IL-4 konnten durch in vivo und in vitro Messung von allergie-spezifischen Parametern ausgeschlossen werden.

Der MHC-Komplex präsentiert T Zellen Antigene in Form von Peptiden. Pathologische T Zellantworten können durch fortwährende Antigenpräsentation unterhalten werden. Durch Untersuchungen zur molekularen Charakteristik der MHC - Peptid Interaktion ließen sich Bindungsmotive so verfeinern, daß Peptide mit sehr starker Bindung an den MHC ohne gleichzeitige Erkennungssequenz für den T Zellrezeptor entwickelt werden konnten. Peptide dieser Art könnten zur Blockierung einer pathologischen T Zellantwort genutzt werden.

Für viele immunologische Erkrankungen ist die Beteiligung genetischer Faktoren beschrieben worden. Der zweite Teil der Arbeit befaßt sich mit der Bedeutung genetischer Disposition bei Allergien im Mausmodell. Homozygote Inzuchtstämme konnten als High- und Low-Responder für den Phänotyp "allergische Soforttypreaktion der Haut" gegenüber

Birkenpollenextrakt definiert werden. Die Phänotypisierung der F1 Generation wies auf dominante Vererbung hin, die informative Rückkreuzung auf die Beteiligung von mindestens zwei Genen für die Ausprägung des Merkmals. Wie die Analyse MHC congener Mäuse zeigte, entspricht einer dieser Loci dem MHC Komplex. Durch eine genomweite Kartierung mit Mikrosatelliten wurde als weiterer Kandidat der IL-5 Rezeptor identifiziert. Die detaillierte Analyse des Gens in High- und Low-Respondern weist auf eine Anzahl funktionell bedeutsamer Polymorphismen hin. Dabei imponiert das Low-Responder Allel als Suszeptibilitätsallel. Die Unterschiede haben Auswirkung auf Transkription/Translation und Spleißvorgänge, die zu quantitativer Differenz der Genprodukte führt. Die Daten weisen damit auf einen regulatorischen Mechanismus hin, da die Proteinstruktur des Rezeptors bei High- und Low-Respondern identisch ist.

I. Aspekte der Regulation und Dysregulation zellulärer Immunität

1. Einleitung

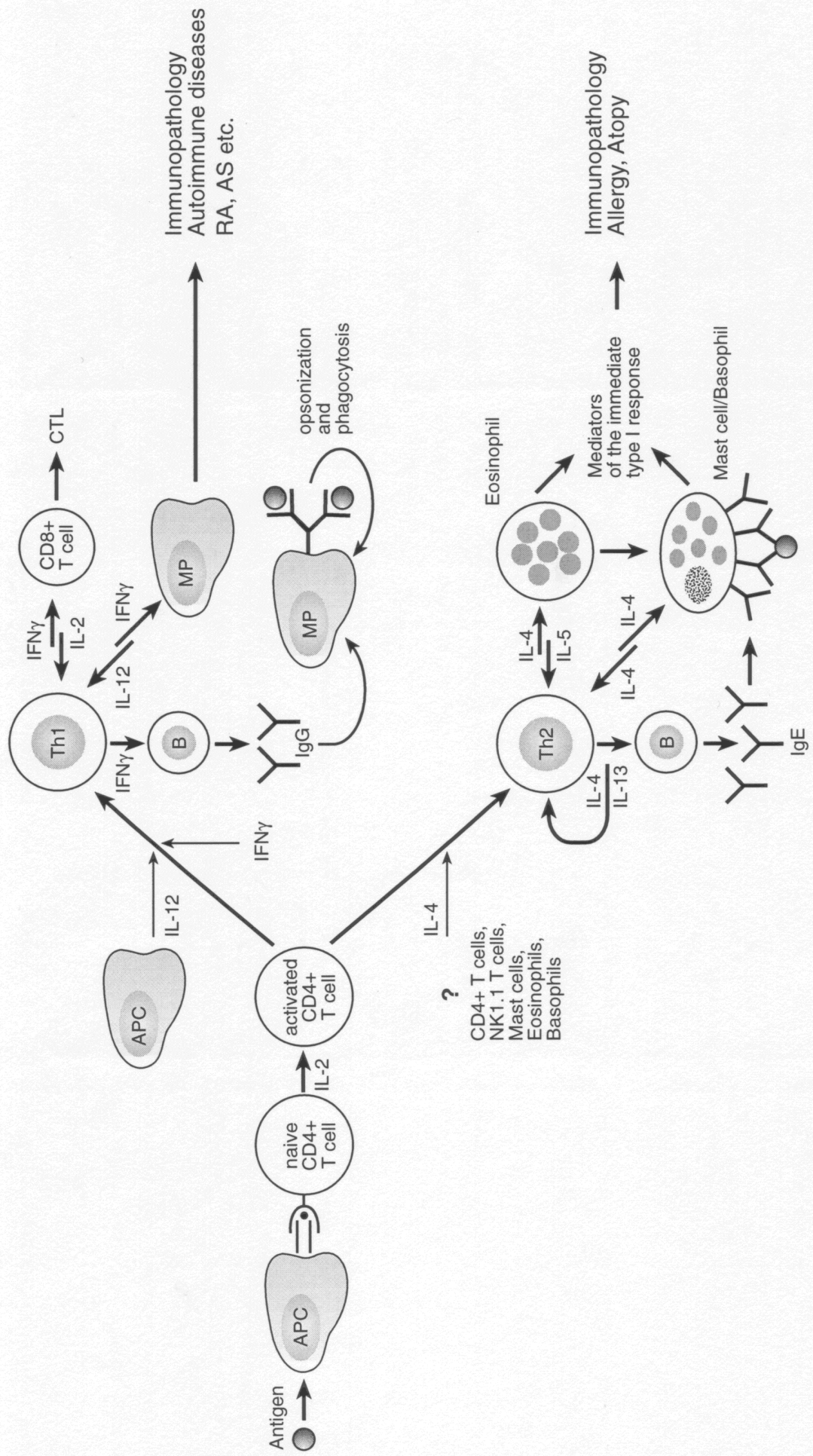
[siehe beiliegende Publikation Nr. 1]

Wesentliche Funktionen des Immunsystems stützen sich auf die zelluläre Immunität. CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen werden nach Antigenkontakt aktiviert und wirken im Falle der CD8⁺ T Zellen direkt auf die zu zerstörenden Zellen ein - die sogenannte cytotoxische Immunantwort - oder bahnen und dirigieren die Effektorfunktionen durch Interaktion mit anderen Immunzellen über Zellkontakte und lösliche Faktoren, die Zytokine. Diese sehr komplexe Immunregulation wird wesentlich mitbestimmt von CD4⁺ T Zellen, den sogenannten T Helferzellen. Diese lassen sich nochmals unterteilen in zwei Subsysteme: T Helfer 1 (Th1) und T Helfer 2 (Th2) Zellen (Mosmann et al, 1986; zusammengefaßt in Daser et al, 1995, Abbas et al, 1996, O'Garra et al, 1998). Die wichtigsten Partner dieser Interaktion und Reaktion sollen im folgenden kurz beschrieben und in Abb. 1 schematisch dargestellt werden:

Wenn ein Antigen in den Organismus gelangt, wird es von antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, prozessiert und in Fragmentform zusammen mit MHC der Klasse I oder II auf der Zelloberfläche präsentiert. T Zellen erkennen diese Antigenfragmente, die sogenannten Epitope mit Hilfe des T Zellrezeptors (TCR); hierbei bildet sich ein trimolekularer Komplex aus MHC, Epitop und TCR aus, wobei CD8⁺ T Zellen nur mit MHC Klasse I, CD4⁺ T Zellen nur mit MHC Klasse II

Initiation phase

Effector phase



interagieren können. Durch diese Kontakte und weitere kostimulatorische Zell-Zell-Interaktionen und Zytokine werden die T Zellen aktiviert - es entstehen reife T Zellen, die nun ihre Effektorfunktionen ausführen.

Abbildung 1. Induktion und Funktion der Th Immunantworten. Durch Erstantigenkontakt werden naive T Zellen aktiviert und sezernieren IL-2. Durch das sie umgebende Zytokinmilieu entwickeln sie sich dann weiter in Th1 oder Th2 Effektorzellen, die die Qualität der resultierenden Immunantwort bestimmen. Die Zytokine der jeweiligen Th Subpopulation wirken inhibierend auf die andere Subpopulation, d.h. IFN- γ wirkt inhibierend auf die Proliferation von Th2 Zellen und IL-4 inhibierend auf Th1 Zellen.

Dabei können prinzipiell zwei Wege eingeschlagen werden: Th1 und Th2 Antwort, die sich funktionell unterscheiden. Bestimmt wird die Richtung dieser Antwort durch mehrere Faktoren; ein Hauptfaktor ist das Zytokinmilieu, in dem diese Zellinteraktion stattfindet. Findet sich zu diesem Zeitpunkt Interleukin (IL-) 12 in der Umgebung der antigenstimulierten T Zellen, entwickelt sich eine Th1 Antwort; in Gegenwart von IL-4 wird die Richtung einer Th2 Antwort eingeschlagen. Die funktionellen Unterschiede von Th1 und Th2 sind wie folgt:

Th1 Zellen sind hauptsächlich verantwortlich für die zelluläre Immunität mit der Eliminierung mikrobieller Pathogene. Effektorzytokine der Th1 Zellen sind IFN- γ und IL-2. Im Falle einer Dysregulation kommt es zur Autoimmunität mit schweren Krankheitsbildern wie systemischem Lupus Erythematoses (SLE), Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises und juvenilem Diabetes. Eine Th2 Immunantwort steuert die humorale Immunität; physiologischerweise wird sie beispielsweise in Gang gesetzt bei Wurminfektionen. Effektorzytokine sind IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die aktivierend auf Mastzellen, Eosinophile, Basophile und B Zellen wirken. Bei

Dysregulation in Richtung Th2 kommt es ebenfalls zu gravierenden Störungen - Allergien, Atopie und atopisches Asthma.

Entsprechend ist es wichtig, sowohl die genaue Regulation in der Entstehungsphase zu kennen als auch Zielmoleküle therapeutischer Intervention zu definieren. Im folgenden werden eigene Arbeiten zu diesen beiden Aspekten zusammengefaßt.

2. NK1.1 T Zellen sind nicht die Quelle des initialen IL-4

[siehe beiliegende Publikation Nr. 2]

Bei der Polarisierung in die Th1 Richtung sezernieren aktivierte APC IL-12, das wiederum IFN- γ in naiven T Zellen induziert. Im Gegensatz dazu ist bei der Entstehung der Th2 Antwort ein wichtiger Zytokinproduzent noch unbekannt: für die Th2 Entwicklung wird IL-4 benötigt, das von bereits differenzierten Th2 Zellen und anderen immunkompetenten Zellen dann produziert wird, wenn sie von Th2 Zellen aktiviert wurden. Die Quelle des initialen IL-4 ist also unbekannt.

Von einer Zellpopulation, den NK1.1 T Zellen, weiß man, daß sie sehr früh in der Immunkaskade IL-4 produzieren. Die mögliche Rolle dieser Zellen für die Bereitstellung von initialem IL-4 läßt sich in NK1.1 defizienten Mäusen stringent untersuchen. Zunächst beschrieben Yoshimoto et al. 1995, daß bei Fehlen dieser Population nach einem polyclonalen T oder B Zellstimulus weder frühes IL-4 detektierbar war noch das von IL-4 und Th2 abhängige Immunglobulin IgE. Diese Ergebnisse machten NK1.1 T Zellen zu sehr interessanten Kandidaten für die Initiation einer Th2 Antwort. Entsprechend wurden physiologischere Stimuli als anti-T-Zell- und anti-B-Zell-Antikörper eingesetzt, um die Rolle der NK1.1 T Zellen zu überprüfen. Die Infektion mit Parasiten oder das Verabreichen bestimmter Proteinantigene, die in Wildtypmäusen mit funktionierenden NK1.1 Zellen zu einer Th2 Antwort führt, induzierte auch in den defizienten Mäusen die adaequate Th2 Antwort mit IL-4 und IgE Produktion (Brown et al, 1996, von der Weid et al, 1996, Zhang et al 1996, Daser et al. 1998). Um zu untersuchen, ob dennoch quantitative Differenzen in den Effektorfunktionen entstehen, wenn diese IL-4 Quelle fehlt, wurde als empfindlicher Parameter die IgE abhängige

Sofortreaktion der Haut nach lokaler Allergenexposition quantifiziert - auch hier ergaben sich keinerlei Differenzen zwischen Wildtypmäusen und defizienten Mäusen (Daser et al. 1998). Welche Zellen also das Th2 induzierende IL-4 Milieu bereitstellen bleibt nach wie vor unklar, als Kandidaten gelten weiterhin T Zellen, Mastzellen, basophile und eosinophile Granulozyten.

3. Durch Intervention im trimolekularen MHC - Peptid - TCR - Komplex sollte eine pathologische Immunantwort blockiert werden können

[siehe beiliegende Publikationen Nr. 3 - 7]

HLA B27 ist ein MHC Klasse I Molekül, das stark mit einem chronisch entzündlichen Krankheitsbild autoimmuner Genese assoziiert ist - der ankylosierenden Spondylitis (M. Bechterew). Auch eine zweite Gruppe chronisch entzündlicher Krankheiten ist mit HLA-B27 assoziiert: die reaktiven Arthritiden (ReA) nach bakteriellen Infektionen. Während im ersten Falle das Pathogen bzw. Autoantigen unbekannt ist, ist im zweiten Falle der auslösende Organismus bekannt und kann damit als ein Modell für die Untersuchung immunpathologischer Mechanismen und möglicher Therapieansätze benutzt werden (zusammengefaßt in Burmester et al, 1995).

Zu Beginn der 90er Jahre war es technisch möglich geworden, Epitope aus ihren MHC Molekülen herauszulösen und zu analysieren (Falk et al, 1991, 1994; Jardetzky et al, 1991). Außerdem war es gelungen, mehrere MHC Klasse I Moleküle zu kristallisieren und über Röntgenstrukturanalysen die MHC - Epitopbeziehung zu analysieren (Bjorkman et al, 1987a,b; Madden et al, 1992). Das hieraus resultierende Bild ist wie folgt: MHC Klasse I hat eine genau definierte Bindungsfurche mit festgelegten Ankerpositionen für das Epitop; dieses Epitop ist ein Peptid von etwa 9 Aminosäuren. Die Anforderungen der MHC Klasse II Moleküle sind geringer, da sowohl Ankerpositionen als auch Peptidlänge variabler sind. Diese Daten erlaubten auch die Entwicklung eines Modelles über die räumlichen Beziehungen des trimolekularen Komplexes MHC - Peptid - TCR. Damit kann man u.a. die Regionen des Peptids

bestimmen, die dem TCR zugewandt sind und die Antigenerkennung durch die T Zelle ermöglichen. Für ein MHC Klasse I Molekül - HLA B27 ist dies in Abbildung 2 schematisch dargestellt (Scapozza et al., 1995).

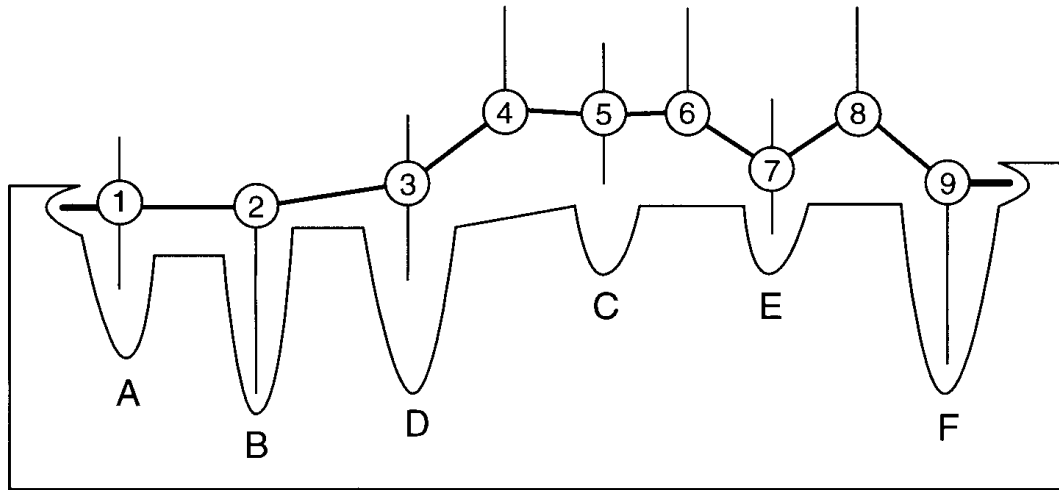


Abbildung 2. Schematische Darstellung eines Nonamerpeptides (P1 - P9) in der Bindungsgrube von MHC Klasse I, exemplifiziert an HLA-B27. HLA-B27 enthält 6 Bindungstaschen A - F, in die mehr oder weniger restringierte Ankerseitenketten des Peptids hineinragen. Hauptanker sind die Taschen B und F mit den Seitenketten 2 und 9, weitere Ankerpositionen mit etwas größerer Flexibilität sind die Seitenketten P1, 3, 5 und 7. Kontakte zum TCR sind angedeutet durch senkrechte Linien nach oben, d.h. die Positionen P1, 3, 4, 5, 6, 7 und 8, während P2 und P9 so tief in der Grube liegen, daß sie nicht an der Interaktion teilnehmen. Besonders zugänglich für den TCR ist der mittlere Teil des Peptids, der sich entsprechend für Modifikationen anbietet.

Ein therapeutischer Ansatz zur Unterdrückung einer pathologischen T Zellreaktion ist die Modifizierung der T Zellerkennungssequenz bei gleichzeitiger Bindung und damit Blockierung des korrespondierenden MHC Moleküls. Durch genauere Peptidbindungsstudien immundominanter Proteine von *Chlamydia trachomatis* und *Yersinia enterocolitica*, relativ häufiger Erreger von ReA, ließen sich die Regeln für Peptidbindung präzisieren und erlaubten die Vorhersage möglicher T Zellepitope (Daser et al, 1994, Mertz et al 1994); durch Computersimulation können darüberhinaus

nicht in der Natur vorkommende Liganden entworfen werden (Rognan et al. 1994), die einerseits stark mit den Taschen des MHC Moleküls interagieren, andererseits keinerlei Bindungsmotiv für den TCR bieten (Rognan et al. 1995). Mit dieser Vorgehensweise lassen sich Peptidomimetika entwerfen und testen, die pharmakologisch den echten Peptiden überlegen sind und gleichzeitig mit einer pathologischen HLA-B27 restringierten T Zellantwort kompetieren, damit also großes therapeutisches Potential haben (Krebs et al, 1998). Des weiteren ist vielfach experimentell gezeigt worden, daß durch Änderung der Bindungsaffinität zwischen MHC und Peptid eine Modulation hin zur protektiven Immunantwort induziert werden kann (zur Übersicht s. Constant und Bottomly, 1997). Eine Änderung der Bindungsaffinität zwischen MHC und Peptidomimetikum hätte damit auch die Perspektive des langfristigen therapeutischen Erfolgs.

II. Genetik immunologischer Erkrankungen

1. Einleitung

Sowohl für Autoimmunerkrankungen als auch Allergien bzw. Atopie ist bekannt, daß es sich hierbei um multifaktorielle, polygenetische Erkrankungen handelt. In Zeiten der klassischen Genetik wurde vor allem der MHC als *der* immundominante Locus beschrieben, mit dem diverse immunpathologische Phänotypen assoziiert sind. Durch Nutzung molekularbiologischer Methoden konnte man Polymorphismen in einzelnen Kandidatengenen mit Krankheitsphänotypen korrelieren. Die Beschränkung dieser Vorgehensweise liegt allerdings auf der Hand: der jeweilige Kenntnisstand bestimmt die Qualität der Kandidatenwahl. Durch Weiterentwicklung der Methode verschaffte man sich Zugang zum gesamten Genom (Botstein et al 1980); aber erst die Entdeckung der Mikrosatelliten und ihrer Beziehung zu Genen erlaubte eine zügige Kartierung verschiedener Genome (N.N. 1992, Dietrich et al 1994). Mikrosatelliten können als chromosomale Marker aufgefaßt werden; es sind repetitive Sequenzen, die bei Mensch und anderen Spezies relativ gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt sind. Die Mikrosatelliten dienen also als Sonden, um chromosomale Regionen aufzuspüren, die bei positiver Kopplungsanalyse einer genauen genetischen Untersuchung unterzogen werden müssen. Durch die Aktivitäten des Human Genome Project und des Mouse Genome Project (Deloukas et al 1998, Collins 1999, Nusbaum et al 1999, Van Etten et al 1999), werden in den nächsten Jahren die Genome dieser beiden Spezies kartiert und sequenziert; es wird damit immer

wahrscheinlicher, tatsächlich auch ein relevantes Gen zu finden, das sich in der Nähe eines Mikrosatellitenpolymorphismus befindet.

2. Die allergische Sofortreaktion gegen Birkenpollen in der Maus: Definition zweier Mausinzuchtstämme als High- und Low-Responder und Phänotypisierung informativer Nachkommen

[siehe beiliegende Publikation Nr. 8, Manuskript Nr. 11]

Die genaue Definition des zu untersuchenden Phänotyps ist eine wesentliche Voraussetzung und gleichzeitig prinzipielle Schwierigkeit für die erfolgreiche Durchführung jedes Genomscreenings oder Genomscans. Im humanen System ist dies besonders schwierig, weil uneinheitliche diagnostische Kriterien, unterschiedlicher Beginn der Erkrankung, unterschiedliche äußere Einflüsse und Zugehörigkeit zu unterschiedlichen Populationen zu uneinheitlichen Phänotypen und zu häufig nicht reproduzierbaren Genotypen führen. Des weiteren erfordert die enorme Allelheterogenität der genetisch hochvariablen Spezies Mensch extrem große Untersuchungsgruppen, um signifikante Ergebnisse zu erhalten (zusammengefaßt in Lander und Schork 1994).

Im Tiermodell lassen sich diese Probleme umgehen: es gibt viele verschiedene homozygote Inzuchtstämme, es lassen sich der Phänotyp und die äußeren Faktoren genau festlegen und modifizieren und es lassen sich genetisch informative Nachkommen züchten. Bedingung für die sinnvolle Anwendung eines Tiermodelles sind die prinzipielle Ähnlichkeit des zu untersuchenden Systems, in diesem Falle also des Immunsystems und eine größtmögliche Ähnlichkeit des zu untersuchenden Phänotyps. Der hier geschilderte Phänotyp erfüllt beide Bedingungen: Immunsystem von Mensch und Maus sind sehr ähnlich; und die IgE abhängige Sofortreaktion der Haut läßt sich bei Mäusen durch Immunisierung mit allergenen

Proteinen induzieren, ein Phänotyp also, der alle Kriterien der allergischen Sofortreaktion erfüllt.

Für genetische Analysen günstig sind qualitativ oder quantitativ gut zu diskriminierende Merkmale. Es wurden deshalb mehrere Mausinzuchtstämme mit Birkenpollenextrakt immunisiert: A/J, AKR, BALB/c, C57BL/6 und DBA/2. Dabei erwiesen sich A/J als High-Responder, C57BL/6 (B6) als Low-Responder (Daser et al 1998), während die anderen drei Stämme eine intermediäre Hautreaktion zeigten (unpubliziert). Abbildung 3 zeigt die Reaktion, die im weiteren als IC_HS = ImmEDIATE CUTANEUS HYPERSENSITIVITY bezeichnet wird.

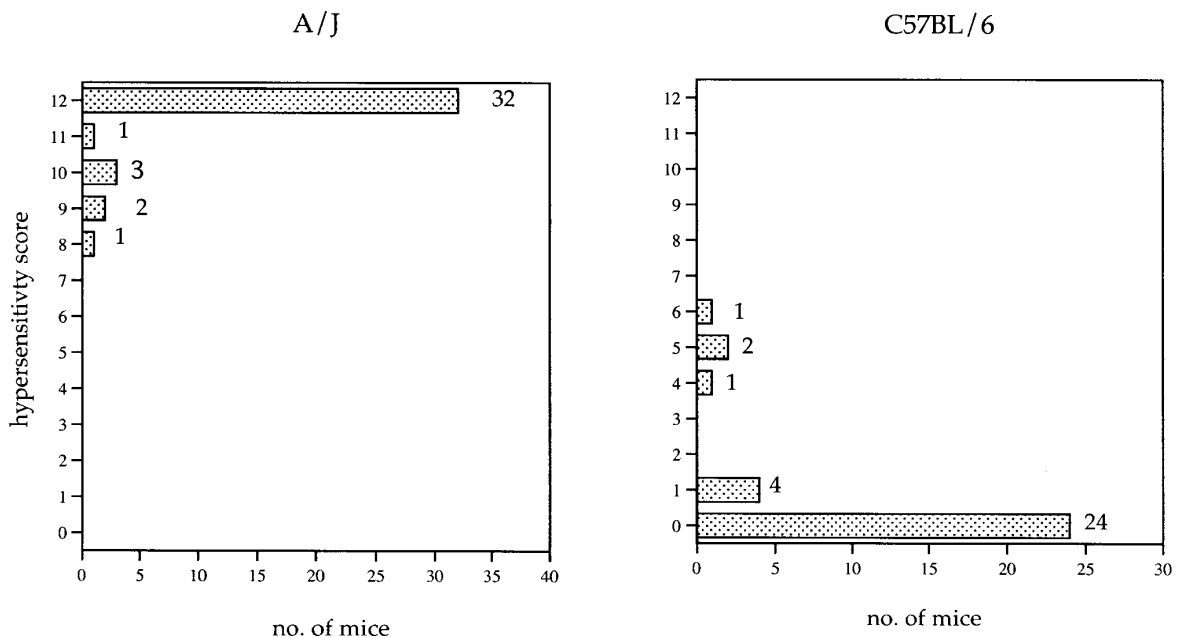


Abbildung 3. Immediate Cutaneous Hypersensitivity Scores von 39 A/J und 32 B6 Mäusen. Der Score ist die Summe der Hautreaktionen nach Injektion von vier verschiedenen Konzentrationen von Birkenpollenextrakt und ist auf der y Achse aufgetragen. Auf der x Achse ist die Anzahl der Mäuse angegeben.

Die aus der Kreuzung von A/J und B6 Elterntieren resultierenden F1 Hybride reagieren ebenso wie A/J als High-Responder, allerdings waren 3 von 27 Mäusen Low-Responder. Der Phänotyp imponiert also als dominantes Mendel'sches Merkmal mit inkompletter Penetranz. Um die

Segregation verantwortlicher Gene für die Expression des Phänotyps untersuchen zu können, ist die informativste Kreuzung eine Rückkreuzung auf den rezessiven Elternteil, also auf B6. Entsprechend wurden F1 Hybride mit B6 Tieren gekreuzt, die resultierenden 152 Backcrossstiere (N2bB6) ebenfalls phänotypisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 zusammengefaßt:

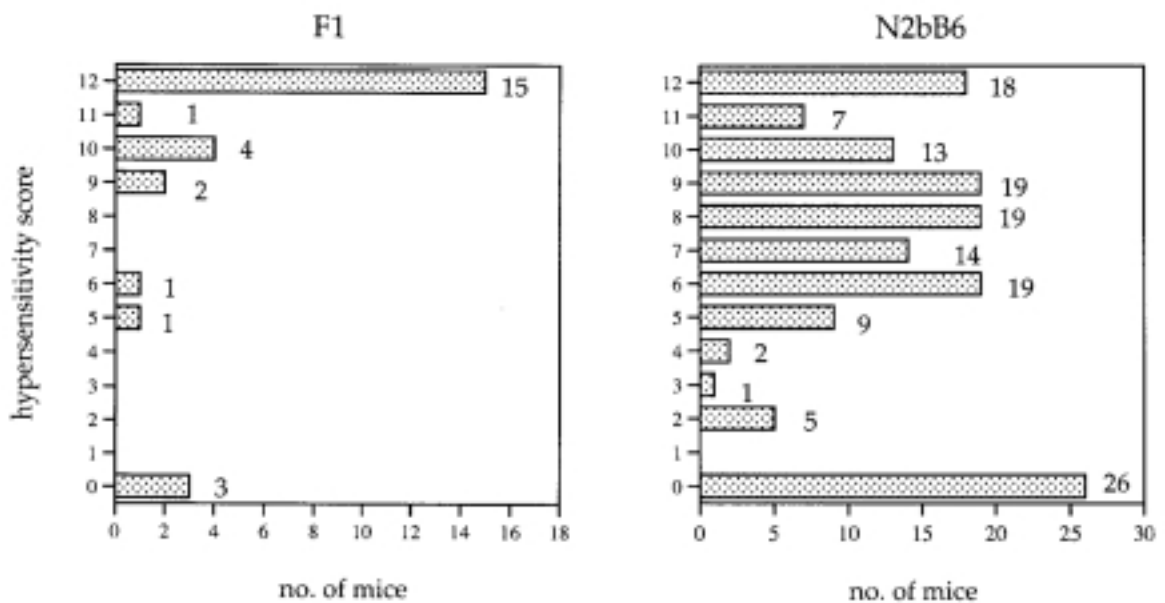


Abbildung 4. ICHS von 27 F1 Hybriden und 152 Backcross Mäusen.

Zusätzlich zu High- und Low-Respondern findet sich eine dritte Gruppe mit intermediärer Reaktion, die Aufteilung ist etwa im Verhältnis 1 : 2 : 1 wie bei einem Erbgang mit mindestens zwei beteiligten Genen. Entsprechend liegt diesem Phänotyp ein Erbgang mit mehreren beteiligten Genen zugrunde - das Modell eignet sich also gut für eine Genotypanalyse eines komplexen immunologischen Merkmals.

Die Rolle von MHC- und Nicht-MHC-Genen wurde in zwei verschiedenen Ansätzen untersucht: der MHC in dafür speziell gezüchteten Mäusen, alle weiteren möglichen Gene durch einen Genomscan.

3. Der MHC ist auf homozygotem Hintergrund immundominant.

[unpubliziert; Dissertation von Nina Bätjer]

Vor den Zeiten molekularbiologischer Genmanipulation hat man durch systematische Kreuzungen Mauslinien und -stämme gezüchtet, die ebenso wie transgene Mäuse informativ sind für die Bedeutung einzelner Genloci auf ausgewählten genetischen Hintergründen; sie werden als congenere und recombinante Inzuchtstämme bezeichnet (Snell 1978). Eine wichtige solche Zuchtlinie zur Analyse des Einflusses des MHC (bei Mäusen als H-2 Locus bezeichnet) auf die verschiedensten immunologischen Phänotypen sind congenere Stämme, bei denen auf dem homozygoten Hintergrund eines Stammes der homozygote H-2 Locus eines anderen Stammes eingekreuzt ist. Für die parentalen Stämme A/J und C57BL existiert ein solcher Stamm, die sogenannten B10A Mäuse, wobei B10 für C57BL/10 steht und A für den eingekreuzten H-2 Haplotyp von A/J. Im Verlauf jahrzehntelanger Zucht haben sich verschiedene Mausstämme in Untergruppen aufgespalten, so auch C57BL in B6 und B10 - die genetische Entfernung zwischen den Stämmen läßt sich u. a. durch Mikrosatellitenanalysen relativ gut abschätzen (Schalkwyk et al 1999) und ist sehr gering. Unter der Voraussetzung, daß B10 Mäuse ebenso Low-Responder sind wie B6 Mäuse können die congenen B10A zeigen, in welchem Ausmaß der MHC bei homozygotem Genom die Expression der allergischen Hautreaktion beeinflußt. In Tabelle 1 sind die Haplotypen der 4 Stämme mit dazugehöriger Immunreaktion aufgelistet: B10 sind wie B6 Low-Responder, also geeignet für diese Fragestellung. B10A reagieren in gleicher Weise wie A/J Mäuse als High-Responder. Der H-2 Haplotyp von A/J alleine ist also ausreichend, um einen Low-Responder in

einen High-Responder zu konvertieren. Das impliziert zum einen, daß der MHC homozygot dominant die Expression dieses immunologischen Phänotyps bestimmt; zum zweiten, daß der C57BL/6 - bzw. C57BL/10 Hintergrund im homozygoten Zustand ein High-Responder Background ist und bei Anwesenheit des adaequaten H-2 Haplotyps eine Maximalreaktion erlaubt. Weiterhin zeigt es, daß der H-2^b Haplotyp des B6 Stammes, wie auch in anderen Systemen gezeigt (Silver und Lane 1975, Mitchison et al 1999), suppressiv wirken kann.

Tabelle 1

Stamm	H-2 Locus						ICHS
	K	A β	A α	E β	E α	D	
A/J	k	k	k	k	k	d	high response
B6	b	b	b	b	b	b	low response
B10	b	b	b	b	b	b	low response
B10A	k	k	k	k	k	d	high response

Allelzusammensetzung verschiedener H-2 Haplotypen. Die Loci K und D sind Klasse I Loci, A und E Klasse II Loci.

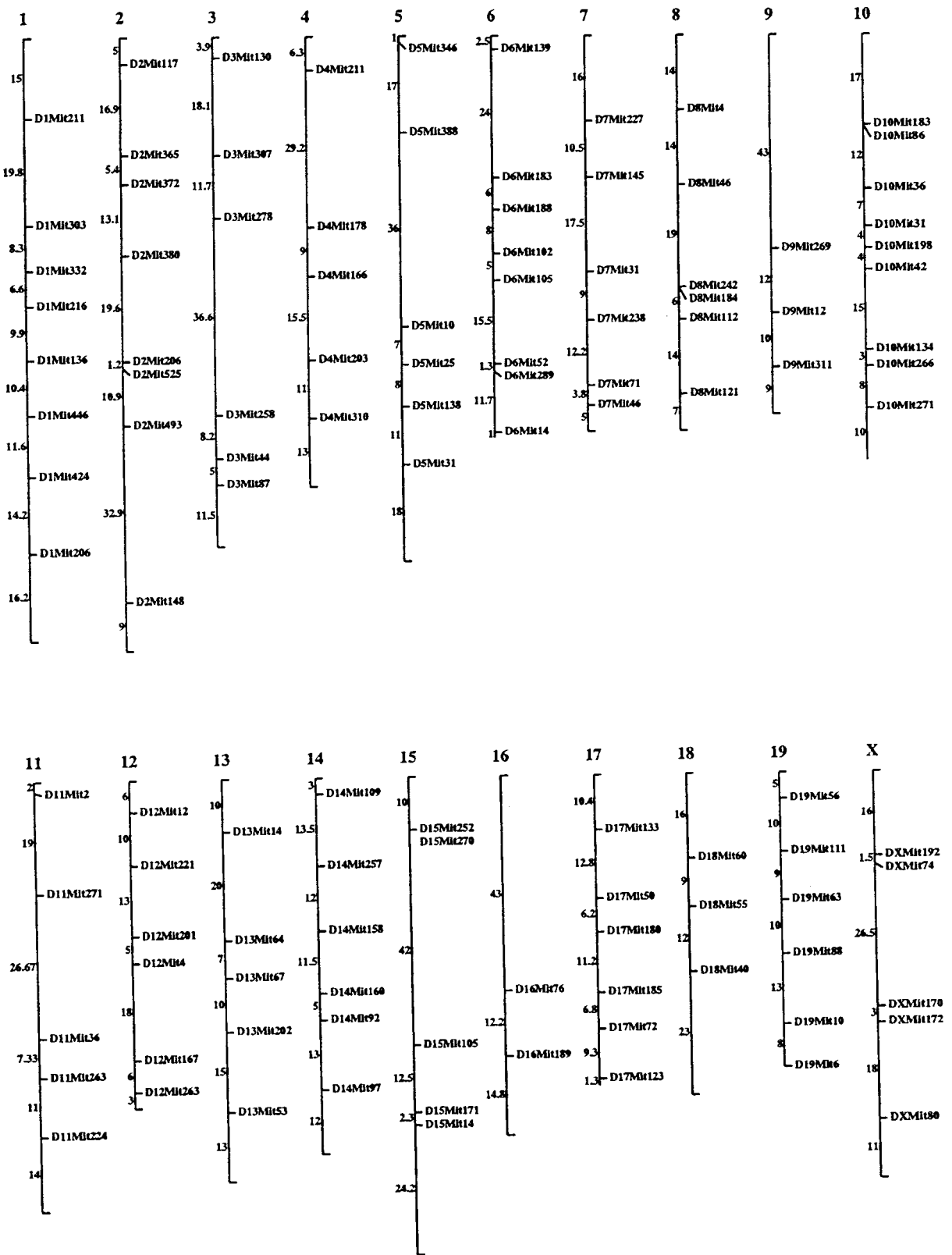
4. Der Genomscan weist auf ein Kandidatengen auf Chromosom 6 hin

[siehe beiliegende Publikation Nr. 9, Manuskript Nr. 11]

Die F1 Generation zweier homozygoter Inzuchtstämme ist genetisch völlig homogen, dennoch waren bei der Phänotypisierung 3 von 27 F1 Tieren (11%) Low-Responder. Scheidet aufgrund entsprechender Kontrollen ein technischer Fehler aus, läßt sich dieses Phänomen mit dem Vorliegen inkompletter Penetranz erklären. Dies bedeutet, daß der Phänotyp den zugrunde liegenden Genotyp nicht vollständig abbildet, daß also die Segregationsanalyse des zu untersuchenden Genotyps nicht, wie bei vollständiger Penetranz, durch den Phänotyp eindeutig ist. Damit ist auch der Informationsgehalt der verschiedenen Responder-Gruppen des B6 Backcrosses unterschiedlich: die Gruppe der High-Responder hat im Verhältnis zu Low- und intermediären Respondern die größte statistische Aussagekraft.

Entsprechend wurde die DNA aller High-Responder und einer Auswahl intermediärer und Low-Responder einer Mikrosatellitenanalyse unterzogen. Die Vorgehensweise war wie schon kurz angedeutet die eines Genomscans, d. h. auf allen Autosomen und dem X Chromosom wurden Mikrosatelliten in regelmäßigem Abstand analysiert. Die Mikrosatelliten wurden aus der MIT Datenbank (Dietrich et al 1996) so ausgewählt, daß die Marker informativ waren für die hier zu untersuchenden A/J und B6 Stämme und neun weitere sehr häufig untersuchte Inzuchtstämme (Schalkwyk et al 1999). Abbildung 5 zeigt die Verteilung der Marker für alle Chromosomen.

Abbildung 5. Verteilung der Mikrosatelliten auf den Autosomen und Chromosom X, die informativ sind für folgende Mausstämme: A/J, AKR BALB/c, C3H, C57BL/6, C57BL/10, DBA/2, SJL, 129/J, JF1 und PWB.



Der Genomscan wurde mit der DNA von 89 Backcross-Mäusen und jeweils 120 Mikrosatelliten durchgeführt. Die Kopplungsanalyse mit Mapmaker QTL (Lander et al 1987) erbrachte für den Mikrosatellitenlocus D6Mit105 bei 45 cM auf Chromosom 6 einen lod score von 2,4. Bei einer Backcross Analyse liegt ein signifikantes Ergebnis entsprechend den Kriterien von Lander und Kruglyak (1995) bei einem lod score $> 3,3$. Wahrscheinliche Kopplung (suggestive linkage) wird bei einem lod score $> 1,9$ angenommen und sollte weiterverfolgt werden. Obwohl also die Kopplungsanalyse mit 2,4 kein Signifikanzniveau erreichte, ist das Ergebnis interessant: (i) die statistische Aussagekraft und die Zahl der informativen Tiere ist bei Annahme von inkompletter Penetranz relativ gering. In einem solchen Falle ist ein lod score von 2,4 ein auffälliges Ergebnis. (ii) Der Verlauf der Signifikanzen für die Mikrosatelliten auf Chromosom 6 ist sehr distinkt und damit plausibel (Abb. 6). (iii) Ganz in der Nähe von D6Mit105 ist das Gen für einen plausiblen Kandidaten lokalisiert: der IL-5 Rezeptor (IL-5R).

Die präferentielle Transmission des B6 Allels in Low-Respondern wurde durch eine Kosegregationsanalyse auf Chromosom 6 untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 6 dargestellt.

Überraschenderweise waren nur 19% der Low-Responder homozygot für D6Mit105. Umgekehrt sind 81% der Low-Responder heterozygot, tragen also auch das Allel des High-Responderstammes A/J. Das heißt, daß es für eine Low-Response guenstiger ist, nur ein B6 Allel zu haben - das B6 Allel ist ein Suszeptibilitätsallel, dessen Wirkung bei homozygotem B6 Background durch Wechselwirkung mit anderen Genen unterdrückt wird, bei einer Genmixture wie bei einer Backcross-Generation aber eine High-Response stark begünstigt. Für die High-Responder ist die Anwesenheit des High-Response-

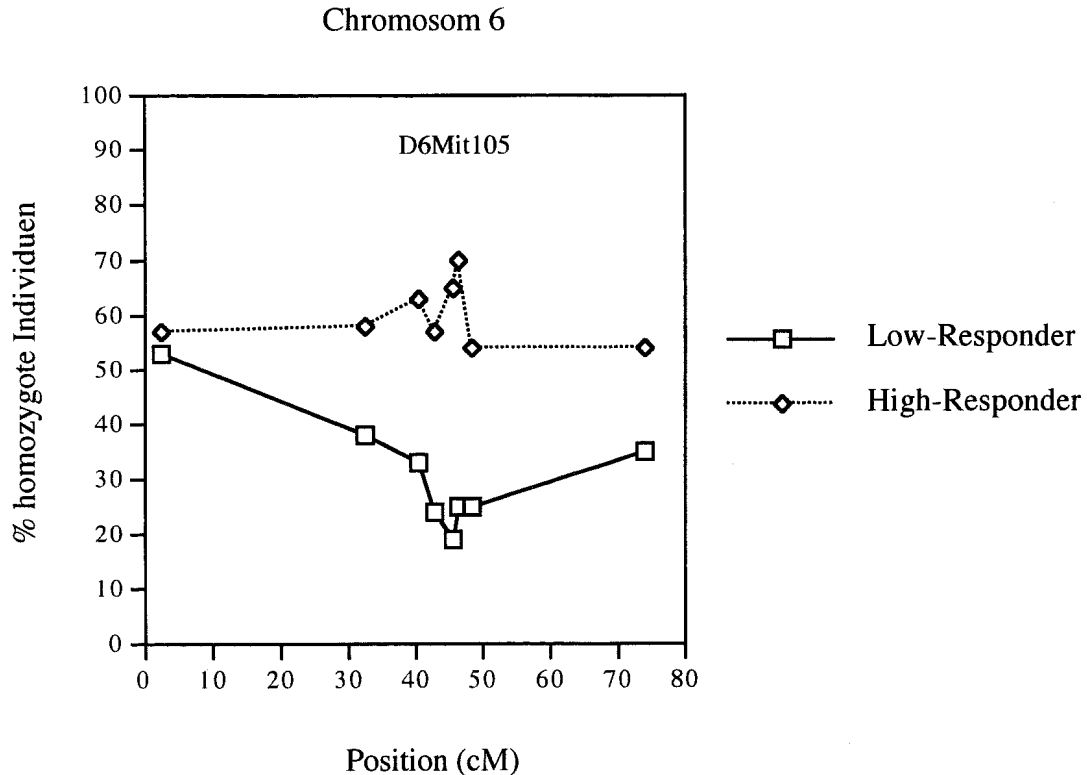


Abbildung 6. Kosegregationsanalyse von 24 High-Respondern und 21 Low-Respondern aus der Backcross Generation. Auf der x-Achse ist die biologische Lokalisation der Mikrosatelliten auf Chromosom 6 in Centimorgan (cM) angegeben, auf der y-Achse die Anzahl der Tiere in %, die homozygot sind für den jeweiligen Mikrosatelliten.

Allels im homozygoten Zustand weniger stringent, denn 35% der High-Responder sind heterozygot. Das heißt also, daß das B6 Allel nicht notwendige Bedingung für eine High-Response ist, daß aber die Wirkung des B6 Allels homozygot auf gemischtem Background nur schwer durch andere Genprodukte zu kompensieren ist und entsprechend die überwiegende Zahl der Low-Responder nur ein B6 Allel tragen, also heterozygot sind. Ob tatsächlich das B6 Allel ein Suszeptibilitätsallel oder das A/J Allel ein protektives Allel ist, kann endgültig nur durch funktionelle Untersuchungen desjenigen Gens entschieden werden, das ebenso wie der Marker D6Mit105 mit dem Phänotyp gekoppelt ist.

Das Allelverteilungsmuster des MHC bei D6Mit105 heterozygoten Low-Respondern und High-Respondern ergibt folgendes Bild: die Abwesenheit eines Suszeptibilitätsallels ist ausreichend, den Einfluß des MHC zu neutralisieren, denn die heterozygoten Low-Responder zeigen eine etwa gleiche Verteilung von Homozygotie und Heterozygotie für den MHC. Dagegen interagiert der MHC bei heterozygoten High-Respondern: das Fehlen eines Suszeptibilitätsallels kann kompensiert werden durch die Anwesenheit des A/J MHC, denn 78% der High-Responder sind auch heterozygot auf dem MHC Locus.

5. Das Interleukin-5 Rezeptor Gen ist polymorph mit funktioneller Implikation für High- und Low-Response

[Manuskript Nr. 11]

IL-5 wird vor allem von aktivierten T Zellen, Mastzellen und Eosinophilen produziert; wichtigste Funktionen sind Differenzierung und funktionelle Reifung von Eosinophilen- und Basophilen- Vorläuferzellen und Aktivierung dieser Zellen (vgl. Abb. 1). IL-5 kann entweder alleine oder in Verbindung mit IL-3 und GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) die Differenzierung und Reifung der Vorläuferzellen stimulieren; an reifen Eosinophilen bewirkt IL-5 Zellmigration in die entsprechenden Gewebe und Freisetzung der granulären Proteine.

Der IL-5R ist ein Heterodimer mit IL-5 spezifischer α -Kette und unspezifischer β -Kette, die auch an die spezifischen α -Ketten von IL-3R und GM-CSF-R bindet. Die Bindung der β -Kette erhöht die Bindungsaffinität für IL-5 (Takaki et al 1990, Tavernier et al 1991), die Signaltransduktion erfolgt über α - und β -Kette (Takaki et al 1993, Ogata et al 1998). Während IL-3 und GM-CSF pleiotrope Aktivität haben, ist die Wirkung von IL-5 auf wenige Zelllinien beschränkt: beim Menschen auf Eosinophile und Basophile, bei der Maus zusätzlich noch auf B Zellen (zusammengefaßt in Takatsu 1998). Diese Linienspezifität wird im wesentlichen über die spezifische Expression der IL-5R α Kette geregelt (Takagi et al 1995), allerdings gibt es Hinweise auf weitere, noch nicht näher charakterisierte Faktoren (Pierce et al 1998). (Im folgenden wird für die IL-5R α Kette die Abkürzung IL-5R benutzt).

Die Genstruktur und Exonsequenz des IL-5R ist für Mensch und Maus publiziert (Takaki et al 1990, Murata et al 1992, Tuypens et al 1992, Imamura et al 1994). In beiden Spezies besteht das IL-5R Gen aus 11 Exons und 10 Introns. Promotoren und andere regulatorische Sequenzen sind oberhalb von Exon 1 lokalisiert. Der extrazelluläre Bereich des IL-5R Proteins weist drei Fibronectin Typ III ähnliche Domänen auf; damit gehört der Rezeptor in die Hämatoepoetin-Cytokin-Rezeptor Superfamilie. Diese Struktur ist hoch konserviert und geht auf ein gemeinsames Vorgängermolekül mit primitiver Zelladhäsionsfunktion zurück. Wie beim Menschen gibt es auch in der Maus drei Isoformen des IL-5R: eine membrangebundene und 2 lösliche Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen. In vitro antagonisieren die löslichen Isoformen die IL-5 Wirkung durch Bindung und damit Verhinderung der Bindung an die membrangebundene Form (Tavernier et al 1991, Kikuchi et al 1994). Ob dieser Effekt auch in vivo relevant ist, um beispielsweise über einen solchen negativen Feed Back Mechanismus lokale Entzündung zu reduzieren oder zirkulierendes IL-5 zu entfernen, ist nicht geklärt. Abbildung 7 zeigt Exon-Intron-Organisation des murinen IL-5R und alternative Spleißstellen der löslichen Isoformen.

Handelt es sich bei dem funktionell relevanten Locus, der durch die Mikrosatellitenkopplung von D6Mit105 angezeigt wurde, um den IL-5R, so muß auch er genetisch unterschiedlich sein zwischen A/J und B6 Mäusen. Deshalb wurde in den parentalen Stämmen nach solchen Polymorphismen gesucht und zwar zunächst auf cDNA Ebene: durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden Abschnitte der revers transkribierten mRNA amplifiziert und sequenziert. Sowohl in der codierenden als auch in den 5' und 3' untranslatierten Regionen (UTR) fanden sich Änderungen der Sequenz von B6 gegenüber A/J und der publizierten Sequenz von BALB/c, in einem Falle umgekehrt von A/J gegenüber B6 und BALB/c. Die

Basenaustausche in der codierenden Region führen nicht zur Veränderung der Aminosäuresequenz, entsprechend sind die IL-5R Proteine von High- und Low-Respondern identisch. Die Basenaustausche und Insertionen in der 3' UTR haben nach heutigem Kenntnisstand ebenfalls keine Konsequenz, wobei einschränkend angemerkt werden soll, daß 5' und 3' UTR möglicherweise weitere, noch unbekannte Sequenzen mit regulatorischer Funktion enthalten.

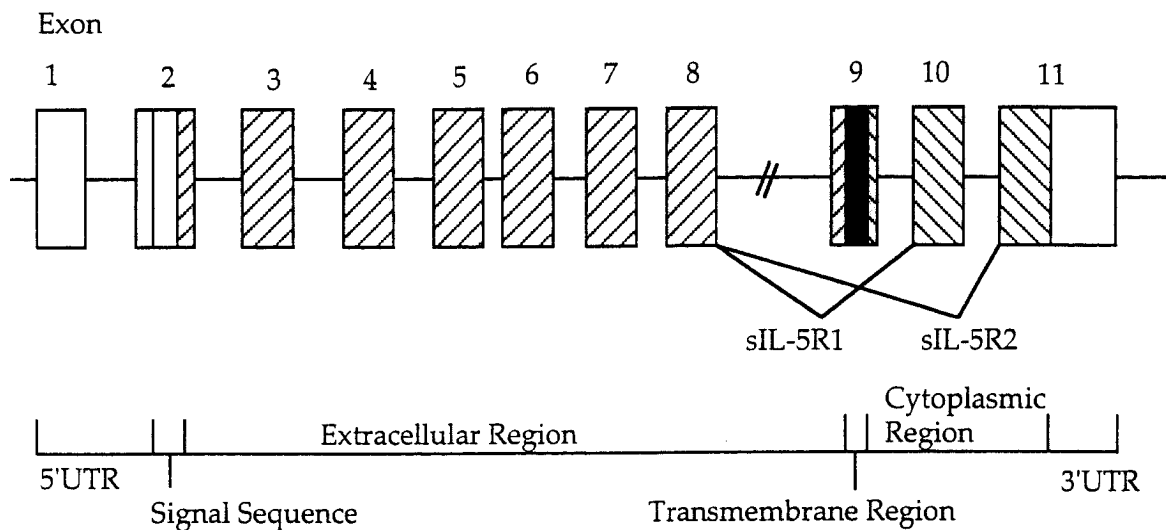


Abb. 7. Genetische Organisation des murinen IL-5R. Jede Box repräsentiert ein Exon. Exon 1 und 12 Nukleotide von Exon 2 bilden die 5' untranslatierte Region (UTR). Die verschiedenen Grautöne sollen die verschiedenen translatierten Bereiche des Rezeptors verdeutlichen: Signalpeptid, extrazelluläre Region, Transmembranregion und cytoplasmatische Region, die in Exon 11 endet und gefolgt wird von der 3' UTR. Die gestrichelten Linien veranschaulichen das alternative Spleißen mit den resultierenden beiden Isoformen (sIL-5R1, sIL-5R2) des löslichen IL-5R.

Die Analyse der 5' UTR gestaltete sich sehr komplex: die PCR Amplifikation zwischen potentiellen Exons dieser Region ergab immer mehrere Produkte, die sich zwischen B6 gegenüber A/J und BALB/c unterschieden. Die

Sequenzierung der verschiedenen Produkte erbrachte noch nicht publizierte Sequenzen von insgesamt 216 Basenpaaren; darüberhinaus erwiesen sich die einzelnen Produkte als unterschiedliche Spleißvarianten, die sich in ihrer Zusammensetzung zwischen High- und Low-Respondern unterschieden. Während sich von A/J cDNA sämtliche möglichen Pseudoexonkombinationen amplifizieren ließen, waren in B6 cDNA in den verschiedenen Kombinationen 2 Pseudoexons nie enthalten: Exon $\varphi 1$ und $\varphi 4$. Die Amplifizierung und Sequenzierung der entsprechenden Region von genomischer B6 DNA ergab, daß diese beiden Pseudoexons in genomischer DNA existieren, offensichtlich aber im Falle von B6 immer herausgespleißt werden. Welche Faktoren dieses differentielle Spleißen steuern ist unklar, ausgeschlossen wurde durch Sequenzierung der Exon-Intron-Übergänge ein Unterschied von Spleißdonor- und -acceptor Sites zwischen A/J und B6. Die 5' UTR ist wie in Abbildung 8 dargestellt organisiert:

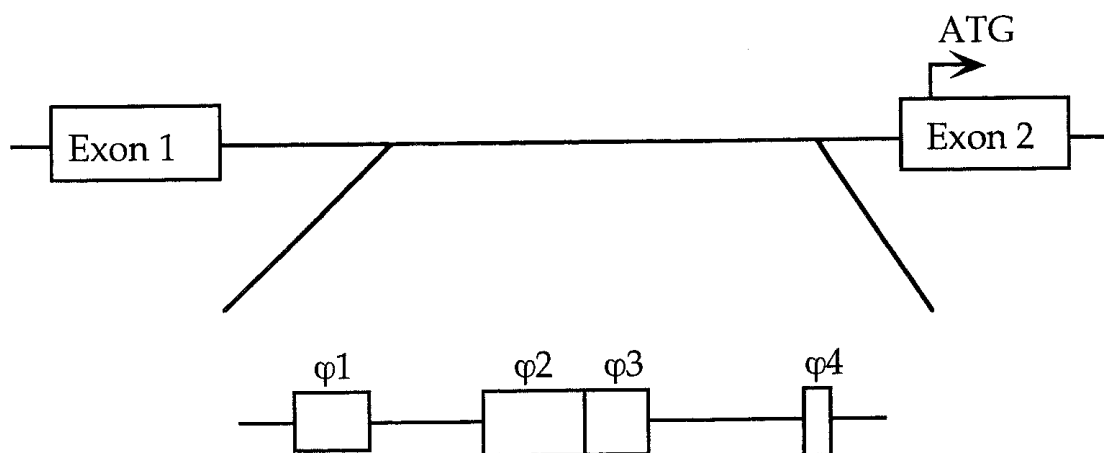


Abbildung 8. Genomische Organisation der 5' untranslatierten Region. Im Intron 1 liegen die vier Pseudoexons $\varphi 1$ (94 Nukleotide), $\varphi 2$ (122 Nukleotide), $\varphi 3$ (62 Nukleotide) und $\varphi 4$ (37 Nukleotide). Da $\varphi 2$ eine Spleißacceptor- und Branch Site enthält, wird es in A/J und B6 alternativ gespleißt.

Zwei wesentliche Implikationen dieses Ergebnisses sind: (i) obwohl sich A/J und B6 in der genomischen Struktur der 5' UTR nicht unterscheiden,

kommt es durch alternatives Spleißen zu stammspezifischen Unterschieden auf mRNA Ebene; (ii) die Längenvariation der verschiedenen Spleißprodukte impliziert unterschiedliche Sekundärstrukturen mit möglicher Konsequenz für Stabilität oder Translationseffizienz der einzelnen RNAs.

Ein Weg zur Messung unterschiedlicher Translationseffizienz in Folge unterschiedlicher Sekundärstruktur ist das Luziferase-Reportersystem: in einen geeigneten Vektor ist ein Luziferasegen kloniert; setzt man vor dieses Gen die zu untersuchende Sequenz vor den Translationsstart und bringt dieses Konstrukt in eine geeignete Zelllinie ein, so wird je nach Art dieser Sequenz das Luziferasegen mehr oder weniger stark translatiert. Mit einem Enzymassay läßt sich die Menge der entstandenen Luziferase messen. DNA mit A/J-Sequenzen der folgenden Spleißvarianten wurden vor das Luziferasegen kloniert:

Exon1 - $\phi 2\phi 3$ - $\phi 4$ - Exon2 (12 bp-ATG) - Luziferase

Exon1 - $\phi 2\phi 3$ - Exon2 (12 bp-ATG) - Luziferase

Exon1 - Exon2 (12 bp-ATG) - Luziferase

Zusätzlich wurde auch ein Konstrukt mit der kleinsten Spleißvariante von B6 hergestellt, da an Position 1 von Exon 2 ein Basenaustausch von T nach C stattgefunden hat. Die Konstrukte wurden in eine murine B Zelllinie transfiziert, die natürlicherweise den IL-5R exprimiert. Das Ergebnis fiel überraschend aus: bei den A/J Varianten mit unterschiedlichem Ausmaß von sehr stabilen Hairpinloops mit freier Energie von > -50 kcal/mol waren keine Unterschiede der Luziferaseaktivität messbar. Auf der anderen Seite war die Luziferaseaktivität des B6 Konstrukts doppelt so hoch wie die des gleich großen A/J Konstrukts. In Abbildung 9 ist das Resultat dargestellt. Ob

die Differenz auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene entsteht, ist noch ungeklärt, ist aber für die Menge des entstehenden Produktes unerheblich.

Durch einen Sequenzvergleich von 699 eukaryontischen mRNAs hat Marilyn Kozak schon 1987 eine Art Konsensussequenz oberhalb des Translationsstarts höherer Eukaryonten beschrieben. Zwölf Nukleotide vor dem ATG Startcodon wird C in 35% der Fälle, T hingegen nur in 19% der Fälle vorgefunden. Möglicherweise bietet die Sequenz von B6 mit C einen günstigeren Kontext für den Translationsstart als A/J mit T an dieser Stelle.

Reflektiert das Ergebnis dieser Messung die Situation *in vivo*, so heißt das, daß B6 Mäuse deutlich mehr IL-5R synthetisieren als die High-Responder Mäuse A/J. Die Segregationsanalyse hatte das B6 Allel als Suszeptibilitätsallel nahegelegt (vgl. Abb. 6) - die Messung der *in vitro* Translationseffizienz unterstreicht diese Annahme.

Ein weiteres experimentelles Ergebnis deutet in dieselbe Richtung: bei der Amplifikation der 3 Isoformen des IL-5R war von der B6 cDNA nie die kleinste Isoform des alternativen Spleißproduktes Exon 9 - Exon 11 zu erhalten. Aus den Amplifikatmengen ergibt sich, daß alle Isoformen in vergleichbarem Maßstab synthetisiert werden, d.h. es gibt bei A/J die membrangebundene Isoform im Verhältnis 1 : 2 zu den löslichen Isoformen, dagegen ist bei B6 das Verhältnis 1 : 1, eine Verschiebung hin also zum membranständigen Rezeptor und damit wieder in die Richtung erhöhten proallergischen Rezeptors auf Effektorzellen. *In vivo* Untersuchungen zu diesem Punkt liegen nicht vor - es ist aber hervorzuheben, daß die Analyse des Rezeptorgens und seiner Produkte und die Genomanalyse in die gleiche Richtung weisen.

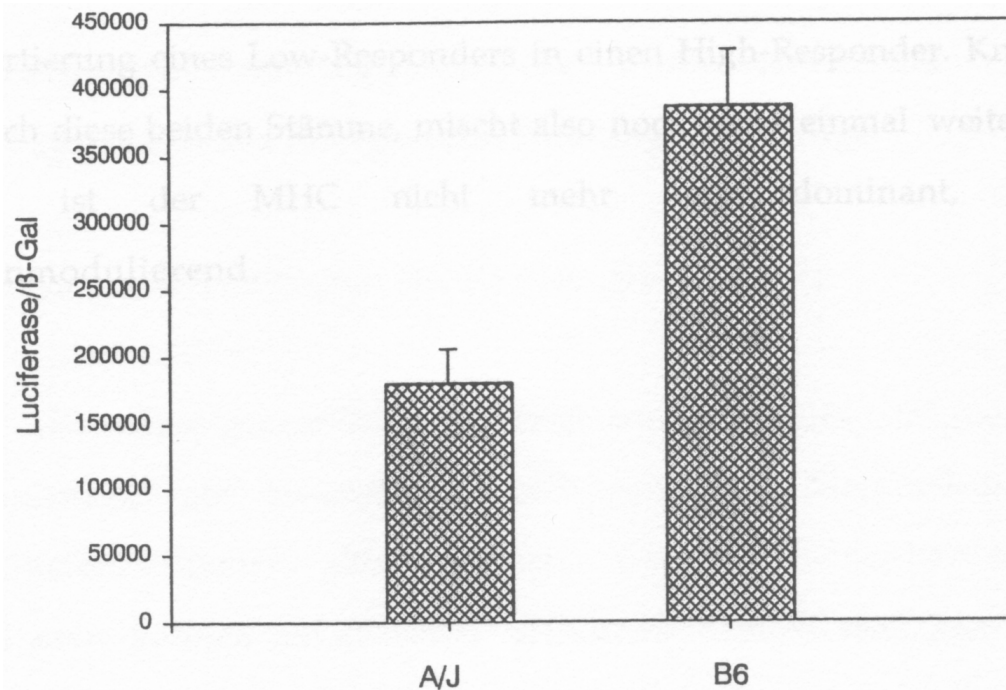


Abbildung 9. Luziferaseaktivität der Exon1 - Exon2 Konstrukte von A/J und B6. B6 enthält einen Basenaustausch T -> C an Position 12 vor dem ATG Start. Die Konstrukte wurden in murine A20 Zellen transfiziert; zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde ein β -Galaktosidase plasmid cotransfiziert. Der Quotient aus beiden Aktivitäten ist auf der y-Achse aufgetragen.

Die Gruppe von Kyoshi Takatsu hat durch gezielte Unterbrechung des Genes den IL-5R in B6 Mäusen funktionell zerstört (Yoshida et al 1996). Der Phänotyp dieser sogenannten knock out Mäuse ist relativ diskret: neben der Abnahme von einzelnen B Zellpopulationen und gesteigerter Anfälligkeit gegenüber *Angiostrongylus cantonensis* kommt es zu einer Abnahme von IgA in der Darmmukosa und der Nasenschleimhaut (Hiroi et al 1999). Aus diesen Ergebnissen auf die Bedeutung des IL-5R für die Regulation einer allergischen Immunantwort zu schließen scheint nicht sinnvoll, da die untersuchten Tiere einer homozygoten Inzuchtlinie angehören, bei denen Interaktion verschiedener Gene oder das Ausmaß der Wirkung einzelner Gene nicht wirklich zu beurteilen ist. Ein Beispiel ist in dieser Arbeit gegeben: der MHC in congenen Mäusen allein ist ausreichend für die

Konvertierung eines Low-Responers in einen High-Responder. Kreuzt man lediglich diese beiden Stämme, mischt also noch nicht einmal weitere Allele hinzu, ist der MHC nicht mehr immundominant, sondern immunmodulierend.

6. Strukturelle und regulatorische Varianz sind an der Expression des allergischen Phänotyps beteiligt

[siehe beiliegende Publikation Nr. 10; Manuskript Nr. 11]

Durch die Analyse ganzer Genome verschiedener Spezies wird die Sicht auf Mechanismen, die qualitative oder quantitative Merkmalsdifferenzen kontrollieren, immer differenzierter. Gene, die solche Merkmale beeinflussen, können auf zweierlei Art unterschiedlich sein: zum einen in der codierenden Region des Gens, dem Bereich also, der die Struktur des Produktes bestimmt; Polymorphismen in diesem Bereich führen zu struktureller Varianz. Im Immunsystem ist sie vor allem bei Genprodukten anzutreffen, die in direkter Weise mit Antigenen zu tun haben - Immunglobuline, T Zellrezeptoren, in geringerem Maße auch Proteasom und Peptidtransporter. Ein typisches Beispiel für strukturellen Polymorphismus ist der MHC: die Aminosäuresequenz der MHC Bindungsfurche bestimmt die Aminosäuresequenz der darin bindenden Epitope (vgl. auch I. 3). Möglichst große Varianz in dieser Struktur in einer Spezies führt dazu, daß dem Immunsystem einer Population möglichst viele Epitope präsentiert werden; dies mag als ein Grund gelten, warum der MHC Haplotyp aus so vielen polymorphen Loci besteht.

Auch in dieser Arbeit ist der MHC ein Faktor für die Expression eines bestimmten Phänotyps: die MHC congenen Mäuse konvertieren von Low-Respondern zu High-Respondern.

Das zweite Prinzip ist das der regulatorischen Variabilität. Nicht in der resultierenden Proteinstruktur liegt die Varianz, sondern in Bereichen, die

die Menge des Produktes entwicklungs-, gewebe- und / oder aktivitätsspezifisch regulieren können.

Auch dieses Prinzip findet sich in der genetischen Struktur des IL-5R wieder:

Durch die Punktmutation in Position -12 vor dem Translationsstart verändert sich vermutlich der Kontext für die ribosomale Unterheit in einer Weise, daß die Translationseffizienz zunimmt. Zusätzlich wird von B6 bevorzugt das kleinste Spleißprodukt der 5' UTR hergestellt, während bei A/J keine Präferenz einer Spleißvariante zu erkennen ist. Damit erhöht sich der Effekt dieser Differenz mit dem Ergebnis deutlich mehr proallergischen Produkts bei B6.

Eine zweite Ebene regulatorischer Varianz wird durch unterschiedliches alternatives Spleißen bei High- und Low-Respondern bestimmt. Ob die Grundlage für dieses differentielle alternative Spleißen ein struktureller oder regulatorischer Polymorphismus (oder möglicherweise beides) ist, ist noch nicht klar. Bei der Sequenzierung der Spleißdonor und -acceptor Stellen und der am weitesten 3' gelegenen "Branch Sites" wurden keine Mutationen aufgefunden. Entweder liegen (i) Mutationen in den noch nicht sequenzierten Bereichen der teilweise sehr großen Introns, oder (ii) strukturelle Polymorphismen in Genen transagierender Faktoren, oder (iii) Polymorphismen in regulatorischen Sequenzen dieser Gene.

Das stammspezifische alternative Spleißen betrifft sowohl einen codierenden wie einen nicht codierenden Bereich des Rezeptors:

(i) in RT PCR Produkten von A/J finden sich Matrizen für beide Isoformen des löslichen IL-5R, bei B6 nur eine; damit stehen für A/J mehr Moleküle für einen etwaigen negativen Feed Back durch Bindung von Il-5 zur Verfügung als für B6.

(ii) wie im vorausgegangenen Kapitel beschrieben fällt die 5'UTR durch eine unerwartete Vielzahl alternativer Spleißprodukte auf. Dabei sind zwei

Spleißvarianten mit besonderer Sekundärstruktur aus der cDNA von B6 Mäusen nie amplifizierbar. Hypothetische Funktion wäre unterschiedliche Proteinmenge je nach Sekundärstruktur der jeweiligen Spleißvariante.

Solche charakteristischen Sekundärstrukturen sind für andere regulatorische Proteine, die im Zusammenhang stehen mit Embryonalentwicklung, Differenzierung, Wachstum, Tumorentstehung und Stress beschrieben und teilweise untersucht worden (Macejak und Sarnow 1991, Vagner et al 1995, Teerink et al 1995, Bernstein et al 1997, Nanbru et al 1997, Stein et al 1998, Vagner et al 1996). Eine Reihe von ihnen bedient sich eines alternativen Weges der Translationsinitiation. Obwohl auch hier die Mechanismen nicht geklärt sind, ist das verbindende Prinzip klar: posttranskriptionale Regulation, d.h. die Aktivität der 5'UTR bestimmt spezifisch die Translationseffizienz. Da diese Form der Aktivität auch für die 5'UTR des IL-5R relevant sein kann, im folgenden ein kurzer Exkurs:

Exkurs: 2 Modelle, wie die Translation von eukaryontischer mRNA initiiert werden kann.

Die Scanning Methode ist von Marilyn Kozak im wesentlichen entworfen und experimentell überprüft worden (Kozak 1989). Sie ist die häufigste Form des Translationsstarts und setzt Methylierung des 1. Nukleotids eines Genes (Cap) voraus; eine Untereinheit des Ribosoms scanned dann abhängig von dieser Cap Struktur die Sequenz bis zum funktionellen AUG, das in einem adaequaten Kontext von bis zu 12 Nukleotiden oberhalb und einem Nukleotid unterhalb des AUG stehen sollte (Kozak 1987). Wichtig ist, daß die RNA keine zu stabilen Sekundärstrukturen ausbildet, da der Scanning Mechanismus kein Aufschmelzen von Strukturen mit hoher Ener1gie erlaubt

(Pelletier und Sonenberg 1985). Des Weiteren wird er erheblich behindert durch nicht funktionelle AUGs (uAUG) oberhalb des Initiatorcodons.

Das zweite Modell veranschaulicht, wie Translation trotz ausgeprägter Sekundärstruktur und uAUGs stattfinden kann (Pelletier und Sonenberg 1988, Macejak und Sarnow 1991; zur Übersicht s. Van der Velden und Thomas 1999). Die 5'UTR enthält eine noch nicht näher charakterisierte Sequenz, die sogenannte "internal ribosomal entry site" (IRES); die kleinste bekannte Sequenz ist 55 Nukleotide lang, sie kann durchaus aber auch mehrere hundert Nukleotide lang sein. IRES ist am 3' Ende der 5'UTR lokalisiert und ermöglicht durch die Ausbildung eines Komplexes aus mehreren Faktoren die Initiation und damit den Beginn der Proteinbiosynthese. Diese zweite Form des Translationsstarts findet sich vorzugsweise bei regulatorischen Proteinen wie z. B. Proto-Onkogene (c-myc), Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (human fibroblast growth factor, insulin like growth factor, platelet derived growth factor) oder Transkriptionsfaktoren (zur Übersicht s. Tabelle 1 in Van der Velden und Thomas, 1999). Ermöglicht wird damit eine posttranskriptionale Regulation, deren Mechanismen allerdings noch unklar sind. Als generelles Prinzip kann bei gleichbleibender globaler Proteinsynthese die differentielle Regulation bestimmter Proteine über diese 5'UTRs gesteuert werden.

Für das IL-5R Gen gilt ähnliches wie für die anderen hier aufgeführten Gene: es sorgt für eine linienspezifische Expression des Rezeptors auf Eosinophilen und Basophilen (und B Zellen in der Maus); je nach Aktivierungszustand der jeweiligen Zellen ist die Menge an Rezeptor hoch- und runterreguliert; ein solcher Regulationsvorgang erfolgt sehr schnell innerhalb einer Stunde (Takagi et al 1995): mit präformierten stabilen mRNAs unterschiedlicher Sekundärstruktur sind solch schnelle Vorgänge gut vereinbar. Auch für den

humanen IL5-R sind alternatives Spleißen und uAUGs in der 5'UTR beschrieben (Tuypens et al 1994).

Es wird also interessant sein zu sehen, ob und auf welche Weise die unterschiedlichen Qualitäten der 5'UTR des IL-5R die Quantität des codierten Proteins regulieren. Überraschend ist in jedem Fall das Ausmaß an Verschiedenheit und damit an potentieller Flexibilität sowohl innerhalb eines Mausstammes als auch zwischen den beiden Mausstämmen.

7. Genomanalysen zeigen Cluster und spezifische Loci bei unterschiedlichen immunologischen Erkrankungen

Durch Genomanalysen mit Mikrosatelliten wurde u.a. in den Spezies Mensch, Ratte und Maus die genetische Prädisposition sehr verschiedener immunologischer Erkrankungen untersucht: Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis (RA), Multiple Sklerose (MS), Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) oder Typ I Diabetes; Allergie, atopisches Asthma und andere chronisch entzündliche Erkrankungen (zur Übersicht siehe Vyse and Todd 1996, Becker et al 1998, Becker 1999). Ein bemerkenswertes Ergebnis ist die enorme Überlappung gekoppelter oder assoziierter Loci mit den verschiedenen Erkrankungen und zwar innerhalb einer Spezies und Spezies übergreifend. Die folgenden Beispiele veranschaulichen dies:

In den Tiermodellen für autoimmunen Diabetes und SLE sind 3 SLE Loci mit Diabetes Loci kolokalisiert (Vyse and Todd 1996). Beim Menschen finden sich identische Marker bei Multipler Sklerose und Rheumatoider Arthritis; oder Diabetes und M. Bechterew. Spezies-übergreifend finden sich neben dem MHC kolokalisierte Marker bei induzierter Arthritis bei der Ratte und M. Crohn und Multipler Sklerose beim Menschen (Becker et al 1998). Gleiches wird für das experimentelle Modell für MS in der Maus und MS und Diabetes beim Menschen beobachtet (Butterfield et al 1998). Die naheliegende Schlußfolgerung daraus ist, daß Gene für zentrale biologische Regelkreise an diesen Orten lokalisiert sind.

Neben diesen generellen immunregulatorischen Loci gibt es krankheitsspezifische Loci, die möglicherweise die genaue Phänomenologie des jeweiligen Krankheitsbildes durch Immunmodulation festlegen. So

konnte man für MS, Diabetes, M. Crohn und Asthma auf verschiedenen Chromosomen solche Genorte identifizieren.

Ein großes Problem ist allerdings zur Zeit noch, daß für nur sehr wenige chromosomale Regionen die dazugehörigen Gene identifiziert sind. Dies liegt an den großen Abständen, in die die biologischen Genomkarten eingeteilt sind. So können zwischen zwei benachbarten Mikrosatelliten zwischen 10 und 100 Gene liegen, die zu einem großen Teil noch nicht einmal bekannt sind. Da die internationalen Genomprojekte gute Fortschritte machen, wird sich dieser Zustand im Verlauf der nächsten fünf bis zehn Jahre deutlich verbessern.

Die Identifizierung dieser Gene wäre ein signifikanter Fortschritt in verschiedener Hinsicht. Zum einen ließe sich die Pathogenese immunologischer Krankheiten genauer nachvollziehen und damit entsprechend differenzierter ließe sich therapeutisch intervenieren. Weiterhin könnten diagnostische Kriterien präzisiert und Präventionsmaßnahmen gezielter ergriffen werden. Letztlich könnten die Grundlagen immunbiologischer und pathologischer Prozesse gezielter untersucht werden.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse aus verschiedenen Genomanalysen für das Chromosom 6 zusammengefaßt. Unter der Perspektive der gemeinsamen immunregulatorischen und differentiellen immunmodulatorischen Gene ergibt sich eine Überlappung von zwei Phänotypen und einem Locus. Bei 57 cM ist ein Suszeptibilitätslocus gegenüber infektiösen Agentien (*Bordetella pertussis* Toxin (Meeker et al 1999) und *Coccidioides immitis* (Fierer et al 1999)). Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein und dasselbe Gen. Als Kandidatengen wird Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 benannt.

Alle anderen Phänotypen sind vermutlich chromosomal distinkt; oder mit nur möglicher Überlappung - ein Feinmapping der entsprechenden Region ist zur Bestätigung dieses Schlusses jedoch erforderlich.

Tabelle 2

Mikro-satellit	chrom. Region	Phänotyp	Maus-stamm	Ref.
Cia6	20.2 cM	CIA	B10Q, DBA/1	(1)
Cia3	23.8 cM	CIA	DBA/1, SWR	(2)
D6Mit5	36.0 cM	AK	Biozzi	(3)
D6Mit105	45.5 cM	ICHS	A/J, B6	(4)
D6Mit10	48.7 cM	BHR	A/J, C3H	(5)
Bphs	57.0 cM	BPHS	C3H, CBA, SJL	(6)
	57.0 cM	Susc CI	B6, DBA/2	(7)
D6Mit25	65.5 cM	Diabetes	NOD, PWK	(8)
Idd6	70.0 cM	Diabetes	NOD, NON	(9)

Ergebnisse von neun Mikrosatellitenanalysen von Chromosom 6. Hinter den Abkürzungen verbergen sich die folgenden Phänotypen: CIA Collagen induzierte Arthritis, AK Antikörperkonzentration, ICHS allergische Soforttypreaktion der Haut, BHR bronchiale Hyperreagibilität, BPHS Bordetella pertussis Toxin Hypersensitivität, Susc CI Suszeptibilität *Coccidioides immitis*. (1) Yang et al 1999, (2) McIndoe et al 1999, (3) Puel et al 1995, (4) Daser et al, 1999, unpublished, (5) Ewart et al 1996, (6) Meeker et al 1999, (7) Fierer et al 1999, (8) Melanitou et al 1998, (9) Todd et al 1996.

Aus der in dieser Arbeit vorgestellten Genomanalyse auf Grundlage des Phänotyps "allergische Soforttypreaktion der Haut" konnte ein plausibles Kandidatengen postuliert werden. Die anschließende Untersuchung des Gens erbrachte eine unerwartet große Anzahl von Polymorphismen, die teilweise funktionelle Implikationen hatten. Diese konnten teilweise experimentell verifiziert werden; außerdem spricht das Ergebnis der Segregationsanalyse für die biologische Relevanz dieser Befunde. Das bedeutet einen der (noch) sehr seltenen Fälle, wo nicht nur ein chromosomaler Ort mit einem bestimmten immunologischen Phänotyp in Zusammenhang gebracht werden konnte, sondern dieser Zusammenhang bis hin zu funktioneller, biologisch plausibler Differenz zwischen High- und Low-Respondern verfolgt werden konnte.

III. Referenzen

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, **383**, 787-793.

Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE, Freidlin B, Biddison WE, McFarland HF, Trent JM. 1998. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9979-9984.

Becker KG. 1999. Comparative genetics of type 1 diabetes and autoimmune disease: common loci, common pathways? *Diabetes*, **48**, 1353-1358.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. 1987a. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature*, **329**, 506-512.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. 1987b. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, **329**, 512-518.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, **32**, 314-31.

Brown DR, Fowell DJ, Corry DB, Wynn TA, Moskowitz NH, Cheever AW, Locksley RM, Reiner SL. 1996. Beta 2-microglobulin-dependent NK1.1+ T cells are not essential for T helper cell 2 immune responses. *J Exp Med*, **184**, 1295-1304.

Burmester G, Daser A, Kamradt T, Krause A, Mitchison NA, Sieper J, Wolf N. 1995. Immunology of reactive arthritides. *Ann Rev Immunol*, **13**, 229-250.

Butterfield RJ, Sudweeks JD, Blankenhorn EP, Korngold R, Marini JC, Todd JA, Roper RJ, Teuscher C. 1998. New genetic loci that control susceptibility and symptoms of experimental allergic encephalomyelitis in inbred mice. *J Immunol*, **161**, 1860-1867.

Collins FS. 1999. The human genome project and the future of medicine. *Ann N Y Acad Sci*, **882**, 42-55.

Constant SL and Bottomly K. 1997. Induction of the Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: alternative approaches. *Annu Rev Immunol*, **15**, 297-322.

Daser A, Urlaub H, Henklein P. 1994. HLA-B27 binding peptides derived from the 57kD heat shock protein of *Chlamydia Trachomatis*: novel insights into the peptide binding rules. *Mol Immunol*, **31**, 331-336.

Daser A, Meissner N, Herz U, Renz H. 1995. Role and modulation of T-cell cytokines in allergy. *Curr Opin Immunol*, **7**, 762-770.

Daser A, Mitchison H, Mitchison NA & Mueller B (1996). Non-classical MHC genetics of immunological diseases in man and mouse. The key role of proinflammatory cytokines. *Cytokine*, **8**:593-597.

Daser A, Gerstner B, Hansen R, Bulfone-Paus S, Renz H. 1998. Impaired NK1.1 T cells do not prevent from the development of an IgE-dependent phenotype. *Clin Exp Allergy*, **28**, 950-955.

Daser A, Bätjer N, Kölsch U, Kötz K, Schmeling H, Schou C, Renz H. 1998. Quantitative assessment of immediate cutaneous hypersensitivity in a model of genetic predisposition to atopy. *Int Arch Allergy Immunol*, **117**, 239-243.

Deloukas P, Schuler GD, Gyapay G, Beasley EM, Soderlund P, Rodriguez-Tomè P et al. 1998. A physical map of 30,000 human genes. *Science*, **282**, 744-746.

DeSanctis G, Merchant M, Beier DR, Dredge RD, Grobholz JK, Martin TR, Lander ES, Drazen JM. 1995. Quantitative locus analysis of airway hyperresponsiveness in A/J and C57BL/6 mice. *Nat Genet*, **11**, 150-154.

Dietrich WF, Miller JC, Steen RG, Merchant M, Damron D, Nahf R, Gross A, Joyce DC, Wessel M, Dredge RD, et al. 1994. A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms. *Nat Genet*, **7**, 220-45.

Dietrich WF, Miller J, Steen R, Merchant MA, Damron-Boles-D, Husain Z, Dredge R, Daly MJ, Ingalls KA, O'Conner TJ et al. 1996. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*, **380**, 149-152.

Ewart SL, Mitzner W, DiSilvestre DA, Meyers DA, Levitt RC, Falk K. 1996. Airway hyperresponsiveness to acetylcholine: segregation analysis and evidence for linkage to murine chromosome 6. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **14**, 487-95.

Falk K, Rötzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, **351**, 290-296.

Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. 1994. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics*, **39**, 230-242.

Fierer J, Walls L, Wright F, Kirkland TN. 1999. Genes influencing resistance to *Coccidioides immitis* and the interleukin-10 response map to chromosome 4 and 6 in mice. *Infect Immun*, **67**, 2916-2919.

Hiroi T, Yanagita M, Iijima H, Iwatani K, Yoshida T, Takatsu K, Kiyono H. 1999. Deficiency of IL-5 receptor alpha-chain selectively influences the development of the common mucosal immune system independent IgA-producing B-1 cell in mucosa-associated tissues. *J Immunol*, **162**, 821-828.

Imamura F, Takaki S, Akagi K, Ando M, Yamamura K, Takatsu K, Tominaga A. 1994. The murine interleukin-5 receptor alpha-subunit gene: characterization of the gene structure and chromosome mapping. *DNA Cell Biol*, **13**, 283-292.

Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC. 1991. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature*, **353**, 326-329.

Kikuchi Y, Migita M, Takaki S, Tominaga A, Takatsu K. 1994. Biochemical and functional characterization of soluble form of IL-5 receptor alpha (sIL-5R alpha). Development of ELISA system for detection of sIL-5R alpha. *J Immunol Methods*, **167**, 289-298.

Kozak M. 1987. An analysis of 5'-non-coding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*, **15**, 8125-8148.

Kozak M. 1989. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol*, **108**, 229-241.

Krebs S, Lamas JR, Poenaru S, Folkers G, de Castro JA, Seebach D, Rognan D. 1998. Substituting nonpeptidic spacers for the T cell receptor-binding part of class I major histocompatibility complex-binding peptides. *J Biol Chem*, **273**, 19072-19079.

Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, **1**, 174-181.

Lander ES, Schork NJ. 1994. Genetic dissection of complex traits. *Science*, **265**, 2037-2048.

Lander ES, Kruglyak L. 1995. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*, **11**, 241-247.

Macejak DG and Sarnow P. 1991. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature*, **353**, 90-94.

Madden DR, Gorga JC, Strominger JC, Wiley DC. 1992. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell*, **70**, 1035-1048.

McIndoe RA, Bohlman B, Chi E, Schuster E, Lindhardt M, Hood L. 1999. Localization of non-Mhc collagen-induced arthritis susceptibility loci in DBA/1j mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2210-2214.

Meeker ND, Stafford AN, Lunceford JK, Avner P, Ma RZ, Teuscher C. 1999. Physical mapping of the autoimmune disease susceptibility locus, Bphs: colocalization with a cluster of genes from the TNF receptor superfamily on mouse chromosome 6. *Mamm Genome*, **10**, 858-863.

Melanitou E, Joly F, Lathrop M, Boitard C, Avner P. 1998. Evidence for the presence of insulin-dependent diabetes-associated alleles on the distal part of mouse chromosome 6. *Genome Res*, **8**, 608-620.

Mertz AKH, Daser A, Skurnik M, Wiesmüller K-H, Batsford S, Schiltz E, Braun J, Wu P, Appel H, Distler A, Sieper J. 1994. The cationic urease b-subunit and ribosomal protein L23 of *Yersinia enterocolitica* 0:3 belong to the immunodominant antigens in *Yersinia*-triggered reactive arthritis. *Mol. Medicine*, **1**, 4455-4459.

Mitchison NA, Schuhbauer D, Muller B. 1999. Natural and induced regulation of Th1/Th2 balance. *Springer Seminars Immunopathol*, **21**.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, **136**, 2348-2357.

Murata Y, Takaki S, Migita M, Kikuchi Y, Tominaga A, Takatsu K. 1992. Molecular cloning and expression of the human interleukin 5 receptor. *J Exp Med*, **175**, 341-351.

N.N. 1992. A comprehensive genetic linkage map of the human genome. NIH/CEPH Collaborative Mapping Group. *Science*, **2**, 67-86.

Nusbaum C, Slonim DK, Harris KL, Birren BW, Steen RG, Stein LD, Miller J, Dietrich WF, et al. 1999. A YAC-based physical map of the mouse genome. *Nat Genet*, **22**, 388-393.

O'Garra A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, **8**, 275-283.

Ogata N, Kouro T, Yamada A, Koike M, Hanai N, Ishikawa T, Takatsu K. 1998. JAK2 and JAK1 constitutively associate with an interleukin-5 (IL-5) receptor alpha and beta subunit, respectively, and are activated upon IL-5 stimulation. *Blood*, **91**, 2264-2271.

Pelletier J and Sonenberg N. 1985. Insertion mutagenesis to increase secondary structure in eukaryotic mRNAs. *Cell*, **40**, 515-526.

Pelletier J and Sonenberg N. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, **334**, 320-325.

Pierce A, Whetton AD, Owen-Lynch PJ, Tavernier J, Spooner E, Dexter TM, Heyworth CM. 1998. Ectopic interleukin-5 receptor expression promotes proliferation without development in a multipotent hematopoietic cell line. *J Cell Sci*, **111**, 815-823.

Puel A, Groot PC, Lathrop MG, Demant P, Mouton D. 1995. Mapping of genes controlling quantitative antibody production in Biozzi mice. *J Immunol*, **154**, 5799-5805.

Rognan D, Scapozza L, Folkers G, Daser A. 1994. Molecular dynamics simulation of MHC-peptide complexes as a tool for predicting T cell epitopes. *Biochemistry*, **33**, 11476-11485

Rognan D, Scapozza L, Folkers G, Daser A. 1995. Rational design of nonnatural peptides as high affinity ligands for the HLA-B*2705 human leukocyte antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 753-757.

Scapozza L, Rognan D, Folkers G, Daser A. 1995. Molecular dynamics and structure-based drug design for predicting non-natural nonapeptide binding to a class I MHC protein. *Acta Cryst*, **D51**, 541-549.

Schalkwyk LC, Jung M, Daser A, Weiher M, Walter J, Himmelbauer H, Lehrach H. 1999. Panel of microsatellite markers for whole-genome scans and radiation hybrid mapping and a mouse family tree. *Genome Research*, in press.

Silver DM, Lane DP. 1975. Dominant nonresponsiveness in the induction of autoimmunity to liver specific F antigen. *J Exp Med*, **142**, 1455-1461.

Snell GD. 1978. Congenic resistant strains of mice. In: *Origin of Inbred Mice*, Academic Press, New York, pp 1-31.

Takagi M, Hara T, Ichihara M, Takatsu K, Miyajima A. 1995. Multi-colony stimulating activity of interleukin 5 (IL-5) on hematopoietic progenitors from transgenic mice that express IL-5 receptor alpha subunit constitutively. *J Exp Med*, **181**, 889-899.

Takaki S, Tominaga A, Hitoshi Y, Mita S, Sonoda E, Yamaguchi N, Takatsu K. 1990. Molecular cloning and expression of the murine interleukin-5 receptor. *EMBO J*, **9**, 4367-4374.

Takaki S, Murata Y, Kitamura T, Miyajima A, Tominaga A, Takatsu K. 1993. Reconstitution of the functional receptors for murine and human interleukin 5. *J Exp Med*, **177**, 1523-1529.

Takatsu K. 1998. Interleukin 5 and B cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev*, **9**, 25-35.

Tavernier J, Devos R, Cornelis S, Tuypens T, Van der Heyden J, Fiers W, Plaetinck G. 1991. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alpha chain and a beta chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell*, **66**, 1175-1184.

Tuypens T, Plaetinck G, Baker E, Sutherland G, Brusselle G, Fiers W, Devos R, Tavernier J. 1992. Organization and chromosomal localization of the human interleukin 5 receptor α -chain gene. *Eur Cytokine Netw*, **3**, 451-459.

Van der Velden AW, Thomas AAM. 1999. The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 87-106.

Van Etten WJ, Steen RG, Nguyen H, Castle AB, Slonim DK, Ge B, Nusbaum C, Schuler G, Lander ES, Hudson TJ. 1999. Radiation hybrid map of the mouse genome. *Nat Genet*, **22**, 384-387.

von der Weid T, Beebe AM, Roopenian DC, Coffman RL. 1996. Early production of IL-4 and induction of Th2 responses in the lymph node originate from an MHC class I-independent CD4+NK1.1- T cell population. *J Immunol*, **157**, 4421-4427.

Yoshida T, Ikuta K, Sugaya H, Maki K, Takagi M, Kanazawa H, Sunaga S, Kinashi T, Yoshimura K, Miyazaki J, Takaki S, Takatsu K. 1996. Defective B-1 cell development and impaired immunity against *Angiostrongylus cantonensis* in IL-5R alpha-deficient mice. *Immunity*, **4**, 483-494.

Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE. 1995. Role of NK1.1+ T cells in a Th2 response and in immunoglobulin E production. *Science*, **270**, 1845-1847.

Zhang Y, Rogers KH, Lewis DB. 1996. β 2-microglobulin-dependent T cells are dispensable for allergen-induced T helper 2 responses. *J Exp Med*, **184**, 1507-1512.

Publikation Nr. 1

Daser A, Meissner N, Herz U, Renz H. 1995. Role and modulation of T-cell cytokines in allergy. *Curr Opin Immunol*, **7**, S.762-770.

Publikation Nr. 2

Daser A, Gerstner B, Hansen R, Bulfone-Paus S, Renz H. 1998. Impaired NK1.1 T cells do not prevent from the development of an IgE-dependent phenotype. *Clin Exp Allergy*, **28**, S.950-955.

Publikation Nr. 3

Daser A, Urlaub H, Henklein P. 1994. HLA-B27 binding peptides derived from the 57kD heat shock protein of Chlamydia Trachomatis: novel insights into the peptide binding rules. *Mol Immunol*, **31**, S.331-336.

Publikation Nr. 4

Rognan D, Scapozza L, Folkers G, Daser A. 1994. Molecular dynamics simulation of MHC-peptide complexes as a tool for predicting T cell epitopes. *Biochemistry*, **33**, S.11476-11485.

Publikation Nr. 5

Mertz AKH, Daser A, Skurnik M, Wiesmüller K-H, Batsford S, Schiltz E, Braun J, Wu P, Appel H, Distler A, Sieper J. 1994. The cationic urease b-subunit and ribosomal protein L23 of Yersinia enterocolitica 0:3 belong to the immunodominant antigens in Yersinia-triggered reactive arthritis. *Mol. Medicine*, **1**, S.4455-4459.

Publikation Nr. 6

Burmester G, Daser A, Kamradt T, Krause A, Mitchison NA, Sieper J, Wolf N. 1995. Immunology of reactive arthritides. *Ann Rev Immunol*, **13**, S.229-250.

Publikation Nr. 7

Rognan D, Scapozza L, Folkers G, Daser A. 1995. Rational design of nonnatural peptides as high affinity ligands for the HLA-B*2705 human leukocyte antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, S.753-757.

Publikation Nr. 8

Daser A, Bätjer N, Kölsch U, Kötz K, Schmeling H, Schou C, Renz H. 1998. Quantitative assessment of immediate cutaneous hypersensitivity in a model of genetic predisposition to atopy. *Int Arch Allergy Immunol*, **117**, S.239-243.

Publikation Nr. 9

Schalkwyk LC, Jung M, Daser A, Weiher M, Walter J, Himmelbauer H, Lehrach H. 1999. Panel of microsatellite markers for whole-genome scans and radiation hybrid mapping and a mouse family tree. *Genome Research*, in press.,

Publikation Nr. 10

Daser A, Mitchison H, Mitchison NA & Mueller B. 1996. Non-classical MHC genetics of immunological diseases in man and mouse. The key role of proinflammatory cytokines. *Cytokine*, **8**, S.593-597.

Manuskript Nr. 11

Daser A, Koetz K, Bätjer N, Jung M, Rüschenhoff F, Goltz M, Ellerbrok H, Renz H, Walter J, Paulsen M. Genetics of atopy in an mouse model: polymorphism of the IL-5 receptor α chain