

**Ana Berta da Fonseca Vieira Álvares e Sousa: The gene conversion hypothesis of MHC evolution: Studies on the detection of rare segmental exchange variants in the laboratory mouse. 2000**

Die Muster der Allelvariation in Haupthistokompatibilitätsgenen (Major Histocompatibility - MHC), lassen vermuten, dass ein segmentaler Transfer von Sequenzmotiven, der in der Keimbahn stattfindet, einen primären Mechanismus zur Erzeugung molekularer Varianten darstellt. Diese werden dann der natürlichen Selektion dargeboten. Der überzeugendste Hinweis für die Existenz einer natürlichen Mutationsmaschinerie, die auf Genkonversion beruht, stammt von einer Anzahl gut dokumentierter Fälle mutierter MHC Klasse I Gene, die in der Labormaus auftraten. In der Mehrzahl dieser Fälle, war das H-2K<sup>b</sup> Gen betroffen. Bezüglich dieses Gens lag die Häufigkeit solcher Ereignisse bei einem Fall pro zehntausend untersuchter Keimzellen. Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, ein Detektionssystem zu entwickeln, um Genkonversionsereignisse, die im H-2K<sup>b</sup> Gen auftreten, aufzudecken, und analysieren zu können. Das sollte Rückschlüsse auf die adaptive Bedeutung, wie auch die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen solcher Mutationen, ermöglichen. Wir bedienten uns der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis - DGGE), die ein hohes Potential zur Anreicherung mutierter DNA-Sequenzen besitzt, um die oben beschriebenen selten auftretenden, durch Genkonversion mutierten Genfragmente, sichtbar, und damit analysierbar, machen zu können. Die Prozedur beginnt im ersten Schritt mit einer Vervielfältigung der Zielsequenzen durch die Polymerasen Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction - PCR). Durch einen Denaturierungs- Renaturierungszyklus wird Heteroduplex-DNA, bestehend aus mutierter und Wildtypsequenz erzeugt. Es schließt sich eine Gelelektrophorese an, in der die DNA-Proben einen denaturierenden Gradienten durchlaufen. Durch den extrem hohen Überschuss an Wildtyp-DNA finden sich die mutierten DNA Sequenzen praktisch ausschließlich in dem Bereich des Gels, der die Heteroduplex-DNA beinhaltet. Da Heteroduplex-DNA im Vergleich zu Wildtyp-DNA thermisch instabil ist, wird sie in diesem Gelsystem retardiert, und kann somit in angereicherter Form wiedergewonnen werden. Es wurde ein DGGE System entwickelt, das die Auftrennung, und Anreicherung von erfolgten Mutationen in DNA Segmenten des H-2K<sup>b</sup> Gens erlaubt. Die Einführung einer stabilen, ausschließlich aus den Basen Cytosin und Guanin bestehenden Sequenz, mittels der während der PCR verwendeten Primer, zusammen mit einer extrem genauen Temperaturkontrolle, die durch die Verwendung von Röhrengelen, mit einem Innendurchmesser von 2mm, ermöglicht wird, erlaubt das Aufdecken einzelner Basensubstitutionen, selbst wenn diese, wie im Falle des K<sup>b</sup>-Gens in sehr hohen Schmelztemperaturdomänen eingebettet liegen. Wir haben Faktoren, die das Potential der DGGE bezüglich der Mutationsanreicherung, in ungünstiger Weise beeinflussen, ausführlich charakterisiert. Zusätzlich zu jenen Faktoren, die den Grad der Effektivität einer DGGE direkt negativ beeinflussen, müssen auch solche in Überlegungen einbezogen werden, die im Zusammenhang mit der PCR stehen, die der DGGE vorangestellt ist. Neben der einfachen Möglichkeit, durch PCR, stabile DNA-Sequenzen an das Ende amplifizierter Fragmente einzuführen, ist sie auch unabdingbar, um ausgehend von der extrem niedrigen Menge des Ausgangsmaterials, eine genügend hohe Anzahl von Kopien zur Analyse herzustellen, und die seltenen mutierten DNA Fragmente vor Verlust durch stochastische Schwankungen während des analytischen Prozesses zu schützen. Der Beitrag zu dem generellen, die Analyse beeinträchtigenden Hintergrund in der DGGE, liegt in der Erzeugung von Fehlern der DNA Synthese durch die Polymerase, während der PCR, als auch in dem Vorliegen von Primermutanten, die in die Syntheseprodukte eingeführt werden, begründet. Beide tragen zur Erzeugung von Heteroduplex-DNA bei, und werden somit durch die DGGE von der Wildtyp-DNA getrennt. Wir entschieden uns dafür, die aus *Pyrococcus furiosus* stammend Polymerase (*Pfu*) zu verwenden, da sie bis heute die niedrigste Fehlerrate aller bekannten, für PCR-Analysen tauglichen, Polymerasen besitzt. Zudem haben wir ausgewählte, aufgereinigte Primerpopulationen eingesetzt, die eine geringe Sequenzfehlerrate aufzeigen. Doch ungeachtet dieser Maßnahmen, liegt die Fraktion der künstlich erzeugten mutierten Moleküle nicht unter einem Prozent, folglich hundert mal höher, als die geschätzte Frequenz von 0,01% der experimentellen, aus der ursprünglich zu untersuchenden Probe stammenden, Mutationen. Zusätzliche Mutationen, die im

Verläufe der Analyse auftreten, werden durch schädigende Wärmeeinwirkung hervorgerufen. Die in dem DGGE System zu analysierende DNA wird zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten erhitzt. Zunächst werden Heteroduplex-DNA Stränge erzeugt, indem die Proben bei 95° C denaturiert, und anschließend durch Inkubation bei 70° C renaturiert werden. Des Weiteren erfolgt die Durchführung der DGGE, über mehrere Stunden hinweg, bei einer konstant gehaltenen Temperatur von 60° C. Wir haben die Schmelzbedingungen mit Bezug auf Schonung der DNA optimiert, indem ein schützender Puffer (50mM HEPES pH 8,6) verwendet wurde, und indem die Inkubationszeit bei 95° C auf eine minimale Zeitspanne (30s) reduziert wurde. Dennoch befanden sich trotz des Einsatzes dieses verbesserten Protokolls annähernd 10% einer geschmolzenen und renaturierten homogenen Testprobe, bestehend aus klonierter DNA, in jenem Abschnitt des DGG's die der vermutlichen Heteroduplexregion entspricht. Wir konnten zeigen, dass dieser Hintergrund zum größten Teil aus Spaltprodukten, einzelsträngiger DNA, und Heteroduplex DNA besteht, gebildet durch Depurinierung/Depyrimidinierung, und Deaminierung. Wir waren in der Lage zu bestätigen, dass diese Prozesse nicht ausschließlich während des Denaturierungs-/Renaturierungs-Zyklus stattfinden, sondern auch während des Verlaufs der elektrophoretischen Auftrennung der DNA. Ein Großteil dieser künstlich erzeugten, mutierten DNA Fragmente, läuft in jenem Segment des Gels, in dem sich, Berechnungen zufolge, Heteroduplex DNA mit nur einer Basenfehlpaarung befindet. Dies würde bedeuten, dass sie durch das Verwerfen dieses Segmentes, eliminiert werden können, und somit DNA isoliert werden kann, die sich in jenem Teil des Gels befindet, in dem komplexere Mutationen auftreten. Wir konnten jedoch zeigen, dass selbst durch den Einsatz dieser Maßnahme maximal nur eine zwanzigfache Anreicherung durch die Verwendung von DGGE mit durch PCR vervielfältigten DNA Proben erreicht werden kann. Zudem können aufgrund der inhärenten Eigenschaften des den Hintergrund erzeugenden Materials zusätzliche Zyklen der DGGE, mit Proben, die bereits einmal einen präparativen Zyklus durchliefen, den Aufreinigungsfaktor offensichtlich nicht erhöhen. Zusammengefasst legen unsere Ergebnisse nahe, dass DGGE weder eine angemessene Methode für unsere Zwecke ist, noch auf einfache Weise eine solche werden kann.

---

Patterns of allelic variation in Major Histocompatibility Complex (MHC) genes suggest that germline segmental exchange is a primary mechanism in the generation of molecular variants to put at the disposition of natural selection. The best evidence for the existence of a natural gene conversion mutator operating on MHC genes comes from the documented instances of MHC class I mutation in the laboratory mouse. The major target for the recorded events was the *H-2K<sup>b</sup>* gene, with an overall frequency around  $10^{-4}$ . The aim of our work was to develop an *H-2K<sup>b</sup>* gene conversion detector with a view to ascertaining the adaptive significance and molecular properties of the underlying mutational mechanism. We have tried to make use of the mutation-enriching potential of Denaturant Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to bring rare conversion mutants to visibility. A DGGE system was developed to resolve and enrich mutations in PCR amplified segments of *K<sup>b</sup>*. The use of a GC-clamp and very fine temperature control in 2mm tube-gels enables the detection of single base changes embedded in these high  $T_m$  domains. We have extensively characterised background factors counteracting mutation enrichment in the tube-DGGE system. At each step in the protocol, artefactual mutations accumulate which significantly dilute the experimental mutations. The former are 1) polymerase and primer errors, in the PCR amplification; and 2) the products of heat-induced damage, occurring in the denaturation-renaturation cycle and during electrophoresis itself. We have determined that no more than 20-fold enrichment can be obtained by means of DGGE in PCR-amplified samples. Moreover, because of the nature of the trailing material, additional cycles of tube-DGGE on one-cycle enriched fractions appear incapable of improving enrichment factors. Taken together, our results conclusively indicate that DGGE is not and cannot easily become an appropriate method for our purposes.