

**Funktionelle Analyse von MHC-Klasse-I-Genen
des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*)**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von
Cornelia Melanie Rosner
aus Kassel**

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Dr. R. Hardeland

Korreferent: Prof. Dr. E. Wimmer

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2008

Diese Arbeit wurde in der Forschergruppe Primatengenetik am Deutschen Primatenzentrum (DPZ) angefertigt.

„Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit einem
Schlusspunkt, sondern mit einem Fragezeichen.“

Hermann Hesse

Für meine Eltern!

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Die angeborene Immunantwort	1
1.1.2 Die adaptive Immunantwort	2
1.2 Der Haupthistokompatibilitätskomplex.....	3
1.2.1 Genetische Organisation bei Mensch und Rhesusaffe	3
1.2.2 Die MHC-Moleküle.....	4
1.2.2.1 MHC-Klasse-I-Moleküle.....	5
1.2.2.2 Funktionen der MHC-Klasse-I-Gene und Antigenpräsentation.....	7
1.2.2.3 Intrazellulärer MHC-Klasse-I-Transport.....	8
1.2.3 β 2-Mikroglobulin (β 2M).....	9
1.3 MHC-Klasse-I-Gene in der AIDS-Forschung.....	9
1.4 Natürliche Killerzellen	11
1.4.1 Rezeptoren natürlicher Killerzellen.....	12
1.4.2 Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR)	13
1.4.2.1 KIR beim Rhesusaffen	14
1.5 MHC-Klasse-I-Interaktion mit KIR	16
1.6 <i>Missing self</i> Hypothese.....	17
1.7 <i>Licensing verses Disarming</i>	19
1.8 Zielsetzung der Arbeit	20
UNTERSUCHTE TIERE UND MATERIALIEN.....	21
2.1 Untersuchte Tiere	21
2.2 Humane Probanden	21
2.3 Geräte	22
2.4 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.5 Chemikalien.....	24
2.6 Puffer und Lösungen	26
2.8 Enzyme	30
2.9 Kits	31

2.10	Klonierungsvektoren	31
2.11	Bakterienstämme	31
2.12	Säugetierzellen.....	31
2.13	Oligonukleotide	32
2.14	Antikörper.....	33
2.15	Längenstandards	34
2.16	Computerprogramme und Datenbanken.....	34
2.16.1	Computerprogramme.....	34
2.16.2	Datenbanken	35
METHODEN		36
3.1	Molekulargenetische Methoden	36
3.1.1	Isolation von Nukleinsäuren.....	36
3.1.1.1	Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	36
3.1.1.2	Midi- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen.....	36
3.1.1.3	DNA-Isolation aus Blut.....	37
3.1.1.4	RNA- Isolation aus Blut und Zellen.....	37
3.1.2	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	38
3.1.2.1	Bestimmung der Desoxyribonukleinsäurekonzentration.....	38
3.1.2.2	Bestimmung der Ribonukleinsäurekonzentration	38
3.1.3	Reverse Transkription	38
3.1.4	Agarosegele	39
3.1.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
3.1.6	Sequenzierung von doppelsträngiger DNA.....	42
3.1.7	Restriktion von DNA.....	43
3.1.8	DNA-Extraktion aus Agarosegel.....	44
3.1.9	Klonierung.....	44
3.1.9.1	Klonierung von PCR-Produkten.....	44
3.1.9.2	Klonierung in Expressions-Vektoren	45
3.1.9.3	Fällen von Ligationsansätzen	46
3.1.10	Herstellung „elektrokompetenter“ Bakterien	47
3.1.11	Transformation von „elektrokompetenten“ Bakterien	47
3.1.12	Kolonie-PCR	48
3.1.13	Kultivierung von Bakterienkulturen.....	49

3.1.14	Herstellung von Glycerin-Bakterienstocks.....	49
3.1.15	Erythrozytenlyse von Blutproben.....	49
3.1.16	Auftrennung von mononukleären Blutzellen (PBMC) aus Vollblut.....	49
3.2	Zellkultur	50
3.2.1	Bestimmung der Zellzahl	50
3.2.2	Mycoplasmen-Kontrolle.....	50
3.2.3	Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen.....	51
3.2.4	Selektion auf transfizierte Zellen.....	52
3.2.5	Anreicherung von MHC-Klasse-I-transfizierten K562 Zellen.....	53
3.2.6	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	53
3.2.7	Messung der zytolytischen Aktivität	54
3.2.8	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell scanning</i> ; FACS).....	55
3.2.8.1	Antikörpermarkierung für FACS-Analysen	57
3.2.8.2	Intrazelluläre Antikörpermarkierung für FACS-Analysen.....	57
3.2.9	Degranulierungsassay	58
3.2.10	MHC-Klasse-I - KIR-Bindungsassay	60
3.2.11	Konfokale Mikroskopie.....	61
3.2.11.1	Das Prinzip der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie.....	61
3.2.11.2	Konfokale Mikroskopie am LSM 410.....	61
3.2.11.3	Präparation von Zellen für mikroskopische Expressions-Analysen.....	62
3.3	Proteinanalytische Methoden	63
3.3.1	Präparation von Proteinlysaten.....	63
3.3.2	Proteinanalyse über SDS-Polyacrylamid-Gradientengele (PAGE).....	63
3.3.3	<i>Immunoblot</i> -Analysen	63
3.3.4	Protein-Markierung im <i>Immunoblot</i>	64
3.3.5	Chemilumineszenzreaktion (<i>enhanced chemiluminescence-</i> (ECL-) <i>reaction</i>)....	64
3.4	Alignierung und Stammbaumrekonstruktion	65
ERGEBNISSE		66
4.1	Untersuchung der MHC-Klasse-I-Gene des Rhesusaffen.....	66
4.1.1	Etablierung von MHC-Klasse-I-spezifischen PCR	66
4.1.2	Phylogenetische Analyse der isolierten MHC-Klasse-I-Gene des Rhesusaffen ...	69
4.1.2.1	Identifikation unterschiedlicher MHC-Klasse-I-Sequenzen des Rhesusaffen	69
4.1.2.2	Identifikation eines neuen <i>Mamu-B</i> -Gens und neuer Varianten	70

4.1.2.3	Genomische Zuordnungen der isolierten Sequenzen	71
4.2	Etablierung von Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Transfektanten in humanen Zellen.....	74
4.2.1	Analyse der Antigenbinderegion.....	75
4.2.2	<i>Immunoblot</i> -Analysen der MHC-Klasse-I-Transfektanten.....	77
4.2.3	Analyse der subzellulären Lokalisation von MHC-Klasse-I-Molekülen des Rhesusaffen	80
4.2.4	Vergleich der Analysen der Antigenbinderegionen mit den Ergebnissen zur subzellulären Lokalisation.....	89
4.2.5	Detail-Analyse ungewöhnlicher MHC-Klasse-I-Transkripte des Rhesusaffen.....	90
4.3	Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Moleküle als Liganden für NK-Zellrezeptoren	96
4.3.1	Einfluss von Mamu-A-Molekülen auf die NK-Zellaktivierung im Chromfreisetzungstest	96
4.3.2	Einfluss von Mamu-A-Molekülen auf die NK-Zellaktivierung im Degranulierungsassay.....	99
4.4	<i>Mamu-A</i> -Typisierung	103
4.5	Erkennung einzelner Mamu-A-Moleküle durch KIR-Fusionsproteine.....	108
4.5.1	Spezifische Interaktion von Mamu-A-Molekülen und rekombinanten KIR-Ig Fusionsproteinen.....	108
4.5.2	Die Stärke der KIR-Bindung ist abhängig von der Stärke der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression	112
4.5.3	Analyse der <i>Mamu-A</i> -Sequenzen hinsichtlich der KIR-Bindung.....	113
DISKUSSION		118
5.1	Gewinnung von MHC-Klasse-I-Sequenzen des Rhesusaffen und deren genomische Einordnung	118
5.2	Unterschiede in der subzellulären Lokalisation unterstreichen die Sequenz-Variationen der MHC-Klasse-I-Gene des Rhesusaffen.....	125
5.3	Mamu-A-Moleküle als Zielstrukturen für NK-Zellrezeptoren.....	132
FAZIT UND AUSBLICK		141
ZUSAMMENFASSUNG		143

SUMMARY	145
LITERATURVERZEICHNIS	146
ANHANG	160
ABKÜRZUNGEN.....	177
DANKSAGUNG.....	181
LEBENS LAUF	183

EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

Jeder Organismus ist ständig den Einflüssen der Umwelt ausgesetzt, wobei manche dieser Einflüsse (z. B. Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten) die körperliche Unversehrtheit eines Organismus bedrohen. Alle höheren Organismen besitzen daher ein biologisches Abwehrsystem, das Immunsystem. Neben rein physikalischen Barrieren versucht es, mit einem Netzwerk aus verschiedenen Organen, Zelltypen und Molekülen eine Gewebeschädigung zu verhindern.

Hat ein Pathogen erfolgreich die ersten Barrieren des Organismus überwunden, wird eine schnelle, angeborene Antwort ausgelöst. Erst nach vier bis sieben Tagen reagieren T- und B-Zellen im Rahmen der adaptiven Immunantwort auf ein Pathogen.

1.1.1 Die angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort ist die erste Verteidigungslinie des Körpers. Sie kann innerhalb weniger Minuten oder einiger Stunden reagieren, da keine klonale Expansion erforderlich ist. Viele Pathogene können so ohne erkennbare klinische Symptome eliminiert werden.

Neben den verschiedenen Leukozytenpopulationen, wie phagozytierenden Zellen (Neutrophile Granulozyten, Makrophagen) sowie den Natürlichen Killer (NK)-Zellen, zählt man auch Serumproteine, wie die Bestandteile des Komplementsystems, und Zytokine, die regulatorisch und koordinativ arbeiten, zur angeborenen Immunität. Hat ein Pathogen das Epithelium durchdrungen, reagieren die Leukozyten. Makrophagen können Mikroben phagozytieren und durch Zytokin- und Chemokinproduktion andere Immunzellen an den Ort der Entzündung locken. Eine Entzündung ruft im Anschluss meist Neutrophile Granulozyten herbei, die ebenfalls phagozytieren. Die Sekretion von Interleukin (IL)-12 und IL-15 durch Makrophagen kann auch NK-Zellen aktivieren. Deren Interferon (INF)- γ -Produktion kann eine virale Replikation inhibieren, weitere Makrophagen aktivieren und Bakterien effektiver eliminieren. Des Weiteren wird die MHC-Klasse-I- und -II-Expression durch INF γ erhöht.

Zellen, die Zeichen einer Infektion aufweisen, wie die Expression von stress-induzierbaren Molekülen oder eine reduzierte MHC-Klasse-I-Expression, können von NK-Zellen erkannt werden und mit Hilfe von Perforin und Granzym abgetötet werden.

Ebenfalls nicht adaptiv agiert das Komplementsystem, ein Abwehrsystem gegen bakterielle Infektionen. Es besteht aus Plasmaproteinen, die in der Regel von Hepatozyten gebildet werden. Neben einer lytischen Funktion unterstützt es die Phagozytose durch Immunzellen. Die Aktivierung des Komplementsystems kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen und die adaptive Immunantwort einleiten (s. Kap. 1.1.2).

Der angeborene Teil des Immunsystems stellt den evolutionär älteren dar. Invertebraten verfügen z. B. über keinen adaptiven Teil des Immunsystems. Bei Vertebraten sind die beiden Teile des Immunsystems stark miteinander vernetzt (Janeway und Medzhitov, 2002).

1.1.2 Die adaptive Immunantwort

Antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APC), wie Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Lymphozyten migrieren im Laufe einer Immunantwort nach Interaktion mit Mikroben in die Lymphknoten und präsentieren dort den T- und B-Lymphozyten Antigene. T- und B-Lymphozyten differenzieren so zu unterschiedlichen antigenspezifischen Effektorzellen. B- und T-Lymphozyten exprimieren gegenüber Zellen der angeborenen Immunantwort keine keimbahnkodierte Antigen-Rezeptoren. Stattdessen werden ihre Rezeptoren während der Zellentwicklung durch eine Neuordnung der DNA (*DNA rearrangement*) generiert. Dies führt zur Expression eines spezifischen Rezeptortyps für jeden T- und B-Lymphozyt und dessen klonale Nachkommenschaft. Lymphozyten mit nutzlosen oder autoreaktiven Rezeptoren werden schon im Knochenmark (B-Lymphozyten) bzw. im Thymus (T-Lymphozyten) eliminiert. Bei einer Immunantwort werden nur solche T- und B-Lymphozyten aktiviert, die einen für die Antigene relevanten Rezeptor exprimieren. Anschließend kann eine Differenzierung in Plasma-B-Lymphozyten, die Antikörper produzieren, und in CD4⁺-T-Helferzellen bzw. CD8⁺-T-Killerzellen erfolgen.

Über das Blut gelangen aktivierte T- und B-Lymphozyten, geleitet durch Chemokine, zum Ort der Infektion. CD8⁺-T-Lymphozyten erkennen durch die Präsentation von antigenen Peptiden, über MHC-Klasse-I-Moleküle, infizierte Zellen und Antikörper binden spezifisch Viren, Mikroben und deren Produkte sowie infizierte Zellen. Antikörper gegen Viren haben

dabei eine neutralisierende Wirkung. Phagozytierende Zellen oder das Komplementsystem erkennen über den Fc-Teil der Antikörper die Mikroben oder infizierte Zellen und können diese anschließend töten.

Nach einer erfolgreichen Immunantwort bleiben einige B- und T-Lymphozyten zurück und bilden so das immunologische Gedächtnis.

Forschungsergebnisse aus der jüngeren Vergangenheit haben gezeigt, dass die Grenzen zwischen angeborener und spezifischer Immunantwort nicht statisch sondern fließend sind. Die beiden Systeme beeinflussen sich gegenseitig, um eine optimale Immunantwort zu gewährleisten (Raulet, 2004; Vivier und Malissen, 2005).

1.2 Der Haupthistokompatibilitätskomplex

1.2.1 Genetische Organisation bei Mensch und Rhesusaffe

Bei der Immunantwort spielt der Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) eine zentrale Rolle. Bei Wirbeltieren umfasst dieser Komplex Gene, die mit der Immunerkennung und der Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) bei Transplantationen assoziiert sind (Payne und Rolfs, 1958; van Rood *et al.*, 1958).

Die MHC-Moleküle werden auf der Zelloberfläche exprimiert und interagieren mit Rezeptoren auf T- und NK-Zellen, wodurch die Immunantwort vermittelt wird. Sie lassen sich leicht auf Leukozyten nachweisen und werden daher beim Menschen HLA (*human leukocyte antigen*)-Rezeptoren genannt. Die Gene des MHC des Rhesusaffen werden mit dem Präfix *Mamu* (*Macaca mulatta*) zur Abgrenzung von MHC-Genen anderer Spezien versehen. Der MHC ist eine komprimierte Ansammlung von Genen, denen vielfältige immunologische Funktionen zugeschrieben werden. Er ist beim Menschen wie auch beim Rhesusaffen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 lokalisiert, beim Menschen an Position 6p21.3, beim Rhesusaffen an Position 6p24 (Huber *et al.*, 2003). Die Genomgröße des MHC weist jedoch bemerkenswerte Unterschiede auf. Die menschliche Sequenz erstreckt sich über 3,7 Mb (The MHC sequence consortium, 1999), der MHC des Rhesusaffen umfasst dagegen ca. 5,3 Mb (Daza-Vamenta *et al.*, 2004). Abbildung 1.1 veranschaulicht, dass der Größenunterschied hauptsächlich auf Expansionen in den MHC-Klasse-I-A- und MHC-Klasse-I-B-Regionen zurückzuführen ist.

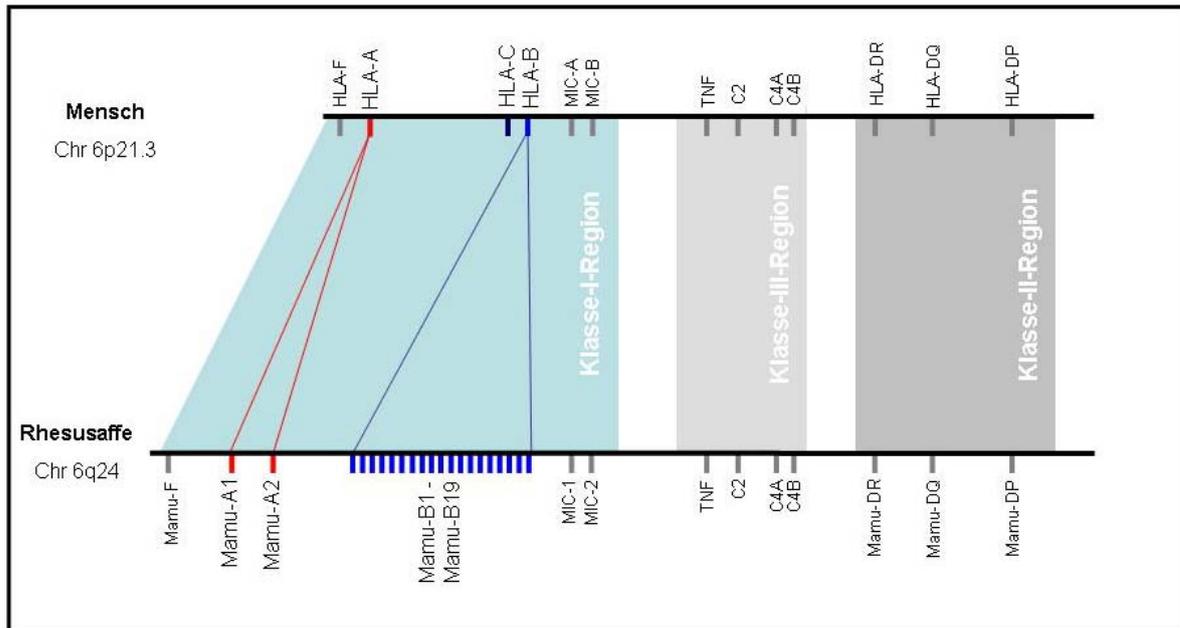


Abb. 1.1: Lineare Darstellung eines Vergleichs des MHC von Mensch und Rhesusaffe (verändert nach Daza-Vamanta *et al.*, 2004).

Das telomerische Ende liegt zur Linken, das zentromerische zur Rechten. Die chromosomale Lokalisierung ist links angegeben. Die MHC-Klasse-I-Region mit den im Rhesusaffen expandierten Klasse-I-A- und Klasse-I-B-Regionen ist hellblau hinterlegt. Die Klasse-II-Region ist dunkelgrau, die Klasse-III-Region hellgrau hinterlegt. Neben den Klasse-I-Genen sind einige immunologisch bedeutsame Gene zur Orientierung eingezeichnet.

1.2.2 Die MHC-Moleküle

MHC-Moleküle sind in der Zellmembran verankerte Glykoproteine, die der Immunglobulinsuperfamilie angehören. Man unterscheidet drei Regionen innerhalb der MHC-Region:

Moleküle der Klasse-I-Region (beim Mensch HLA-A, -B, -C) werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren intrazelluläre Antigene in Form von Nonamerpeptiden. Die Peptide können sowohl aus Zellproteinen als auch aus endogenen Viren und Tumoren stammen (Dunlop und Blanden, 1977; Rammensee *et al.*, 1995).

Moleküle der Klasse-II-Region (beim Mensch HLA-DP, -DM, -DQ, -DR) werden nur auf immunregulatorischen Zellen, wie APC exprimiert. Sie präsentieren 12 - 14 Aminosäure (AS) lange Peptide extrazellulärer Antigene wie Bakterien oder Toxine. Diese Antigene müssen dafür vor der Präsentation zunächst endozytiert werden (Germain und Malissen, 1986).

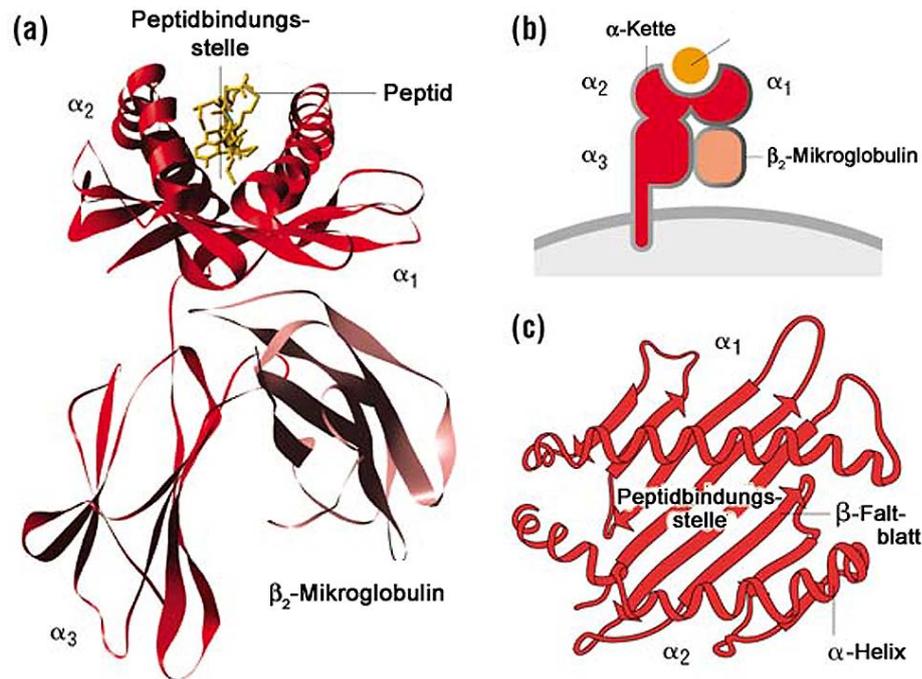
In der Klasse-III-Region sind diverse Molekülgruppen verschlüsselt, unter anderem Komplementfaktoren, inflammatorische Zytokine, Tumornekrosefaktor (TNF)- α und - β und Hitzeschockproteine.

1.2.2.1 MHC-Klasse-I-Moleküle

MHC-Klasse-I-Moleküle werden klassischerweise zur angeborenen Immunantwort gezählt und auf allen Zellen mit Ausnahme von Erythrozyten und Neuronen exprimiert. Sie bestehen aus einer schweren Kette mit drei extrazellulären Domänen ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), einer Transmembranregion und einem kurzen zytoplasmatischen Teil (Natarajan *et al.*, 1999). Die schwere Kette (42 kD) assoziiert vor allem über die $\alpha 3$ -Domäne nicht-kovalent mit $\beta 2$ -Mikroglobulin ($\beta 2M$), dessen Gen außerhalb des MHC auf Chromosom 15 des Menschen lokalisiert ist. Die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne bilden mit je einer α -Helix und einem viersträngigen β -Faltblatt die Bindungsstelle für Rezeptoren auf T- und NK-Zellen aus. Zwischen den Helices befindet sich die Peptidbindungsregion (*peptide binding region*, PBR), in der Antigene präsentiert werden (Abb. 1.2). Durch den hohen Grad an Polymorphismus können verschiedene MHC-Klasse-I-Moleküle Peptide aus unterschiedlichen AS-Kombinationen in ihrer PBR binden. Dadurch wird eine sehr diverse Peptidpräsentation erreicht (Rodgers und Cook, 2005).

Die klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle sind beim Menschen die hochpolymorphen HLA-A-, HLA-B- und HLA-C-Moleküle. Derzeit sind 580 Allele für HLA-A, 921 Allele für HLA-B und 312 Allele für HLA-C bekannt (*IMGT/HLA Database: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.htm>*). Beim Rhesusaffen finden sich zwei bis vier *Mamu-A*-Loci, die unterschiedlich polymorph sind (Otting *et al.*, 2007). Die *Mamu-B*-Region ist sehr komplex und kann je nach Haplotyp eine unterschiedliche Anzahl an funktionellen Genen aufweisen. Dabei scheinen einige Gen-Loci polymorpher als andere zu sein (Daza-Vamenta *et al.*, 2004). Von Urvater und Kollegen wurden weitere MHC-Klasse-I-cDNA-Sequenzen vom Rhesusaffen isoliert und als *Mamu-I* bezeichnet (Urvater *et al.*, 2000b). Diese Sequenzen ähneln stark den *Mamu-B*-Sequenzen und zeigen sowohl Eigenschaften klassischer als auch nicht-klassischer MHC-Klasse-I-Gene. Obwohl sie ubiquitär transkribiert werden und nach Transfektion in eine humane Zelllinie Oberflächenexpression nachgewiesen werden konnte, sind sie wenig polymorph und zeigen keine Hinweise auf eine positive Selektion der AS, die an der Peptidbindung beteiligt sind.

MHC-Klasse-I



© 1999–2007 New Science Press

Abb. 1.2: Struktur des MHC-Klasse-I-Moleküls (nach DeFranco und Locksley, 2007).

Das MHC-Klasse-I-Molekül setzt sich aus einer polymorphen α -Kette, die nicht-kovalent an das nicht-polymorphe β_2 M gebunden ist, und einem in der Bindungsgrube gebundenen Peptid zusammen. (a) zeigt die extrazellulären Bestandteile des Moleküls in einer Röntgen-Kristallographie-Darstellung. (b) gibt ein schematisches Diagramm wieder. (c) zeigt eine Aufsicht auf die Bindungsgrube aus α -Helices und β -Faltblatt.

Im Gegensatz zu höheren Primaten, weist der Rhesusaffen-MHC keinen C-Locus auf (Boyson *et al.*, 1996b). Der MHC-C-Gen-Locus entwickelte sich vermutlich innerhalb der Menschenaffen durch Duplikationen aus dem MHC-B-Gen-Locus. Im Genom von Mensch, Schimpanse und Gorilla liegt der MHC-Klasse-I-C-Locus fixiert vor und wird durch zwei verschiedene Allotypen (C1- und C2-Typ) repräsentiert (Parham, 2005). Dagegen weisen Orang-Utans nur in 50 % der MHC-Haplotypen einen MHC-C-Gen-Locus auf und zeigen nur einen der beiden Allotypen (Adams *et al.*, 1999). Bei Gibbons (kleine Menschenaffen) konnte wiederum kein MHC-C-Gen-Locus nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 1992).

Im Rhesusaffen führte selektiver Druck zu haplotypischen Expansionen. Dies könnte evolutionäre Mechanismen innerhalb von Populationen reflektieren. Zum einen wird dies durch die Zunahme der *Mamu-A*- und *Mamu-B*-Gen-Loci und zum anderen durch Transpositionen einzelner Sequenzabschnitte deutlich (Daza-Vamenta *et al.*, 2004).

Als nicht-klassische HLA-Klasse-I-Moleküle werden die weniger polymorphen HLA-E, -F und -G Moleküle bezeichnet. Der Rhesusaffe weist Homologe in Form von *Mamu-E* und *Mamu-F* auf. Daneben findet man Gen-Loci paralog zu *HLA-G*, *Mamu-G1* bis *Mamu-G4*, bei denen es sich allerdings um Pseudogene handelt. Eine weitere Gengruppe, die *Mamu-AG*-Gene, wird in der Plazenta von Rhesusaffen exprimiert (Bondarenko *et al.*, 2007) und übernehmen die funktionelle Rolle der humanen HLA-G-Moleküle. Sie entwickelten sich vermutlich aus dem *Mamu-A*-Gen-Locus (Boyson *et al.*, 1996a).

1.2.2.2 Funktionen der MHC-Klasse-I-Gene und Antigenpräsentation

Während die zentrale Rolle der HLA-Klasse-I-Moleküle als Liganden für spezifische T-Lymphozyten seit langem bekannt ist (Dunlop und Blanden, 1977), ist ihre Rolle bei der Regulierung von NK-Zellen erst später in den Vordergrund getreten. Der Einfluss der MHC-Klasse-I-Moleküle auf die Aktivität von NK-Zellen wurde erstmals im Jahre 1986 von Ljunggren und Kärre (Kärre *et al.*, 1986; Ljunggren und Kärre, 1990) mit Hilfe der so genannten *missing self*-Hypothese beschrieben. Nach dieser Hypothese können NK-Zellen alle Zielzellen lysieren, die wenige oder gar keine MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Auf humanen NK-Zellen sind mittlerweile viele inhibitorische Rezeptoren bekannt, die zum Teil spezifisch für einzelne MHC-Klasse-I-Allele sind (Moretta *et al.*, 2000). Neben inhibierenden sind seit einigen Jahren auch aktivierende NK-Zellrezeptoren bekannt. Die Reaktion einer NK-Zelle wird durch die Summe der inhibierenden und aktivierenden Signale bestimmt (Lanier, 1998; Moretta *et al.*, 1996; Ravetch und Lanier, 2000). Die NK-Regulation wird dadurch sowohl qualitativ (Expressionsmuster) als auch quantitativ (Expressionsstärke) durch ihre Oberflächenrezeptoren beeinflusst.

MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren in der Regel zytosolische Peptide und T-Zellen sind durch Selektion im Thymus gegenüber solchen MHC-Komplexen mit endogenen Peptiden tolerant. Zellen, die körpereigene Peptide präsentieren, werden daher nicht abgetötet. Bei einer viralen Infektion oder einer malignen Transformation werden jedoch auch virale bzw. tumorspezifische Antigene im Kontext mit MHC-Klasse-I-Komplexen auf der Zelloberfläche präsentiert. Zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T-lymphocytes*, CTL) erkennen diese Peptid-MHC-Komplexe als fremd und können die Zelle lysieren. Einige Viren und auch Tumorzellen sind in der Lage, diese Immunabwehr zu umgehen, indem sie die MHC-Klasse-I-Expression

auf der Zelloberfläche verringern (Alcami und Koszinowski, 2000; Falk *et al.*, 2002; Natali *et al.*, 1989). Gemäß der *missing self*-Hypothese können aber in einem solchen Fall NK-Zellen eingreifen, da die inhibitorischen Rezeptoren nicht weiter aktiviert werden können, sodass aktivierende Signale überwiegen und die Zielzelle zerstört werden kann.

1.2.2.3 Intrazellulärer MHC-Klasse-I-Transport

Zusammenbau und intrazellulärer Transport der MHC-Klasse-I-Komplexe stellen wichtige essentielle Schritte bei der Antigenpräsentation dar.

Die schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls und das $\beta 2M$ werden während der Translation in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Die Faltung und Zusammenlagerung von schwerer Kette und $\beta 2M$ wird durch die ER-Chaperone (Calnexin, Calretikulin und ER-p57) gewährleistet. Tapasin, ein weiteres Chaperon, assoziiert den Komplex aus schwerer Kette und $\beta 2M$ mit dem Peptidtransporter TAP (*transporter associated with antigen presentation*) (Sadasivan *et al.*, 1996). Die Stabilität dieses Komplexes wird anschließend durch die Bindung eines hochaffinen Peptids erhöht. Ohne gebundenes Peptid, werden MHC-Klasse-I-Komplexe im ER zurückgehalten (Townsend *et al.*, 1989) und sind bei 37 °C instabil (Hughes *et al.*, 1997). Die geschlossene Form der Peptidbindegrube, gebildet durch $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne, bedingt eine Peptidlänge von acht bis zehn Aminosäureresten (Falk *et al.*, 1991). Neben der Länge des Peptids entscheiden allelspezifische Ankerreste über die Bindungsaffinität (Rammensee *et al.*, 1995). Abschließend werden vor dem Transport an die Zellmembran im ER und Golgiapparat Oligosaccharidseitenketten so modifiziert, dass die MHC-Klasse-I-Moleküle Endoglykosidase H-resistent sind.

Die hier beschriebenen Kontrollmechanismen gewährleisten, dass nur funktionelle Komplexe ihr gebundenes Peptid auf der Zelloberfläche präsentieren können. In ansonsten intakten Zellen kann vor allem die Abwesenheit von passenden Peptiden eine Oberflächenexpression einzelner MHC-Klasse-I-Allele verhindern.

1.2.3 β 2-Mikroglobulin (β 2M)

Das β 2M-Protein wurde erstmals im Jahre 1968 aus dem Urin eines Patienten isoliert und als leichte Kette von HLA-A, -B und -C identifiziert (Berggard und Bearn, 1968). Das 100 AS lange und 12 kDa schwere Protein ist beim Mensch auf Chromosom 15 kodiert und assoziiert nicht-kovalent mit der schweren Kette des MHC-Klasse-I.

In den meisten physiologischen Situationen ist die korrekte Anordnung von schwerer und leichter Kette essentiell für eine Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen und deren Funktion (Arce-Gomez *et al.*, 1978; Koller *et al.*, 1990). Dennoch wurden auch einige Ausnahmen beobachtet, z. B. für MHC-Klasse-I-Moleküle der Maus, die nach Transfektion der schweren MHC-Klasse-I-Kette in eine β 2M-defiziente Zelllinie auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnten (Allen *et al.*, 1986).

Im Gegensatz zur hochpolymorphen schweren Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls ist die β 2M-Sequenz sehr konserviert. Die Aminosäuresequenz des Rhesusaffen- β 2M ist beispielsweise zu 92,4 % identisch mit der humanen β 2M-Sequenz. Die Unterschiede basieren auf neun Aminosäureaustauschen. Die beiden beim Rhesusaffen identifizierten β 2M-Sequenzen (β 2M*011, β 2M*012) unterscheiden sich nur in einer einzigen Aminosäure in der *leader*-Sequenz. Die Unterschiede in den Sequenzen von Mensch und Rhesusaffe finden sich ausschließlich in Bereichen des Moleküls, die nicht mit der schweren Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls interagieren. Die Bindungsstellen zwischen dem β 2M und der schweren Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls ist komplett konserviert. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die schweren Ketten des MHC-Klasse-I vom Rhesusaffen mit ähnlicher Affinität an humanes β 2M binden wie an das eigene (Su *et al.*, 2004). Dennoch bleiben Probleme bei der Assoziation einzelner Mamu-A- oder Mamu-B-Moleküle mit dem humanen β 2M nicht ausgeschlossen.

1.3 MHC-Klasse-I-Gene in der AIDS-Forschung

Rhesusaffen werden aufgrund ihrer leichten Haltung und ihrer phylogenetischen Nähe zum Menschen oft für die Erforschung von Krankheiten und die Medikamentenentwicklung herangezogen. Gerade im Bereich der (*acquired immune deficiency syndrome*) AIDS-Forschung stellt die (*simian immunodeficiency virus*) SIV-Infektion von nicht-humanen Primaten ein wichtiges Tiermodell zur Erforschung der (*human immunodeficiency virus*)

HIV-Infektion beim Menschen dar. Sowohl bei HIV-infizierten Menschen als auch bei SIV-infizierten Makaken konnte ein starker Zusammenhang zwischen einzelnen MHC-Klasse-I-Allelen und dem Krankheitsverlauf nachgewiesen werden. Bei humanen HIV-Infektionen ist *HLA-B*35* mit einem schnellen Voranschreiten der Krankheit assoziiert (Carrington *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2002; Scorza Smeraldi *et al.*, 1988), während die Allele *HLA-B*27* und *-B*57* dagegen mit einem längeren Überleben der Patienten nach HIV-Infektion in Verbindung gebracht werden (Gao *et al.*, 2001; Migueles *et al.*, 2000).

Dementsprechend konnten auch im SIV-Infektionsmodell mit Makaken einzelne Allele mit einem langsameren Voranschreiten der AIDS-ähnlichen Symptome in Zusammenhang gebracht werden. Vor allem *Mamu-A*01* zeigte eine signifikante Assoziation mit einer längeren Überlebenszeit der Tiere (Miller *et al.*, 1991; Mothe *et al.*, 2003; Mühl *et al.*, 2002; O'Connor *et al.*, 2003). Unter den *Mamu-B*-Allelen wurden *Mamu-B*08* und *Mamu-B*17* in Zusammenhang mit einem langsameren Krankheitsverlauf bei SIV-infizierten Makaken gebracht (Loffredo *et al.*, 2007; Yant *et al.*, 2006). Aufgrund der vielen Duplikationen in der *Mamu-A*- und *Mamu-B*-Region (s. Kap. 1.2.1), weist der Rhesusaffe Haplotypen mit variablem Gengehalt auf. Daher scheint neben der Assoziation von einzelnen Allelen mit dem Krankheitsverlauf auch eine haplotypische Betrachtung der MHC-Klasse-I-Region im Zusammenhang mit SIV-Infektionen sinnvoll (Sauermaun *et al.*, 2008).

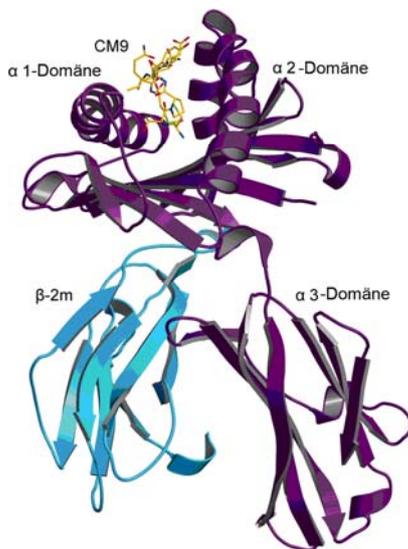


Abb. 1.3 : Überblick über die Gesamtstruktur von Mamu-A*01 in Komplex mit dem SIV-Peptid CM9 (nach Chu *et al.*, 2007).

Die schwere Kette aus $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Domäne ist violett dargestellt. $\beta 2m$ ist blau abgebildet. Das gebundene Peptid ist als Strichmodell mit farbigen Atomen wiedergegeben (C: gelb; N: blau; O: rot; S: grün).

Im Jahre 2007 wurde mit Mamu-A*01 (im Komplex mit zwei verschiedenen immunogenen SIV-Peptiden) erstmal die Kristallstruktur eines nicht-humanen MHC-Klasse-I-Moleküls beschrieben (Chu *et al.*, 2007). Die Gesamtstruktur ähnelt anderen MHC-Klasse-I-Molekülen, mit einer schweren Kette aus $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen sowie einer $\alpha 3$ -Domäne, die kovalent an

β 2M bindet (Abb. 1.3; vergl. Kap. 1.2.2.1 und Abb. 1.2). Aus vorangegangenen Studien war bereits bekannt, dass die Aminosäure Prolin an der Position P3 aller bisher beschriebenen Peptide, die in der Mamu-A*01-Peptidbindegrube binden, konserviert ist (Allen *et al.*, 1998; Dzuris *et al.*, 2000; Sidney *et al.*, 2000). Die Kristallstrukturen zeigten, dass die Peptidbindegrube von Mamu-A*01 eine hydrophobe Tasche aufweist, die stereochemisch optimal nur von Prolin okkupiert werden kann. Diese stringente Epitopbindung legt spezielle funktionelle Eigenschaften, unter anderem bei der Präsentation von viralen Peptiden an CTL, nahe.

1.4 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind große granuläre Lymphozyten und machen ca. 10 % der zirkulierenden Lymphozyten aus. Sie gehören wie phagozytierende Zellen und das Komplementsystem zur angeborenen Immunität, die als erste Hürde, nach Eindringen in den Organismus, von einem Pathogen überwunden werden muss. Die Rezeptoren der angeborenen Immunität sind, im Gegensatz zu Rezeptoren der adaptiven Immunität, durch Keimbahngene, die keine somatische Rekombination durchlaufen, verschlüsselt. NK-Zellen benötigen für die Reifung im Gegensatz zu T-Zellen keinen Thymus, dennoch ähneln sie funktionell eher T-Zellen als anderen Leukozyten der angeborenen Immunität. Sie weisen den gleichen Tötungsmechanismus (Granzym- und Perforinausschüttung, TNF-Sekretion) wie zytotoxische T-Lymphozyten auf und sezernieren $INF\gamma$ wie CTL und T_H1 -Helferzellen (Lanier, 2005). Sie sind in der Lage, innerhalb weniger Stunden nach Infektion, ohne vorherige Immunisierung, auf Zielzellen (z. B. transformierte oder infizierte Zellen) zu reagieren.

NK-Zellen sind mit einer Vielzahl von kleinen Granula ausgestattet, die bei Kontakt mit der Zielzelle die lytischen Enzyme Granzym B und Perforin freisetzen. Diese Enzyme leiten die Apoptose der Zielzelle ein (Delves und Roitt, 2000a; 2000b; Janeway *et al.*, 1997). Über aktivierende und inhibierende Rezeptoren interagieren die NK-Zellen mit Körperzellen. Die Summe der aktivierenden und inhibierenden Signale entscheidet dann über die Reaktion der Effektorzelle.

1.4.1 Rezeptoren natürlicher Killerzellen

Die Gene vieler Killerzellrezeptoren sind in Multigenfamilien organisiert, die sowohl aktivierende als auch inhibierende Rezeptoren umfassen. Solche Multigenfamilien sind meist in Genkomplexen organisiert. Zu diesen gehört die Lektin-Superfamilie auf Chromosom 12 und als größter Komplex der Leukozyten Rezeptor Komplex (LRC) auf Chromosom 19. Der LRC enthält Rezeptorgene der Immunglobulin-Superfamilie, zu denen die NKp46-Gene, die LAIR (*leukocyte-associated immunoglobulin-like receptors*) und auch die Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptorgene (KIR) gehören. KIR und NKp46-Rezeptoren werden nahezu ausschließlich von NK-Zellen exprimiert, wohingegen LAIR bevorzugt von Zellen der myeloischen Reihe und teilweise auch von B-, T- und NK-Zellen exprimiert werden.

Die Rezeptoren des LRC erkennen, soweit bisher bekannt, ihre Liganden im Kontext von so genannten Immunsynapsen. Die Affinität dieser Interaktionen ist relativ gering, um Blockierungen der Immunüberwachung oder Hypersensivität zu vermeiden. Diese niedrige Affinität macht die Erforschung der Interaktion, beispielsweise von MHC-Klasse-I-Molekülen und KIR, besonders schwierig.

Die inhibitorischen NK-Zellrezeptoren CD94/NKG2 und die KIR interagieren mit der NK-Zelle, trotz ihrer unterschiedlichen Topologie, auf die gleiche Weise mit Hilfe zytoplasmatischer immunrezeptor-tryrosinbasierender inhibitorischer Motive (ITIM). Durch Ligandenbindung können Tyrosine durch Tryrosinkinasen phosphoryliert werden. Dies leitet die Signaltransduktion über Phosphatasen ein und inhibiert so die effektorische Antwort der NK-Zelle.

Die KIR-Moleküle spielen bei der Regulierung der NK-Zellaktivität eine zentrale Rolle (Moretta *et al.*, 1996; Yokoyama und Seaman, 1993). So kann eine Überreaktion der NK-Zellen gegen gesundes, körpereigenes Gewebe verhindert und dennoch eine sofortige, gezielte Reaktion auf Tumorzellen oder infizierte Zellen gewährleistet werden.

Alle bisher bekannten humanen NK-Zellrezeptoren, deren Liganden MHC-Klasse-I-Moleküle sind, wurden in Abbildung 1.4 in einer schematischen Übersicht dargestellt.

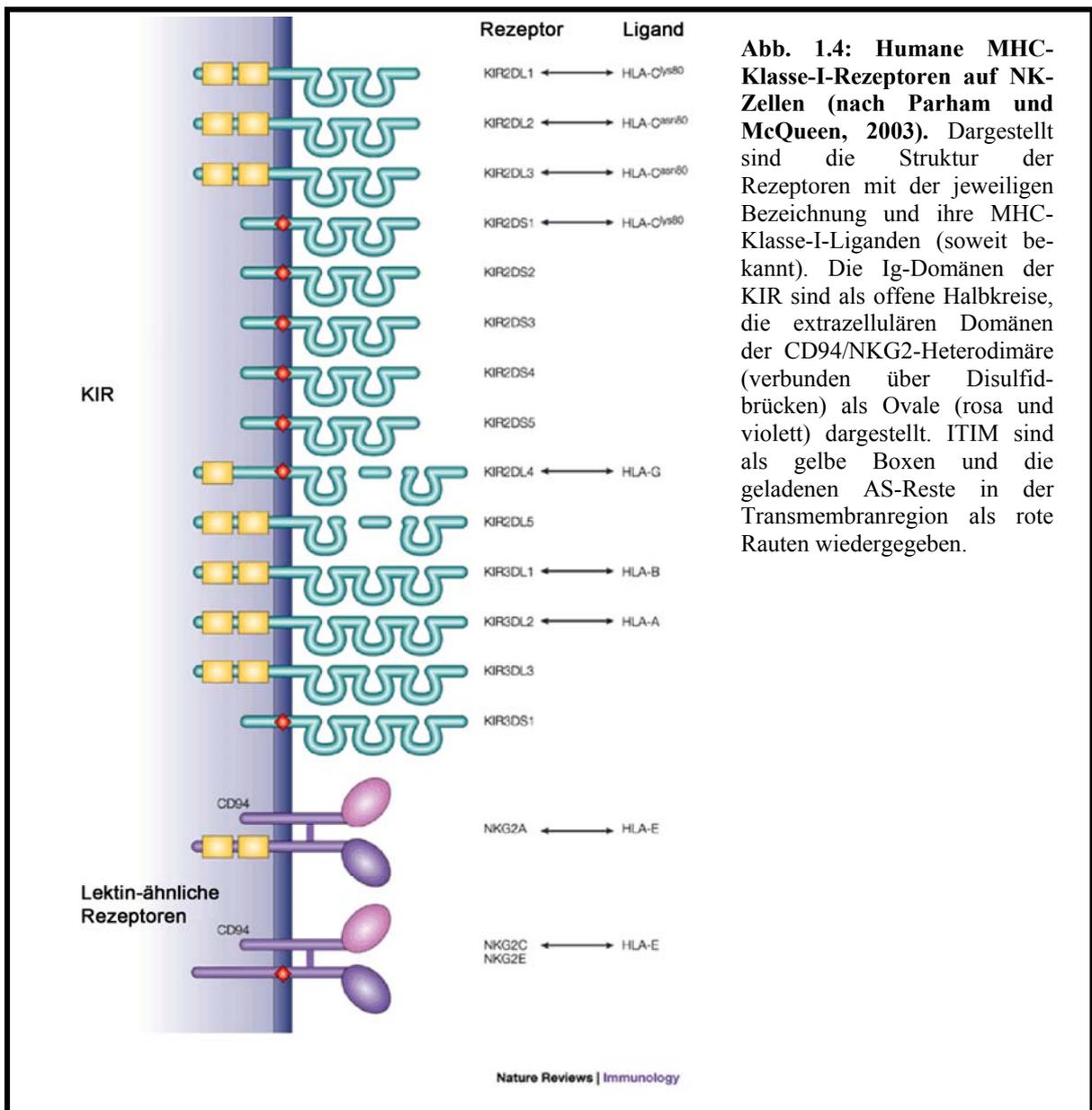


Abb. 1.4: Humane MHC-Klasse-I-Rezeptoren auf NK-Zellen (nach Parham und McQueen, 2003). Dargestellt sind die Struktur der Rezeptoren mit der jeweiligen Bezeichnung und ihre MHC-Klasse-I-Liganden (soweit bekannt). Die Ig-Domänen der KIR sind als offene Halbkreise, die extrazellulären Domänen der CD94/NKG2-Heterodimäre (verbunden über Disulfidbrücken) als Ovale (rosa und violett) dargestellt. ITIM sind als gelbe Boxen und die geladenen AS-Reste in der Transmembranregion als rote Rauten wiedergegeben.

1.4.2 Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR)

KIR-Moleküle sind eine Familie von diversen und sich rasch evolvierenden MHC-Klasse-I-Rezeptoren. Sie werden hauptsächlich von NK-Zellen, aber auch auf einer Subpopulation von $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert (Moretta *et al.*, 1990). Strukturell zählt man die KIR zur Ig-Superfamilie. Sie weisen ein bis drei extrazelluläre Ig-Domänen auf, über die auch die Bindung an ihre MHC-Klasse-I-Liganden stattfindet. Des Weiteren gliedern sie sich in eine Stammregion und eine Signaldomäne, die aus einer Transmembranregion und einer zytoplasmatischen Region aufgebaut ist. KIR-Moleküle mit einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz und einer geladenen Aminosäure in der Transmembranregion werden zu den

aktivierenden Rezeptoren gezählt, während KIR-Moleküle mit langem zytoplasmatischen Schwanz und ein oder zwei ITIM inhibierend wirken (Martin *et al.*, 2002).

Bei Primaten sind KIR die wichtigsten NK-Zellrezeptoren. Bei Mäusen wird die gleiche Funktion dagegen von den LY49-Molekülen übernommen (Natarajan *et al.*, 2002). Beim Menschen wurde nur ein LY49-ähnliches Gen gefunden, das nicht funktionell ist (Westgaard *et al.*, 1998).

Humane KIR-Haplotypen sind aufgrund von unterschiedlichen Gengehalten und allelischen Polymorphismen hoch variabel (Hsu *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2004; Shilling *et al.*, 2002; Yawata *et al.*, 2002). Vergleichende Analysen konnten zeigen, dass die KIR-Genfamilie zwischen den Primatenspezies, ebenso wie die MHC-Klasse-I-Gene (Adams und Parham, 2001) erheblich variiert (Guethlein *et al.*, 2002; Hershberger *et al.*, 2005; Hershberger *et al.*, 2001; Khakoo *et al.*, 2000; Rajalingam *et al.*, 2004). Nur das als ursprünglichstes beschriebene KIR3DL0 sowie KIR2DL4 konnten bei allen bisher untersuchten Primaten nachgewiesen werden (Sambrook *et al.*, 2006; Sambrook *et al.*, 2005). Bei Gorillas ist KIR2DL4 jedoch nur bei ca. 50 % der Individuen einer Population vorhanden und bei Orang-Utans ist die Funktionalität noch fraglich (Guethlein *et al.*, 2002; Rajalingam *et al.*, 2004).

1.4.2.1 KIR beim Rhesusaffen

Da die KIR-Genfamilie innerhalb der Primaten sehr variabel vertreten ist, unterscheiden sich der KIR-Gen-Loci des Rhesusaffen und des Menschen erheblich voneinander. Der von Sambrook und Mitarbeitern (2005) sequenzierte KIR-Haplotyp des Rhesusaffen weist nur fünf KIR-Gene auf. Der kleinste humane Haplotyp setzt sich im Vergleich dazu aus neun KIR-Genen zusammen (Shilling *et al.*, 2002). Sowohl die genomischen Daten als auch cDNA-Analysen (Hershberger *et al.*, 2001) unterstreichen die Diversität der KIR-Gene des Rhesusaffen.

Wie beim Menschen findet man beim Rhesusaffen auch KIR-Sequenzen mit langem zytoplasmatischen Anteil und darin enthaltenen ITIM. Obwohl funktionell noch nicht nachgewiesen, vermitteln sie aufgrund des enthaltenen Aminosäuremotivs vermutlich ein inhibierendes Signal an die NK-Zelle. Beim Menschen tragen die aktivierenden KIR ein Lysin in der Transmembranregion, über das das Adapterprotein DAP12 gebunden werden kann, welches ein aktivierendes Signal weiterleitet. Entsprechungen finden sich beim Rhesusaffen nicht. Stattdessen wurden Sequenzen mit einem Arginin als geladene AS in der

Transmembranregion und kurzem zytoplasmatischen Anteil nachgewiesen. Sie ähneln in der Transmembran- und der zytoplasmatischen Region der Sequenz von KIR2DL4. Jedoch führt eine 53 Nukleotide umfassende Deletion zu einer Verschiebung des Leserahmens und damit zu einer verfrühten Translationstermination, wodurch diese Moleküle keine inhibitionsvermittelnden ITIM aufweisen. Sie sind Kandidaten für aktivierende NK-Zellrezeptoren beim Rhesusaffen. Des Weiteren wurde in der genomischen Sequenz des sequenzierten Haplotyps ein KIR mit nur einer vollständigen D1-Ig-Domäne gefunden (Sambrook *et al.*, 2005). cDNA-Analysen legen zudem alternatives Spleißen der genomischen Sequenzen nahe (Hershberger *et al.*, 2001).

In Abbildungen 1.5 wurden alle bisher bekannten molekularen Strukturen der Rhesusaffen KIR den humanen gegenübergestellt.

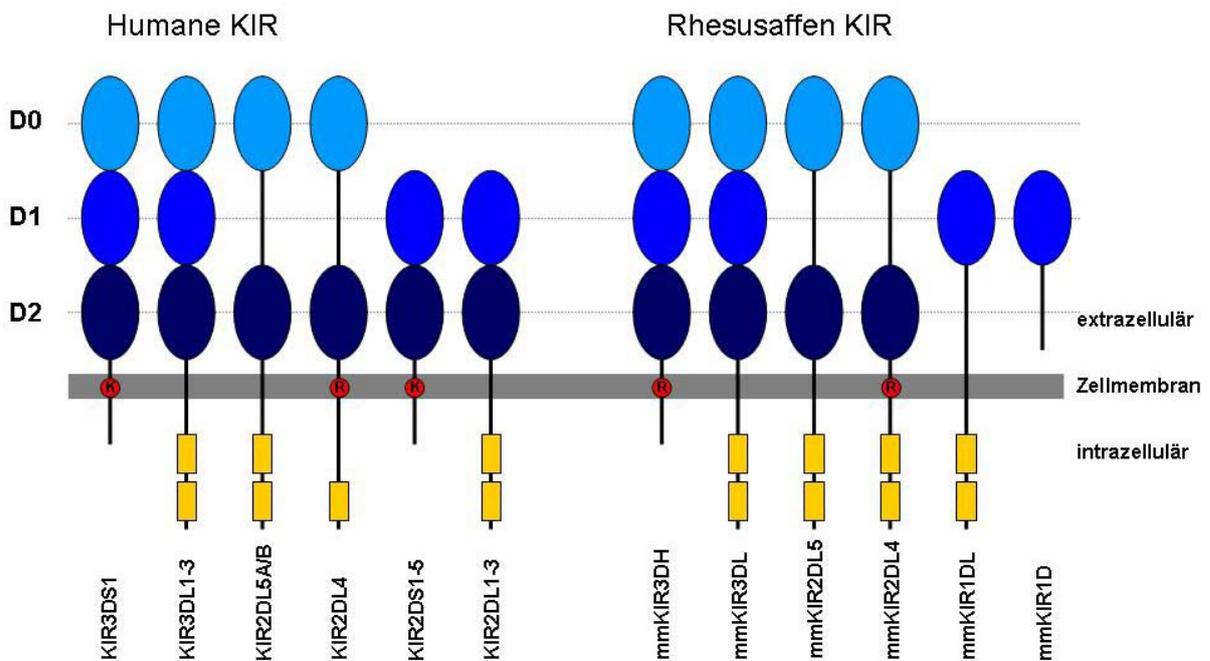


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Molekülstruktur von humanen und Rhesusaffen KIR.

Die blauen Ovale repräsentieren die Ig-Domänen (D0 - D2). Die roten Kreise stellen geladene AS in der Transmembranregion dar. R = Arginin, K = Lysin. Die gelben Boxen entsprechen den ITIM in den zytoplasmatischen Domänen. MmKIR2DL4 weist im Gegensatz zum humanen zwei ITIM auf. MmKIR3DH-Sequenzen haben drei Ig-Domänen und eine zu KIR2DL4-ähnliche TM-Region mit einem geladenen Arginin, der Transkriptionsabbruch erfolgt jedoch schon in Exon 8, wodurch mmKIR3DH keine ITIM aufweisen. Die molekulare Struktur von mmKIR1DL und mmKIR1D resultieren vermutlich aus Spleißvarianten von mmKIR3DL und mmKIR3DH (Hershberger *et al.*, 2001).

1.5 MHC-Klasse-I-Interaktion mit KIR

Beim Menschen sind die HLA-Klasse I-Moleküle die einzigen bisher identifizierten Liganden der KIR-Moleküle. Als ein Ergebnis des allelischen Polymorphismus der MHC-Klasse-I-Moleküle binden individuelle NK-Zellrezeptoren mit variierenden Affinitäten an unterschiedliche MHC-Moleküle. Einzelne KIR-Moleküle zeigen eindeutige Spezifitäten für bestimmte HLA-Klasse-I-Moleküle auf. Andere differenzieren zwischen verschiedenen Allelgruppen eines Gens und sind somit spezifisch für bestimmte Epitope (Lanier, 1998). Des Weiteren kann das gleiche MHC-Klasse-I-Allel von mehreren KIR-Molekülen erkannt werden. So sind HLA-C-Moleküle vom C1-Typ Liganden sowohl für KIR2DL2 als auch für KIR2DL3 (Winter *et al.*, 1998).

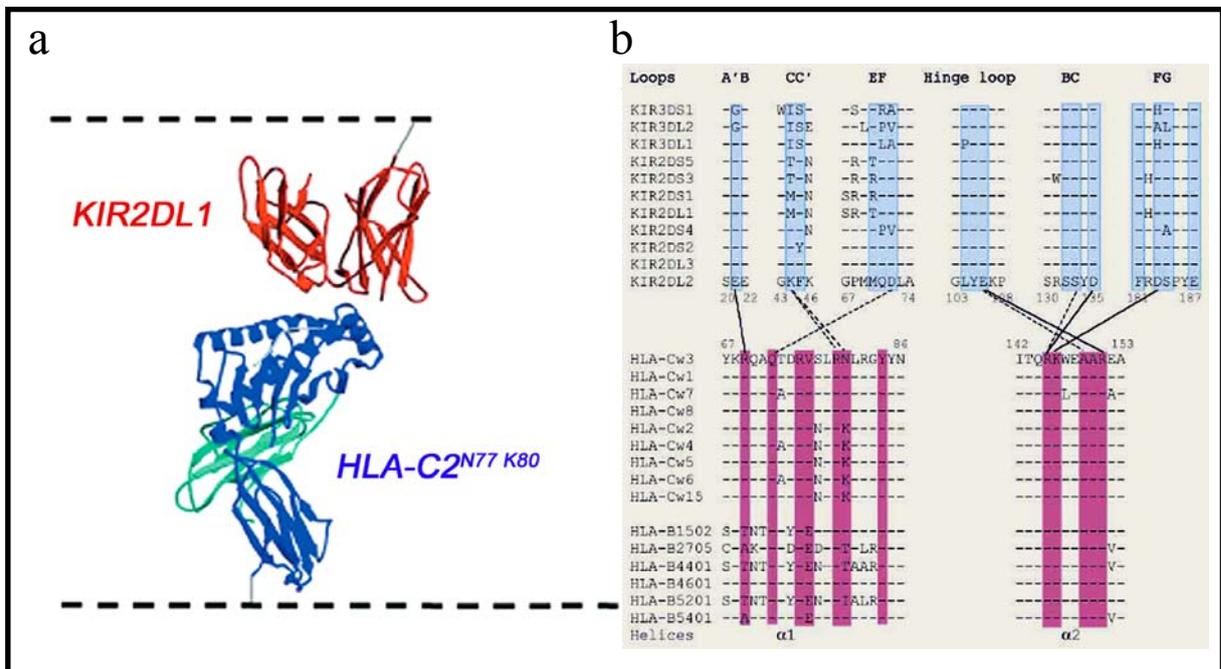


Abb. 1.5: Spezifität der HLA-KIR-Interaktion.

(a) Kristallstruktur eines KIR2DL1 - HLA-C2-Komplexes (nach Willcox *et al.*, 2003). Die gestrichelten Linien deuten die Zellmembranen der interagierenden Zellen an. KIR2DL1 ist rot, HLA-C2 blau und $\beta 2M$ grün abgebildet. (b) AS-Sequenz-Alignierungen der KIR- und HLA-Binderegionen (nach Boyington *et al.*, 2001). Aus den KIR-AS-Sequenzen sind sechs Bindungsschleifen, die an der Interaktion mit MHC-Klasse-I-Molekülen beteiligt sind, mit KIR2DL2 als Referenzsequenz dargestellt. Kontaktreste sind blau hinterlegt. Die HLA-Alignierung umfasst neben der HLA-Cw3-Referenzsequenz, weitere HLA-C- und einige HLA-B-Sequenzen. Dargestellt sind Bereiche der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne, die an der KIR-Bindung beteiligt sind. Kontaktreste sind hier pink hinterlegt. Salzbrückenbindungen zwischen KIR2DL2 und HLA-Cw3 sind als durchgezogene Linien wiedergegeben, Wasserstoffbrückenbindungen als gestrichelte Linien.

Für einige HLA-Moleküle wurden bereits spezifische Interaktionen mit KIR-Molekülen beschrieben. HLA-G-Moleküle sind Liganden für KIR2DL4 (Rajagopalan und Long, 1999) und KIR3DL1 bindet spezifisch an HLA-A- und HLA-B-Allele mit dem Bw4⁺-Epitop (Lanier,

2005). KIR2DL1 und KIR2DS1 interagieren beide mit HLA-Cw*2, 4, 5, 6 und 15 (C2-Typ). KIR2DL2 und KIR2DL3 erkennen beide die HLA-Cw*1-, 3-, 7- und 8-Allotypen (C1-Typ). Kristallstrukturen von HLA-C-KIR2DL-Bindungen veranschaulichen (Abb. 1.5), dass humane KIR2DL an die Helices der α 1- und α 2-Domänen der MHC-Moleküle binden (Boyington *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2001). Der KIR / HLA-Bindungsbereich umfasst 12 Aminosäurereste. Davon sind 11 invariant. Nur die AS an Position 80 variiert zwischen den HLA-C-Allotypen. Der HLA-C1-Typ weist ein Asparagin und der HLA-C2-Typ ein Lysin an der Position 80 auf. Sieben der 11 in allen HLA-C-Allelen konservierten Reste sind zudem auch in allen HLA-B-Allotypen konserviert (Boyington *et al.*, 2001).

1.6 *Missing self* Hypothese

Bis in die 90er Jahre des vorigen Jahrhunderts wurde weitestgehend die Meinung vertreten, dass NK-Zellen ähnlich wie T-Zellen arbeiten und Zielzellen über körperfremde Antigene auf der Zelloberfläche erkennen. Eine MHC-Abhängigkeit von NK-Zellen war nicht bekannt. Durch Ljunggren und Kärre wurde 1990 erstmals eine neue Hypothese zur Rolle von MHC-Klasse-I-Molekülen bei der Erkennung von Zielzellen durch NK-Zellen aufgestellt (Ljunggren und Kärre, 1990). Im Mittelpunkt dieser Hypothese steht die Aussage, dass die Abwesenheit oder die alternative Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen die Suszeptibilität gegenüber einem Abtöten durch NK-Zellen verändert. So konnten Kärre und Mitarbeiter schon im Jahr 1986 zeigen, dass *in vivo* NK-Zellen in der Lage sind, Tumorzellen, die ihre MHC-Klasse-I-Expression verloren haben, abzutöten (Kärre *et al.*, 1986). Gewebe, welches eine normale MHC-Klasse-I-Expression aufweist, wird von NK-Zellen verschont (Abb. 1.6).

Die Entdeckung von MHC-Klasse-I-spezifischen Rezeptoren auf NK-Zellen in den folgenden Jahren bewies, dass NK-Zellrezeptoren spezifisch für MHC-Klasse-I-Moleküle in der Lage sind, durch inhibierende Signale die NK-Zellaktivierung zu verhindern. Yokoyamas Arbeitsgruppe (Yokoyama *et al.*, 1989) beschrieb den ersten inhibitorischen NK-Zellrezeptor der Maus (Ly49). Moretta und Mitarbeiter identifizierten 1993 p58 (später in KIR2DL umbenannt), den ersten inhibitorischen humanen NK-Zellrezeptor (Moretta *et al.*, 1993). Neben inhibierenden wurden auch aktivierende Rezeptoren entdeckt. Bauer und Mitarbeiter (1999) konnten zeigen, dass Zellen abgetötet werden, die MICA (*MHC class I-chain related gene A*), einen Liganden für den aktivierenden NK-Zellrezeptor NKG2D, exprimieren. Auch

wenn eine Zielzelle keine inhibitorischen Liganden exprimiert, reagiert eine NK-Zelle nicht ohne aktivierendes Signal. Die inhibitorischen Rezeptoren können das Signal eines aktivierenden Rezeptors nur abschwächen. Die Integration der aktivierenden und inhibierenden Signale gleicht eher einer analogen Skala als einem An- und Ausmechanismus (Lanier, 2005).

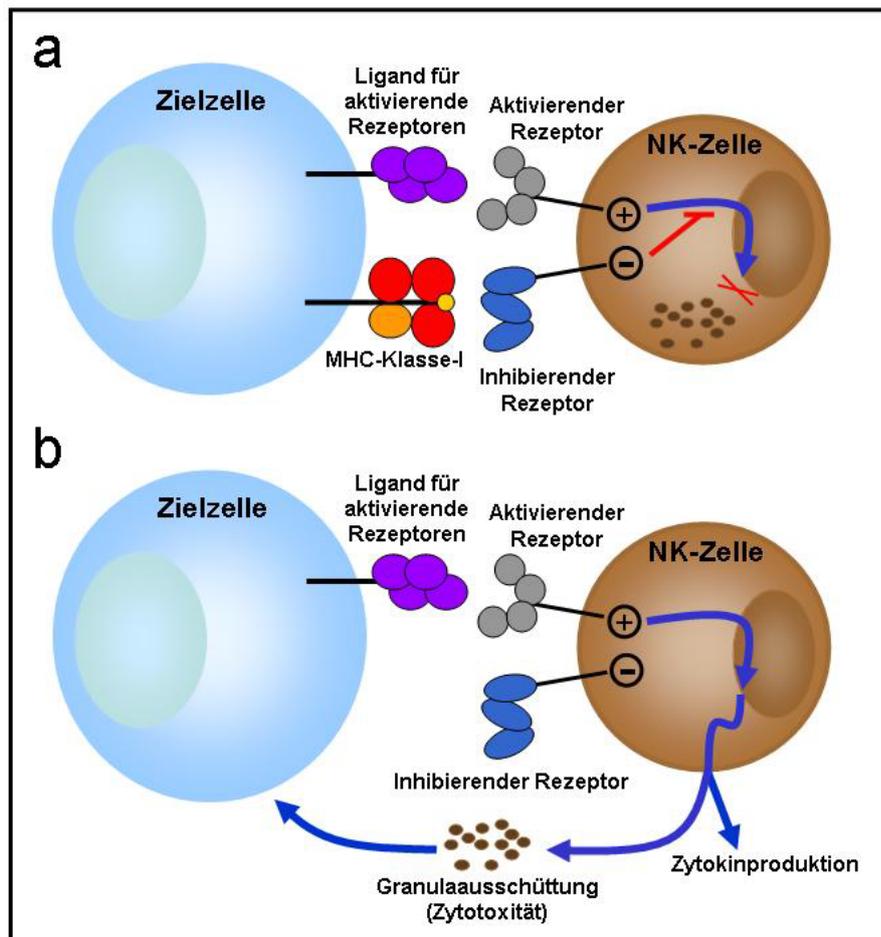


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der *missing self*-Hypothese.
 Die Aktivierung von NK-Zellen wird durch die Integration von inhibierenden und aktivierenden Signalen kontrolliert. **(a)** Inhibierende NK-Zellrezeptoren erkennen MHC-Klasse-I-Moleküle auf Zielzellen und hemmen dadurch die NK-Zellaktivierung. **(b)** Sind MHC-Klasse-I-Liganden abwesend oder herunterreguliert, werden die stimulierenden Signale nicht länger unterdrückt. Es kommt zur Zytokinproduktion und zur Granulaausschüttung, die in der Zielzellyse resultieren.

1.7 *Licensing versus Disarming*

NK-Zelltoleranz gegenüber körpereigenen Zellen ist seit gut 50 Jahren bekannt. NK-Zellen greifen gesunde Zellen nicht an und sind in der Lage, infizierte Zellen oder Tumore von normalen Zellen zu unterscheiden. Die NK-Zelltoleranz basiert auf einer Änderung der funktionellen Kapazität von individuellen NK-Zellen, abhängig von NK-Zellrezeptoren die körpereigene MHC-Liganden erkennen oder nicht erkennen.

Der Toleranz zugrunde liegende Mechanismus wird jedoch noch immer kontrovers diskutiert. Zwei unterschiedliche Hypothesen befassen sich mit diesem Phänomen:

Die eine Hypothese, postuliert von Yokoyama und Kim (2006), bezeichnet den Prozess, bei dem NK-Zellen im Normalfall ihre funktionelle Fähigkeit durch spezifische Interaktionen mit klassischen MHC-Klasse-I-Molekülen erhalten, als *licensing*. Dabei geht man davon aus, dass die Aktivierung einzelner NK-Zellen im Zusammenhang mit der Expression von Rezeptoren steht, die spezifisch für körpereigene MHC-Klasse-I-Moleküle sind (Kim *et al.*, 2005). Die Daten von Yokoyamas Arbeitsgruppe legen nahe, dass es im Normalfall zwei Gruppen von selbsttoleranten NK-Zellen geben muss. Unter stationären nicht entzündlichen Bedingungen sollte es bei jeder MHC-Ausstattung lizenzierte NK-Zellen geben, die tolerant sind, aufgrund der Expression mindestens eines inhibitorischen Rezeptors, der spezifisch für ein körpereigenes MHC-Klasse-I-Molekül ist. Daneben sollte es auch nicht-lizenzierte NK-Zellen geben, die deshalb tolerant sind, weil sie funktionell nicht kompetent sind. Daher müssen sie auch nicht von körpereigenen MHC-Molekülen inhibiert werden. Versuche mit inhibitorischen NK-Zellrezeptoren ohne zytoplasmatische Domäne deuten darauf hin, dass der *licensing*-Prozess direkt über das zytoplasmatische ITIM des inhibitorischen Rezeptors vermittelt wird. Der weitere Signalweg ist dabei noch unbekannt.

Die zweite Hypothese, aufgestellt von Raulet und Mitarbeitern (Gasser und Raulet, 2006), vertritt den Standpunkt, dass alle NK-Zellen zunächst in einem reaktiven Zustand sind. Einige werden später über aktivierende und inhibierende Stimulation „entwaffnet“ und werden so tolerant (*disarming*). Sowohl Fehlen von Interaktionen mit körpereigenen MHC-Klasse-I-Molekülen als auch die Dominanz von aktivierenden Signalen während der Entwicklung würde danach zu hyporeaktiven NK-Zellen führen.

Die beiden Hypothesen basieren auf der Idee, dass NK-Zellen für ihre volle funktionelle Effektorfunktion einer „Erziehung“ durch ihre MHC-Klasse-I-Umgebung bedürfen. Sie unterscheiden sich jedoch in dem jeweils vertretenen Prozess, der zum reaktiven bzw. hyporeaktiven NK-Zellstatus führt.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen einer immunologischen Fragestellung befasste sich die vorliegende Arbeit mit der Struktur und Funktion der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-) Klasse-I-Gene des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*). Der Rhesusaffe ist ein oft genutzter Modellorganismus für Studien von Infektionskrankheiten, der Organtransplantation und der Medikamentenentwicklung. Vergleichende Untersuchungen der immunrelevanten Systeme sind daher besonders wichtig für die Übertragbarkeit der im Rhesusaffenmodell gewonnenen Ergebnisse auf den Mensch.

Die vollständige Sequenzierung einer MHC-Region (Daza-Vamenta *et al.*, 2004; Kulski *et al.*, 2004) deckte ausgedehnte Expansionen in der MHC-Klasse-I-Region des Rhesusaffen auf. Sowohl in der MHC-Klasse-I-A- (*Mamu-A*) als auch in der MHC-Klasse-I-B-Region (*Mamu-B*) finden sich Duplikationen. Demgegenüber war ein dem humanen *MHC-C*-Gen (*HLA-C*) orthologer Gen-Locus abwesend. Die Funktion dieser Fülle an MHC-Klasse-I-Genen war bislang ungeklärt.

Um den funktionellen Eigenschaften einzelner Mamu-A- und Mamu-B-Moleküle nachzugehen, sollten stabile Transfektanten in einer MHC-Klasse-I-defizienten Zelllinie etabliert werden. In sequenziellen Untersuchungen und Analysen der subzellulären Lokalisation von MHC-Klasse-I-Molekülen sollten Hinweise auf funktionelle Unterschiede innerhalb der Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Gene gewonnen werden.

Ein zentraler Punkt der Arbeit war die Funktion der MHC-Klasse-I-Moleküle als Liganden für Rezeptoren auf NK-Zellen. Vom Menschen ist bekannt, dass MHC-Klasse-I-Moleküle spezifisch mit Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR) auf NK-Zellen interagieren und damit im Rahmen der zellulären Immunantwort großen Einfluss auf die Aktivierung bzw. Inhibition von NK-Zellen haben. In immunologischen Testverfahren mit NK-Zellen sollte gezeigt werden, ob, und wenn ja, welche Mamu-A- und Mamu-B-Moleküle mit Rezeptoren auf NK-Zellen interagieren.

Schließlich sollten in Zusammenarbeit mit Philip Kruse und Meike Hermes (FG Primatengenetik, DPZ) Interaktionen zwischen MHC-Klasse-I- und KIR-Molekülen in direkten Bindungsstudien nachgegangen werden.

UNTERSUCHTE TIERE UND MATERIALIEN

2.1 Untersuchte Tiere

Für die Experimente dieser Arbeit wurde Blut von verschiedenen Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) verwendet. Alle Tiere stammen aus Kolonien des Deutschen Primatenzentrums (DPZ). Die Blutentnahmen wurden von Dr. med. vet. Anette Schrod, Dr. med. vet. Tamara Becker oder Jessica Ladermann (Abteilung Primatenhaltung, DPZ) durchgeführt.

Rhesusaffen zählen zu den Altweltaffen (Catarrhini). Sie gehören der Gattung der Makaken an, die viele Arten und Unterarten vereint. Die 45 - 65 Zentimeter großen Tiere haben ein braun-olives Fell und werden zwischen 5 - 8 Kilogramm schwer. Ihr Lebensraum erstreckt sich von Afghanistan über Indien bis zum südlichen China und Thailand. Genetische und morphologische Daten legen jedoch eine evolutive Trennung von indischen und chinesischen Populationen nahe (Smith, 2005).

Die leichte Haltung von Rhesusaffen machte sie schon früh zu den meistgenutzten nicht humanen Primaten-Modellorganismen zur Erforschung humaner Erkrankungen und zur Medikamentenentwicklung.

Aufgrund der Unterschiede zwischen indischen und chinesischen Rhesusaffen wurden im Verlauf der Arbeit nur Tiere mit gesichertem indischen Ursprung verwendet. Für die Erstellung von cDNA aus Blut standen insgesamt 63 Tiere zur Verfügung (vergl. Tab. 10.1). Hierfür reichen wenige Milliliter Blut. Da von den meisten Tieren aber nur einmal im Jahr max. 5 ml Blut abgenommen werden, standen für immunologische Tests nur wenige Tiere, auf die immer wieder zurückgegriffen werden konnte, zur Verfügung. Für diese Tests wurden mindestens 20 ml Blut benötigt.

2.2 Humane Probanden

Zur Etablierung der Chromfreisetzungstests wurde humanes Blut verwendet. Dafür standen als freiwillige Blutspender Mitarbeiter der FG Primatengenetik zur Verfügung. Die Blutabnahme wurde von Dr. med. Ralf Dressel, Universität Göttingen, durchgeführt.

PROBANDEN-NR.	GESCHLECHT
1	Männlich
2	Weiblich
3	Männlich

2.3 Geräte

GERÄTETYP	BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Autoklav	Varioklav® 400E	H+P Labortechnik
Blotter, Semi-Dry	V20-SDB	Roth
Brutschränke Bakterien Säugetierzellen	B12 B6060	Heraeus Heraeus
Durchflusszytometer	BD LSR II	BD Biosciences
Elektrophoresekammern Agarose SDS-PAGE	Horizon 58 EPH-1010-V	Gibco BRL Bridge
Elektroporator	GENE-PULSER II	BIO-RAD
Entwicklermaschine	M35 X-OMAT Processor	KODAK
Feinwaage	BP 310 S	Sartorius
Filmentwicklungskassette		Wolf X-Ray Corp.
Flüssig-Szintillations- Counter	Wallac MicroBeta Trilux 1450-21	Wallac
Folienschweißgerät	Vacupack Plus F380	Krupps
Gel-Dokumentationsgerät	Gel Jet Imager 2000	Intas
Hamiltonspritze	Mikroliter Syringes	Hamilton
Handmonitor zur Messung von Radioaktivität	LB 122	Labororum Prof. Dr. Berthold
Heizblock	M32	GLW
Kryo-Einfrier-Container	Mister Frosty	Nalgene
Kryotank	35VHC cryogenic equipment	Union Carbide Corporation
Kühlschrank	Profi Line	Liebherr
Magnetischer Zell-Separator	MiniMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec
Magnetrührer	M32	GLW
Mikroskope	LSM 5 PASCAL Axiovert 405M CK40	Zeiss Zeiss Olympus
Mikrowelle	Micromat	AEG
Netzgeräte	Consort Elektrophoresis Power Supply Elektrophoresis Power Supply Power Pack P25	Fröbel Laborgeräte Renner Biometra
Nukleofektor	Amaxa	Amaxa AG
pH-Meter	pH 535 Multi Cal®	WTW
Photometer	Gene Quant II	Pharmacia Biotech

GERÄTETYP	BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Pipetten	Reference 10 µl Reference 100 µl Reference 1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus-Akku	Hirschmann
Schüttelinkubator	Thermomixer comfort	Eppendorf
Schüttelschwenker	Duomax 1030	Heidolph
Sequenzierer	ABI 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Thermoblöcke		Liebisch
Thermocycler	GeneAmp PCR System 2700 PTC-200 Labcycler	Applied Biosystems Bio-Rad SensoQuest
Thermomixer	Thermomixer Compact Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tiefkühlschrank (-20°C)	Premium	Liebherr
Tiefkühlschrank (-80°C)	U 725	NB Scientific
Vakuumanlage	Pumpe VP 100 SpeedVac SC 110 – 240 Kühlfalle RVT100, Savant	H. Saur
Vortexer	L46	GLW
Waagen	Typ 1574 MP 8 BP61	Sartorius
Wasserbäder	1083 Schüttelwasserbad Julabo U3 LKB Bromma 2219 Multitemp II	Über Schütt bestellt Köttermann Kranich Haake Memmert
Werkbänke	Lamin Air	Heraeus
Zentrifugen	Centrifuge 5810 R Centrifuge 5414 R Centrifuge 5415 R Multifuge 1 S – W	Eppendorf Heraeus
Zentrifugenrotoren	F 45-24-11 A-4-62 75002000	Eppendorf Heraeus

2.4 Verbrauchsmaterialien

PRODUKT	HERSTELLER / BEZUGSQUELLE
5ml, 10 ml, 25 ml Pipetten (gestopft)	Greiner
75 cm ² Zellkulturflaschen	Sarstedt
96-, 24-, 12-, 6-Well-Schalen (beschichtet)	Sarstedt
Deckgläschen	Menzel-Gläser
Elektroporationsküvetten (0,2 mm, 0,4 mm)	Biozym
FACS-Röhrchen	Greiner
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner

PRODUKT	HERSTELLER / BEZUGSQUELLE
Filter	Sartorius
Hybond-N+ Nylon Transfer Membrane	Amersham
Hyperfilm ECL	Amersham
Kryo-Mikro-Schraubröhrchen 2 ml, PP	Sarstedt
MiniMACS magnetische Separationssäulen	Miltenyi Biotec
Nitrocellulose Transfermembran	Schleicher und Schüll
Petrischalen (beschichtet)	Sarstedt
Petrischalen (unbeschichtet)	Greiner
Pipettenspitzen 100 µl (gestopft)	Sorenson
Pipettenspitzen 100 µl, 1000 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen 1000 µl (gestopft)	Sarstedt
Pipettenspitzen 2,5 µl (gestopft)	Sorenson
Pipettenspitzen 2,5 µl, 20 µl	Biozym
Objektträger	Menzel-Gläser
Quarz-Küvette	Hellma
Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Szintillationsflüssigkeit	Wallac
Whatman-Papier GB 002, GB 005	Schleicher & Schuell
Zählkammer für eukaryotische Zellen	Neubauer

2.5 Chemikalien

BEZEICHNUNG	BEZUGSQUELLE
1,4 Dithiothreitol	Merck
2-Propanol (Isopropanol)	Roth
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	Sigma
β-ME	Sigma
Agar-Agar	Roth
Agarose	Merck
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Borsäure, 5-Brom-4-Chlor-3-Inolyl-β-D-Galactosid	Roth
Brefeldin A	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
Chloroform	J.T. Baker
D19 Entwickler	Roth
Desoxycholat	Sigma
Desoxysulfat	Pharmacia
Diethylpyrocarbonat	Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid	J.T. Baker
Di-Natriumchromat	Hartmann Analytics
DMEM, <i>high</i> -Glukose, with L-Glutamine	PAA

BEZEICHNUNG	BEZUGSQUELLE
DMEM, <i>low</i> -Glukose, with L-Glutamine and Hepes	PAA
dNTP-Set, Sequencing Grade (4x 25µmol)	Amersham
Einfriermedium für Zellkulturen (<i>Recovery Cell Culture Freezing Medium</i>)	Gibco
Essigsäure	Roth
Ethanol, rein	Roth
Ethanol, vergällt	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylenediaminetetraessigsäure	Sigma
Ficoll (Bicoll-Trennlösung, Dichte 1,09 g/ml)	Biochrom AG
Fixierer Polymax	Kodak
<i>Fluorescent Mounting Medium</i>	Dako
Fötale Kälberserum, Gold	PAA
G418	PAA
Glukose	Merck
Glyzerin	Roth
Glykogen	Merck
Guanidinthiocyanat	Roth
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	Roth
Hepes	Roth
Hi-Di™ Formamid	Applied Biosystems
Ionomycin	Sigma
IPTG	Roth
Isoamylalkohol	Merck
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogencarbonat	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kanamycin	Sigma
LDS	Invitrogen
Luminol	Sigma
MACS MicroBeads (<i>goat anti-mouse</i>)	Miltenyi Biotec
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Metafectene (Transfektionsreagenz)	Biontex
Methanol	Roth
Milchpulver	Neuform
Monensin (GolgiSTOP)	BD Biosciences
Natriumacetat	Roth
Natriumazid	Serva
Natriumcitrat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natrium-Desoxycholat	Merck
Natriumdodecylsulfat	Roth
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumjodid	Roth

BEZEICHNUNG	BEZUGSQUELLE
NP40	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
PBS-Lösung (10x)	Biochrom AG
p-Curmarsäure	Fluka
Penicillin / Streptomycin (10.000 Units / ml Pen., 10 mg / ml Strep.)	PAA
Phenol	Roth
Phenolrot	Sigma
PMA	Sigma
Polyacrylamidstammlösung 33 %	Roth
Pronase E	Roth
Protein-A, Biotin-gekoppelt	Pierce Biotechnology
RPMI, <i>high</i> -Glukose, with L-Glutamine	PAA
Saccharose	Merck
Salzsäure, rauchend 37%	Roth
Silica	Sigma
Streptavidin-PE-Cy5.5	BD Biosciences
Sucrose	Merck
TEMED	Fluka
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Triton X-100	Sigma
Trypanblau	Sigma
Trypton / Pepton	Roth
Tween 20	Roth
Unifix Fixierer Emulsion	Kodak
Wasser (HPLC-gereinigt)	Merck
Wasserstoffperoxid	Merck
X-Gal	Roth

2.6 Puffer und Lösungen

BEZEICHNUNG	ZUSAMMENSETZUNG
Blockierungslösung (5 %)	5 % Milchpulver 0,05 % Tween20 ⇒ in 1 x TBS ansetzen, filtrieren
DEPC-Lösung	0,1 % DEPC (97 %) in HPLC-H ₂ O ansetzen
ECL-Lösung	Lösung 1 und 2 wurden für jeden Versuch frisch angesetzt und 1:1 gemischt.
Lösung 1	100 µl Luminol (250 mM in DMSO) 44 µl p-Curmarsäure (90 mM in DMSO) 1 ml 1 M Tris / HCl pH 8,5 8,8 ml dest.H ₂ O
Lösung 2	6 µl H ₂ O ₂ (30%) 1 ml 1 M Tris / HCl pH 8,5 9 ml dest. H ₂ O

BEZEICHNUNG	ZUSAMMENSETZUNG
Elektrophoresepuffer (5 x)	15,1 g Tris 94 g Glycine 50 ml 10 % SDS ⇒ ad. 1 l mit Millipore- H ₂ O
Erythrozytenlyse-Puffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA ⇒ in Millipore-H ₂ O ansetzen
Fixierlösung (Paraformaldehyd)	1 x PBS auf ca. 60 °C erhitzen + 1 % Paraformaldehyd ⇒ einige Tropfen 10 NaOH zugeben, bis Lösung klar wird ⇒ pH auf 7.2 mit HCl einstellen ⇒ steril filtrieren ⇒ bei 4° C lagern
Lämmlipuffer (2 x)	1,51 g Tris 4 g SDS 5 g Saccharose ⇒ ad. 80 ml mit Millipore H ₂ O ⇒ pH auf 6,8 mit HCl einstellen 30 mg Bromphenolblau ⇒ ad. 100 ml mit Millipore H ₂ O ⇒ filtrieren
Lösung D	94,5 g GTC 5 ml 1 M NaCitrat ⇒ ad. 200 ml DEPC-H ₂ O ⇒ vor Gebrauch je 360 µl βME / 50 ml zugeben
Lösung für die Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen	
6 M Natriumjodid	224,84 g NaJ ⇒ ad. 250 ml mit Millipore H ₂ O ⇒ bei 4 °C dunkel lagern
Silica-Milch (100 mg / ml)	5 g Silica 10 ml 1 x PBS ⇒ 2 x mischen, 2 h stehen lassen, Überstand abnehmen ⇒ bei 2000 x g 2 min zentrifugieren und restlichen Überstand abnehmen ⇒ 50 ml 3 M NaJ zugeben, resuspendieren und aliquotieren
MACS-Puffer	0,5 % BSA 2 mM EDTA (pH 8) in 1 x PBS ⇒ vor Gebrauch entgasen

BEZEICHNUNG	ZUSAMMENSETZUNG
Medien	
LB-Medium	pro Liter dest. H ₂ O: 10 g Trypton / Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ⇒ mit NaOH auf pH 7,5 einstellen ⇒ für Agarplatten: 1,5 % Agar-Agar ⇒ autoklavieren ⇒ je nach Antibiotikaresistenz 1:1000 50 µg / ml Ampicillin 1:500 100 µg / ml Kanamycin 1:1000 50 µg / ml Streptomycin
SOC-Medium	pro Liter dest. H ₂ O: 20 g Trypton / Pepton 5 g Hefeextrakt 2 ml 5 M NaCl 1 ml 2,5 M KCl 10 ml 1 M MgCl ₂ 2,464 g MgSO ₄ 3,604 g Glukose ⇒ autoklavieren
Zellkultur-Medien	
DMEM-h	90 % DMEM, <i>high</i> -Glukose 10 % hitzeinaktiviertes FKS (45 min bei 56 °C) 1 % Penicillin / Streptomycin-Lösung (Penicillin 100 U / ml, Streptomycin 0,1 mg / ml)
DMEM-l (Hepes-gepuffert)	90 % DMEM, <i>low</i> -Glukose (mit L-Glutamine und Hepes) 10 % hitzeinaktiviertes FKS (45 min bei 56 °C) 1 % Penicillin / Streptomycin-Lösung (Penicillin 100 U / ml Streptomycin 0,1 mg / ml)
RPMI-h	90 % RPMI, <i>high</i> -Glukose 10 % hitzeinaktiviertes FKS (45 min bei 56 °C) 1 % Penicillin / Streptomycin-Lösung (Penicillin 100 U / ml, Streptomycin 0,1 mg / ml)
Puffer für <i>hot-start</i>-PCRs	
5 x KMT-Puffer	2,5 ml 1 M Tris 60 µl 1 M HCl 5 ml 2,5 M KCl 500 µl 1 M MgCl ₂ ⇒ ad. 50 ml mit H ₂ O (pH 8,4) ⇒ steril filtrieren

BEZEICHNUNG	ZUSAMMENSETZUNG
BSA / Triton-Puffer	5 ml BSA-Stocklösung (100 mg / ml) 350 mg Triton X ⇒ ad. 50 ml mit DNase- und RNase-freiem H ₂ O ⇒ steril filtrieren
Puffer für Mini-Plasmid-DNA-Präparation	
Resuspensionspuffer P1	50 mM Tris pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 ⇒ vor Gebrauch 100 µg / ml RNase A hinzufügen
Lysepuffer P2	2a: 400 mM NaOH 2b: 2 % SDS ⇒ vor Gebrauch: Puffer 2a und 2b 1:1 mischen
Neutralisierungspuffer P3	3 M KAc pH 4,8
Puffer für SDS-PAGEs	
Tris / SDS pH 6,8 (4x)	6,05 g Tris 4 g SDS ⇒ ad. 90 ml mit bidest. H ₂ O auffüllen ⇒ pH mit HCl auf 6,8 einstellen ⇒ ad. 100 ml mit bidest. H ₂ O auffüllen
Tris / SDS pH 8,8 (4x)	45,5 g Tris 1 g SDS ⇒ ad. 200 ml mit bidest. H ₂ O auffüllen ⇒ pH mit HCl auf 8,8 einstellen ⇒ ad. 250 ml mit bidest. H ₂ O auffüllen
RIPA-Puffer	50 mM Tris, pH 8,0 150 mM NaCl 1 % NP 40 0,5 % Na-Desoxycholat 0,1 % SDS
Saponin-Lösung	0,025 % Saponin in 1 x PBS lösen
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM EDTA ⇒ in Millipore-H ₂ O ansetzen
SDS-Trenngele (10 %)	33,3 % PAA 5 ml H ₂ O, 18 ml Tris / SDS pH 8,8 (4x) 3,75 ml 10 % APS 50 µl TEMED 20 µl ⇒ Mindestens 2 h aushärten lassen
SDS-Sammelgele (4 %)	33,3 % PAA 0,8 ml H ₂ O 2,13 ml Tris / SDS pH 8,8 (4x) 1 ml 10 % APS 50 µl TEMED 20 µl ⇒ Mindestens 2 h aushärten lassen

BEZEICHNUNG	ZUSAMMENSETZUNG
Succrose-Ladepuffer für Agarosegele (10 x)	66 % Succrose ⇒ dest. H ₂ O ansetzen + einige Tropfen Bromphenolblau
TBE (10 x)	108 g Tris 55 g Borsäure 7,44 g EDTA ⇒ auf 1 l H ₂ O auffüllen
TBS (1 x)	8,5 g NaCl ⇒ ad. 900 ml mit bidest. H ₂ O + 20 ml 1M TrisHCl pH 7,2 ⇒ pH auf 7,2 mit HCl einstellen ⇒ ad. 1 l mit dest. H ₂ O
TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA ⇒ ad. 1 l mit Millipore-H ₂ O
Transfektionspuffer 1b (für Amaxa-Elektroporationen)	5 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 100 mM Na ₂ HPO ₄ 100 mM NaH ₂ PO ₄
Transferpuffer (pH 8,3; für <i>Semidry-Blots</i>)	3 g Trisbase 11,3 g Glycine 100 ml Methanol ⇒ ad. 1 l mit dest. H ₂ O

2.8 Enzyme

BEZEICHNUNG	BEZUGSQUELLE
AflII	New England BioLabs
BamHI	New England BioLabs
DNaseI	Biozym (Epicentre)
EcoRI	New England BioLabs
HindIII	New England BioLabs
KpnI	New England BioLabs
M-MuLVReverse Transkriptase (200 U / µl)	Promega
RNase-Inhibitor (RNasin, 40 U / µl)	Promega
Shrimps Alkine Phosphatase (SAP)	Amersham Biosciences
SmaI	New England BioLabs
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs
XhoI	New England BioLabs

2.9 Kits

BEZEICHNUNG	BEZUGSQUELLE
BigDye Terminator [®] v1.1 CycleSequencing Kit	Applied Biosystems
pGEM-TEasy Cloning kit	Promega
QIAquick [®] Plasmid Midi / Maxi Kit	Qiagen

2.10 Klonierungsvektoren

BEZEICHNUNG	BEZUGSQUELLE
pAcGFP-N1	BD Biosciences (Clontech)
pUC-19	Fermentas
pGEM-TEasy	Promega

2.11 Bakterienstämme

- *Escherichia coli* Top 10 (Invitrogen);
Angaben über den Genotyp dieses Stammes können von der Internetseite der Firma
Invitrogen bezogen werden (www.invitrogen.com).

2.12 Säugetierzellen

Die hier verwendeten Zelllinien entstammen der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ).

K562 Die Erythroleukämie-Zelllinie entstammt ursprünglich einem Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie. Die Zellen wurden in DMEM mit *high*-Glukose, 10 % FKS, 1000 U / ml Penicillin und 1 mg / ml Streptomycin gehalten und alle zwei bis drei Tage 1:3 geteilt.

HEK-293 Diese Adenovirus 5-immortalisierte Zelllinie entstammt humanen embryonalen Nierenzellen (Hay, 1994). Die Zellen wurden in DMEM mit *high*-Glukose, 10 % FKS, 1000 U /ml Penicillin und 1 mg / ml Streptomycin gehalten und alle zwei bis drei Tage 1:4 geteilt.

2.13 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech GmbH aus Ebersberg oder der Firma Metabion aus Martinsried synthetisiert. Oligo(dT)-Primer wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Tab. 2.1: Liste aller im Rahmen der Arbeit verwendeten Oligonukleotide mit Bezeichnung, Sequenz und Annealingtemperatur (A.-Temp.). DNA-Basencode: A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, W = A / T, Y = C / T.

NAME	SEQUENZ (5' - 3')	A.-TEMP.
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer		
pGEMF	GTTTTCCCAGTCACGAC	52
pGEMR	GGATAACAATTTACACAGG	54
MYCF1	ACACCATGGGAGCTGGTAAT	58
MYCR1	CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT	59
MYCF2	GTTCTTTGAAAACCTGAAT	45
MYCR2	GCATCCACCAWAWACTCT	51
pAcGFPf	CAAATGGGCGGTAGGCGTG	62
pAcGFPPr	GTGGCCATTCACATCGCCAT	60
MAS-EcoRI-F	GCTCGAATTCATGGCGCCCCGAACCCTCC	66
MAS-BamHI-R	GATAAGGATCCTCCACTTTACAAGCCATAAGAGA	60
MBS-HindIII-F	GCTCAAGCTTCGGTCATGCGGGTCATGGCGCCCC	69
MBS-KpnI-R	CGTAGGTACCTTAGCCGTGAGAGACACATCA	60
MIS-HindIII-F	GCTCAAGCTTCGGTCATGCGGGTCATGGCGCCCCG	69
MIS-KpnI-R	CGTAGGTACCCAAGCTGTGAGAGACACATCAG	64
MES-EcoRI-F	GCTCGAATTCGCGTCATGGCACTAGGAA	56
MES-BamHI-R	GATAAGGATCCGGTTTATAAGCTGTGAGAGA	54
MASF	TCATGGCGCCCCGAACCC	63
MASR	CACACAAGGCGGCTGTCTCA	63
MBSF	TCATGGAGCCCCGAACCT	64
MBSR	CCACACAAGACAGTTGTCTCA	60
A*01F	GACCGGGAGACACGGAACAT	63
A*01R	CTCTCATCCTCTCCGCCACAT	63
A*08F	GGTCCCACACCTACCAGAC	62
A*08R	GTTCTGAACCGCTCCGCCCT	62
A*11F	GGGGAGCCCCGCTTCTTCA	64
A*11R	CTCGCCCTCCAGGTAGGT	61
A*1303F	GCGAGTGCGTGAGTGGCTCCCT	64

NAME	SEQUENZ (5' - 3')	A.-TEMP.
A*1303R	GACTGGGAAGACGGCTCCCATCTCAA	63
A*1403F	GGCCCTGACCCAGACCTGGGC	64
A*1403R	CGTAGGCGAACTGTTTCATACCCGCGTT	63
Mamu-A2F	AACCTGCGGACCCTGCTCC	64
Mamu-A2R	GCTCTCCACTGCTCCGCCA	64
HLA-C GFPF	CATAAGCTTCGAGATGCGGGTCATGGCGC	64
HLA-C GFPR	GTAGGTACCTGGGCTTTACAAGCGATGAGAGACT	63

2.14 Antikörper

NAME	HERSTELLER	EIGENSCHAFTEN	ANWENDUNGS- BEREICH
W6/32 (HL)	A. Ziegler, Berlin	Monoklonaler anti-HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G in Komplex mit β 2M	FACS
HC-10	A. Ziegler, Berlin	Monoklonaler anti-HLA-B, -C, erkennt Epitop P ₅₇ XXW ₆₀ D ₆₁ R ₆₂ in der schwere Kette	WB
HC-A2	A. Ziegler, Berlin	Monoklonaler anti-HLA-A, -E, -G, sowie einige -C und -B73; erkennt Epitop xL ₇₈ xT ₈₀ L ₈₁ R ₈₂ G ₈₃ x in der schweren Kette	WB
goat-anti-mouse IgG	SantaCruz	Polyklonaler sekundärer, Meerrettich-Peroxidase gekoppelter IgG-AK	WB
rabbit anti-mouse immunoglobulins/ RPE-Cy5	Dako	Polyclonal sekundärer RPE-Cy5-markierter AK	FACS
goat anti-mouse immunoglobulins/ RPE-Cy5	SantaCruz	Polyclonal sekundärer RPE-Cy5-markierter AK	FACS
BD Living Colors A. v. Monoclonal Antibody (JL-8)	BD Biosciences	Monoklonaler GFP-AK, erkennt natives und denaturiertes GFP	WB, IP und IC
CD107a-PE (Klon H4A3)	BD Biosciences	Monoklonaler CD107a-AK, erkennt schweres glykosyliertes LAMP-1-Protein (<i>lysosome-associated membrane protein-1</i>); direkt PE-gekoppelt	FACS

NAME	HERSTELLER	EIGENSCHAFTEN	ANWENDUNGS- BEREICH
CD3-FITC (Klon MEM-57)	Exbio	Monoklonaler CD3-AK, erkennt $\epsilon\gamma$ - und $\epsilon\delta$ -Dimere des CD3-Komplexes des TCR auf peripheren Blut-T-Zellen und reifen Thymozyten; direkt FITC-gekoppelt	FACS
CD16-TC (Klon 3G8)	Caltag	Monoklonaler CD16-AK, erkennt CD16-Rezeptor auf peripheren Blut-Lymphozyten; direkt TC-gekoppelt	FACS
IgG-FITC (Isotypkontrolle)	Caltag	Monoklonaler IgG1 (der Maus)-AK, erkennt unspezifisch an menschliche Zellen gebundene monoklonale Maus-AK; direkt FITC-gekoppelt	FACS

2.15 Längenstandards

Nukleinsäure-Marker

Fermentas: GeneRuler TM 100 bp DNA Ladder Plus

Fermentas: Lambda DNA / EcoRI + HindIII-Marker, 3

Protein-Marker

Promega: PageRuler Prestained Protein Ladder

2.16 Computerprogramme und Datenbanken

2.16.1 Computerprogramme

Folgende Computerprogramme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

- Textverarbeitung: *Word 2003* (Microsoft)
- Auswertung von Chromfreisetzungstests: *Exel 2003* (Microsoft)

-
- Bildbearbeitung: *Photoshop CS* (Adobe) und *CoralDRAW 12* (Microsoft)
 - Literaturverwaltung (Erstellung des Literaturverzeichnisses): *EndNote X* (Niles Software Inc.)
 - Sequenzierung: *Sequence Analysis* (Applied Biosystems)
 - Sequenzauswertung: *Bioedit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3* (Hall, 1999)
 - Sequenzvergleich: *ClustalX 1.81* (Thompson *et al.*, 1997)
 - Genbaumerstellung: *Mega 3.1* (Kumar *et al.*, 2004)
 - Messung am Durchflusszytometer: *BD FACSDiva Software* (BD Biosciences)
 - Auswertung von FACS-Analysen: *FlowJo 5.7.1* (Tree Star Inc.)

2.16.2 Datenbanken

Auf folgende Datenbanken wurde im Rahmen dieser Arbeit zugegriffen:

- Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>):
 - o Analyse von DNA- und Protein-Sequenzen mit der Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blahcgi>)
 - o Vergleich von zwei DNA-Sequenzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html/>)
- Übersetzung von DNA-Sequenzen in AS-Sequenzen (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>)
- Berechnung des Molekulargewichts von Proteinen (http://bioinformatics.org/sms/prot_mw.html)
- Konvertierung von DNA-Sequenzen in ihre reverse, komplementäre Sequenz (http://bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)
- Finden und Prüfen von Restriktionsstellen in DNA-Sequenzen (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>)
- Überprüfung von Oligonukleotid-Eigenschaften (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc.html>)

METHODEN

3.1 Molekulargenetische Methoden

3.1.1 Isolation von Nukleinsäuren

3.1.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Plasmid-DNA-Präparationen aus kleinen Mengen Bakterienkultur wurden mit selbst hergestellten Lösungen durchgeführt. Dazu wurden 3 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum sowie einer frischen Kolonie oder 10 - 100 µl einer Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 240 rpm inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Zentrifugation der Kulturen bei 16000 x g für 20 s. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Puffer P1 gelöst (150 µl / ml Bakterienkultur). Anschließend wurde frisch angesetzter Puffer P2 in gleichem Volumen zugegeben und mehrmals invertiert. Nach maximal fünfminütiger Inkubation bei RT wurde gleiches Volumen Puffer P3 zugegeben und mehrmals invertiert. Anschließend wurde 10 min bei 16000 x g und RT zentrifugiert. Das weißliche proteinhaltige Pellet wurde verworfen und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch eine weitere Zentrifugation wurde der Überstand nochmals gereinigt und wieder in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit einem Volumen Isopropanol bei RT gefällt. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 16000 x g und RT bildete sich ein nukleinsäurehaltiges Pellet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol durch fünfminütige Zentrifugation bei 16000 x g und RT gewaschen. Anschließend wurde der Alkohol dekantiert und das Pellet bei RT getrocknet. Je nach Ausgangsmenge an Bakterienkultur wurde das Pellet in 20 - 50 µl HPLC-H₂O gelöst. Die Konzentration wurde auf einem 1 %igem Agarosegel überprüft (s. Kap. 3.1.2.1).

3.1.1.2 Midi- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden Midi- bzw. Maxi-Kits der Firma Qiagen verwendet. Dazu wurden 100 ml (Midi) bzw. 500 ml (Maxi) Bakterienkultur in Selektionsmedium nach Angaben des Herstellers aufbereitet. Die gewonnene DNA wurde in

HPLC-H₂O gelöst und die Konzentration auf einem 1 %igem Agarosegel überprüft (s. Kap. 3.1.2.1).

3.1.1.3 DNA-Isolation aus Blut

Blutproben mit einem Volumen von 5 - 10 ml wurden im Vorfeld einer Erythrozytenlyse unterzogen (s. Kap. 3.1.15). Jedes Pellet wurde in 5 ml SE-Puffer, 250 µl 20 % SDS und 20 µl Pronase E gelöst und über Nacht bei 37 °C und 140 rpm geschüttelt. Am darauffolgenden Tag wurden 2 ml 5 M NaCl zugegeben und geschwenkt. Der Ansatz wurde 10 min bei 1300 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Gaze in ein neues Reaktionsgefäß geschüttet und mit 2 - 2,5 Vol 99 % Ethanol geschwenkt. Die DNA fiel als fädige Struktur aus. Der 99 %ige Ethanol wurde vorsichtig entfernt und die DNA mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde anschließend mit einer Pipettenspitze herausgezogen und in einem frischen Reaktionsgefäß getrocknet. Je nach Ausgangsmenge wurde die DNA in 20 - 100 µl TE-Puffer gelöst.

3.1.1.4 RNA- Isolation aus Blut und Zellen

RNA wurde stets als Gesamt-RNA, bestehend aus ribosomaler- (rRNA), transfer- (tRNA) und messenger RNA (mRNA), isoliert. Die erwünschte mRNA macht dabei nur ca. 2 % der Gesamt-RNA aus. Dennoch reicht dieser geringe Anteil für weitere Verwendungen, wie z. B. eine reverse Transkription, aus.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Zellen aus Blutaufreinigungen verwendet (s. Kap. 3.1.15). Das Pellet wurde einmal mit 1 x PBS gewaschen und in 4 ml Lösung D mit β-ME gelöst. Jedem Ansatz wurden 400 µl 2 M Natriumacetat, 4 ml Phenol und 800 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, der Ansatz 10 s gevortext und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 20 min bei 9000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wurde zu je 660 µl in Reaktionsgefäße aliquotiert und mit einem Volumen Isopropanol gemischt. Nach einer Stunde Inkubation bei -20 °C wurde 30 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 800 µl 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde noch einmal fünf Minuten bei 16000 x g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet, in 20 µl DEPC-H₂O je Reaktionsgefäß

bei 55 °C für 10 min gelöst und alle Ansätze eines Ursprungs vereint. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

3.1.2 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

3.1.2.1 Bestimmung der Desoxyribonukleinsäurekonzentration

Die DNA-Konzentration wurde auf einem 1 %igen Agarosegel mittels UV-Licht empirisch geschätzt. Dazu wurde ein geeignetes Volumen (i. d. R. 0,5 - 5 µl) einer DNA-Lösung neben 50 ng, 100 ng und 200 ng eines pUC-Vektors als DNA-Standard aufgetragen und bei 100 - 120 V ca. 1 cm aufgetrennt.

3.1.2.2 Bestimmung der Ribonukleinsäurekonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Je nach Ausbeute wurden 1:50 oder 1:100 Verdünnungen in Wasser verwendet und im Photometer gegen DEPC-H₂O als Referenz gemessen.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach der Gleichung:

Extinktion (OD_{260}) 1 = 40 µg ssRNA / ml

$c(\text{ssRNA}) = OD_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40 \text{ µg ssRNA / ml}$

3.1.3 Reverse Transkription

Um RNA-Proben der Methode der PCR zugänglich zu machen, musste diese in cDNA umgeschrieben werden. Dabei wurde die Reverse Transkriptase M-MLV-RT von Promega verwendet. 1 - 2,5 µg RNA wurden zusammen mit 0,5 µg Oligo(dT)-Primer mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 15 µl gebracht und fünf Minuten bei 70 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen. Auf Eis wurden 5 µl M-MLV-5 x Puffer, 0,5 µl dNTP-Mix, 0,7 µl RNase-Inhibitor und 1 µl M-MLV-RT zugeben und mit DEPC-H₂O auf 25 µl aufgefüllt. Die reverse Transkription lief eine Stunde bei 42 °C. Anschließend wurde

der Ansatz bei 70 °C 15 min hitzeinaktiviert. Je PCR wurden je nach Ausbeute 0,2 - 2 µl cDNA pro Ansatz eingesetzt.

3.1.4 Agarosegele

Durch die elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel wurden PCR-Produkte und Restriktionsverdau kontrolliert oder aufgereinigt, sowie deren Größe bestimmt. Dazu wurden 1 %ige Agarosegele in 1 x TBE-Puffer mit 0,5 µg / ml Ethidiumbromid verwendet. Ethidiumbromid ist ein interkalierender Farbstoff, der an doppelsträngiger DNA bindet und durch Anregung mit UV-Licht im roten Spektralbereich leuchtet. Zum Beladen des Gels wurde der DNA-Lösung 10 x-Sucrose-Ladepuffer zugesetzt.

Die auf das Gel aufgetragene DNA wurde durch das Anlegen einer Spannung zwischen 60 und 120 V nach Fragmentgrößen aufgetrennt. Das entstandene Bandenmuster wurde unter UV-Licht (312 nm) visualisiert und auf Thermopapier photographisch festgehalten.

3.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Prinzipiell wurden PCR-Ansätze nach dem *hot-start*-Verfahren durchgeführt. Dabei waren *template* und Polymerase zunächst durch eine Wachsschicht von Oligonukleotiden (Primern) und dNTPs getrennt. Erst nach Erreichen der Denaturierungstemperatur und dem Schmelzen der Wachsschicht konnten sich die Primer an die Nukleinsäure anlagern (Annealing) und die Polymerase mit der Amplifikation beginnen (Elongation). Dadurch wurde die Spezifität der Primerbindung erhöht und gewährleistet, dass die Polymerase erst bei optimaler Temperatur mit der Amplifikation begann, wodurch Fehler und unspezifische Amplifikationen weitgehend vermieden wurden.

PCR-Ansätze wurden wie folgt angesetzt:

Ansatz1:	2 µl	5 x KMT-Puffer
	1 µl	Primer 1 (10 pmol / µl)
	1 µl	Primer 2 (10 pmol / µl)
	0,15 µl	dNTPs (25 pmol / µl)
	ad. 10 µl	HPLC-H ₂ O

Ansatz 1 wurde mit einem Wachskügelchen überschichtet und auf 74 °C erhitzt, bis das Wachs geschmolzen war. Nach Erkalten des Wachses wurde Ansatz 2 dazugeben.

Ansatz 2:	4 µl	5 x KMT-Puffer
	4 µl	BSA (10 mg / ml) / Tx (7 mg / ml)
	0,5 µl	Taq-DNA-Polymerase
	ad. 20 µl	DNA-Lösung / HPLC-H ₂ O

Die DNA wurde zuletzt dem Ansatz beigefügt.

PCR-Programme:

1: Mamu-A, -B, -E, -I und HLA-C	Temperatur	Haltedauer	Zyklusanzahl
Vordenaturierung	94°C	4 min	1
Denaturierung	94°C	1 min	30
Annealing	60°C	1 min	
Elongation	72°C	1,5 min	
Endelongation	72°C	5 min	1
Kühlung	8°C	∞	1

2: Mamu-A (Typisierung)	Temperatur	Haltedauer	Zyklusanzahl
Vordenaturierung	94°C	4 min	1
Denaturierung	94°C	1 min	5
Annealing	56°C	1 min	
Elongation	72°C	1,5 min	
Denaturierung	94°C	1 min	12
Annealing	56°C + 0,5°C/Zyklus	1 min	
Elongation	72°C	1,5 min	
Denaturierung	94°C	1 min	13
Annealing	62°C	1 min	
Elongation	72°C	1,5 min	
Endelongation	72°C	5 min	1
Kühlung	8°C	∞	1

3: Mamu-A *01 (Typisierung)	Temperatur	Haltedauer	Zyklusanzahl
Vordenaturierung	94°C	4 min	1
Denaturierung	94°C	45 s	5
Annealing	56°C	45 s	
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	94°C	45 s	12
Annealing	56°C + 0,5°C/Zyklus	45 s	
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	94°C	45 s	13
Annealing	62°C	45 s	
Elongation	72°C	1 min	
Endelongation	72°C	5 min	1
Kühlung	8°C	∞	1

4: Mamu-A *08 (Typisierung)	Temperatur	Haltedauer	Zyklusanzahl
Vordenaturierung	94°C	4 min	1
Denaturierung	94°C	45 s	30
Annealing	62°C	45 s	
Elongation	72°C	1 min	
Endelongation	72°C	5 min	1
Kühlung	8°C	∞	1

5: Mamu-A *11 (Typisierung)	Temperatur	Haltedauer	Zyklusanzahl
Vordenaturierung	94°C	4 min	1
Denaturierung	94°C	45 s	4
Annealing	60°C + 0,5°C/Zyklus	45 s	
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	94°C	45 s	26
Annealing	62°C	45 s	
Elongation	72°C	1 min	
Endelongation	72°C	5 min	1
Kühlung	8°C	∞	1

6: Mamu-A*1303 / A*1403 (Typisierung)	Temperatur	Haltedauer	Zyklusanzahl
Vordenaturierung	94°C	4 min	1
Denaturierung	94°C	45 s	5
Annealing	56°C	45 s	
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	94°C	45 s	12
Annealing	56°C + 0,5°C/Zyklus	45 s	
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	94°C	45 s	13
Annealing	62°C	45 s	
Elongation	72°C	1 min	
Endelongation	72°C	5 min	1
Kühlung	8°C	∞	1

7: Mamu-A2 (Typisierung)	Temperatur	Haltedauer	Zyklusanzahl
Vordenaturierung	94°C	4 min	1
Denaturierung	94°C	45 s	5
Annealing	62°C	45 s	
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	94°C	45 s	25
Annealing	64°C	45 s	
Elongation	72°C	1 min	
Endelongation	72°C	5 min	1
Kühlung	8°C	∞	1

3.1.6 Sequenzierung von doppelsträngiger DNA

Die Methode der DNA-Sequenzierung beruht auf der Synthese eines neuen DNA-Stranges, die an einem spezifischen Primer beginnt und durch den Einbau eines 2',3'-Dideoxy-analogons (ddNTP) von Nukleotidtriphosphaten endet, sodass ein „Kettenabbruch“ entsteht (Sanger *et al.*, 1977). Der dazu verwendete PCR-Ansatz enthält neben den dNTP auch ddNTP mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbmarkierungen. Wird ein solches ddNTP eingebaut, bricht die Kettenverlängerung ab, da dem ddNTP die 3'-Hydroxyl-Gruppe fehlt, um eine Phosphodiesterbindung einzugehen (Kettenabbruch). Dadurch entsteht ein Gemisch aus

DNA-Molekülen von unterschiedlicher Länge, die je nach eingebautem ddNTP die jeweilige Farbmarkierung tragen.

PCR-Produkte wurden zur Sequenzierung über ein Agarosegel aufgereinigt (s. Kap. 3.1.8). Standardmäßig wurden 25 - 50 ng aufgereinigter PCR-Produkte und 200 - 300 ng Plasmid-DNA in eine Sequenz-PCR eingesetzt. In einem Endvolumen von 10 µl wurden neben der zu sequenzierenden DNA 3,33 pmol eines geeigneten Primers, 1 µl BigDye und 1,5 µl 5 x Sequenzierungspuffer eingesetzt (BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, ABI).

Der Ansatz wurde nach folgendem Programm in einem Thermocycler inkubiert:

Sequenz-PCR	Temperatur	Haltedauer	Zyklusanzahl
Denaturierung	96°C	30 s	25
Annealing	50°C	15 s	
Elongation	60°C	4 min	
Kühlung	8°C	∞	1

Anschließend wurde der Sequenzreaktionsansatz mit 90 µl HPLC-H₂O, 250 µl 99 %igem Ethanol und 10 µl 3 M NaAc gefällt und bei 16000 x g für 15 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 250 µl 70 %igem Ethanol fünf Minuten bei 16000 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und das Pellet in einer SpeedVac für fünf Minuten getrocknet.

Zu dem getrockneten Pellet wurden 8 µl Hi-DiTM Formamid gegeben und der Ansatz in eine 96-Well-Platte überführt. Die Sequenzierung erfolgte in einem ABI 3100-Avant Kapillarsequenzierer mit vier Kapillaren.

Werden die Fluoreszenzfarbstoffe am Ende der PCR-Produkte durch Laserstrahlung angeregt, emittieren sie Licht einer für den jeweiligen Farbstoff spezifischen Wellenlänge. Das Licht wird von einem Detektor aufgefangen, digital verarbeitet und analysiert. Sequenzen wurden mit *BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.0.0* bearbeitet und analysiert.

3.1.7 Restriktion von DNA

Zur Identitätskontrolle eines Plasmids und zur Bereitstellung von DNA-Fragmenten für die Klonierung wurde DNA einer enzymatischen Spaltung durch Restriktionsenzyme (Endonukleasen) unterzogen. Je nach Angaben des Herstellers wurde dem Ansatz, neben dem geeigneten Puffer und dem jeweiligen Enzym, BSA zugesetzt. Das Restriktionsvolumen

richtete sich nach der zu schneidenden DNA-Menge. Stets wurden die vom Hersteller empfohlenen Restriktionspuffer verwendet und die angegebenen Reaktionsbedingungen eingehalten. Anschließend wurde die Restriktion auf einem 1 %igen Agarosegel kontrolliert.

3.1.8 DNA-Extraktion aus Agarosegel

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die gewünschte DNA unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und je nach Größe des Gelstücks in 500 - 800 µl NaJ 10 min bei 55 °C und 1300 rpm in einem Reaktionsgefäß geschüttelt. Anschließend wurden je nach Größe des Gelstücks 10 - 20 µl Silica-Milch zugegeben und erneut bei 55 °C für 10 min inkubiert. Dabei wurde mehrmals invertiert. Der Ansatz wurde danach eine Minute bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und das Silicapellet in 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Erneut wurde eine Minute bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Je nach DNA-Menge wurde das Pellet in 20 - 50 µl HPLC-H₂O für 10 min bei 50 °C gelöst. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 16000 x g und RT wurde die in Wasser gelöste DNA abgenommen und die Konzentration in einem 1 %igem Agarosegel kontrolliert.

3.1.9 Klonierung

3.1.9.1 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde der Vektor pGEM-TEasy verwendet. Der Vektor wurde vom Hersteller mit EcoRV restringiert und an beiden Enden mit 3'terminalen Thymidinen versehen. Da PCR-Produkte der meisten thermostabilen Polymerasen (hier: Taq-DNA-Polymerase) einzelne Desoxyadenosine am 3'-Ende aufweisen, wird die Ligation durch die 3'-Thymidinreste erleichtert.

Der Vektor ermöglicht nach Transformation in Bakterien eine Blau-Weiß-Selektion auf Selektionsagar. Der Mechanismus beruht auf einer Unterbrechung des LacZ-Gens, die durch Integration eines DNA-Fragmentes bestehen bleibt und nur bei Ligation des Vektors alleine aufgehoben wird. Ligiert der Vektor ohne Integration eines DNA-Fragmentes, kann das LacZ-Gen abgelesen werden und Bakterien, die solche Plasmide tragen, bilden auf Agar mit IPTG

und X-Gal blaue Kolonien. Bakterien, die ein Plasmid mit integriertem DNA-Fragment tragen, bilden weiße Kolonien (Ullmann *et al.*, 1968).

Eine flankierende multiple Klonierungsstelle erlaubt anschließend das Herausschneiden des inklonierten PCR-Produktes mit verschiedenen Enzymen.

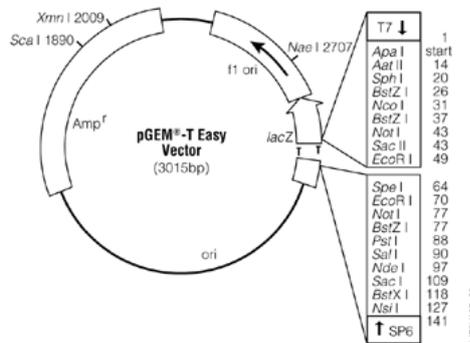


Abb. 3.1: Vektorkarte pGEM-TEasy (Entnommen aus dem Katalog der Firma Promega)

Ligation von PCR-Produkten in pGEM-TEasy

Nach Angaben des Herstellers wurde der Ligationsansatz wie folgt in einem Reaktionsgefäß angesetzt:

3 µl	PCR-Produkt
1 µl	pGEM-TEasy-Vektor
1 µl	T4-DNA-Ligase
5 µl	2 x Ligationspuffer

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

3.1.9.2 Klonierung in Expressions-Vektoren

Der Expressionsvektor pAcGFP-N1 ermöglicht durch den CMV-Promotor die Expression von Proteinen in Fusion mit dem grünen Fluoreszenzprotein aus der Qualle *Aequorea coerulea* (AcGFP). DNA-Sequenzen, die in den Vektor kloniert werden sollen, müssen für die eukaryotische Expression ein eigenes Startkodon und eine Kozak-Konsensussequenz aufweisen (Kozak, 1984).

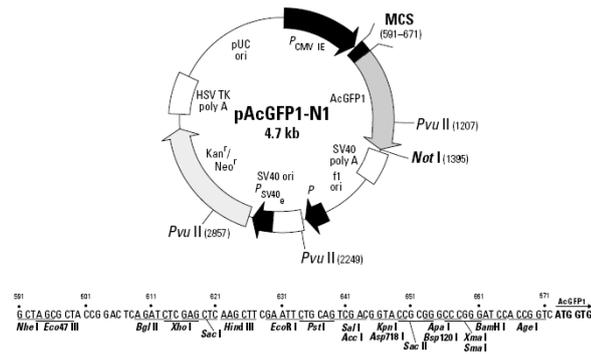


Abb. 3.2: Vektorkarte pAcGFP-N1 (Entnommen aus dem Katalog der Firma Clontech)

Ligation von restringierten DNA-Fragmenten in Expressions-Vektoren

DNA-Fragment und Vektor wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und die Konzentrationen der aufgereinigten Fragmente bestimmt. Im Anschluss wurde folgender Reaktionsansatz in einem Reaktionsgefäß angesetzt:

0,2 µl T4-DNA-Ligase (NEB)
 2 µl 10 x T4-DNA-Ligationspuffer
 50 – 100 ng restringierter Vektor
 200 – 300 ng restringiertes DNA-Fragment
 ad. 20 µl mit HPLC-H₂O

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

3.1.9.3 Fällen von Ligationsansätzen

Für Transformationen in *E. coli* Bakterien wurden Ligationsansätze durch Fällen mit Alkohol von Salzen befreit. Dafür wurde der Ligationsansatz mit HPLC-H₂O auf ein Volumen von 100 µl gebracht. Nach der Zugabe von 2,5 Volumen 99 %igem Ethanol, 10 µl 3 M NaAc und 2 µl Glykogen wurde der Ansatz 15 min bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 250 µl 70 %iger Ethanol zugegeben. Nach fünfminütiger Zentrifugation wurde der Überstand sorgfältig abgenommen, das Pellet getrocknet und in 16 µl HPLC-H₂O gelöst. So konnte der Ligationsansatz bis zur Transformation bei -20 °C gelagert werden.

3.1.10 Herstellung „elektrokompetenter“ Bakterien

„Elektrokompetente“ Bakterien sind in der Lage, unter Einfluss eines elektrischen Feldes externe DNA aufzunehmen. Zur Elektroporation werden dabei exponentiell abnehmende Spannungsimpulse gesetzt. *E. coli* Bakterien können mit Hilfe eines geeigneten Protokolls „elektrokompetent“ gemacht werden. Dabei werden die Bakterien in der exponentiellen Phase des Wachstums geerntet und anschließend entsalzen, um einen Kurzschluss bei der Elektroporation zu vermeiden.

Am Vortag wurde zunächst eine 5 ml LB-Streptomycin-Vorkultur mit *E. coli* TOP10 Bakterien aus einem Kryostock angeimpft und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde eine 450 ml LB-Streptomycin-Hauptkultur mit 4,5 ml der Vorkultur angeimpft und bei 200 rpm und 37 °C geschüttelt. Die Wachstumskontrolle erfolgte photometrisch bei 605 nm. Bei einer OD₆₀₅ von 0,5 - 0,6 wurde die Kultur auf Eis gestellt und dort 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in 50 ml-Reaktionsgefäßen bei 1500 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet aufgeschüttelt. Die Bakterien wurden im Anschluss mit eisgekühltem, autoklaviertem 10 %igem Glycerin gewaschen. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 1200 x g und 4 °C wurde der Überstand sorgfältig abgekippt und die Bakterien in dem Rückfluss gelöst. Die kompetenten Bakterien wurden zu 50 µl Aliquots schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.1.11 Transformation von „elektrokompetenten“ Bakterien

Ein 50 µl Aliquot „elektrokompetenter“ *E. coli* TOP10 - Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Standardmäßig wurden 8 µl eines gefällten Ligationsansatzes zugegeben, vorsichtig gemischt und kurz auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde in eine vorgekühlte Küvette (2 mm) gegeben und die Membranen der Bakterien mit einem Elektroschock bei 1,6 kV, 25 µF und 200 Ω für DNA durchlässig gemacht. Nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen mit 0,8 ml SOC-Medium in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 140 rpm eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Standardmäßig wurden 200 µl auf einer Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum von Kolonien wurde am nächsten Tag kontrolliert. Waren wenige Kolonien pro Platte gewachsen,

wurde der Rest der Transformation auf einer neuen Platte mit Selektionsagar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.12 Kolonie-PCR

Die Effizienz von Transformationen wurde in vielen Fällen mit Hilfe einer Kolonie-PCR kontrolliert. Auch die Fragmentgröße konnte dabei ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde eine PCR mit geeigneten Primern vorbereitet. Primer wurden so konzipiert, dass sie im Fall einer *insert*-Integration ein deutlich größeres PCR-Produkt amplifizierten als im Fall einer Religation des Vektors ohne *insert*.

Folgende Primer wurden für die verwendeten Vektoren eingesetzt:

Tab. 3.1: Verwendete Primerpaare für Kolonie-PCR.

Vektor	Primerkombination
pGEM-TEasy	pGEMF / pGEMR
pAcGFP-N1	pAcGFPf / pAcGFPr

Die PCR wurde standardmäßig vorbereitet und ein kleiner Teil der Bakterienkultur mit Hilfe einer Pipettenspitze oder einem Zahnstocher im oberen Teil des PCR-Ansatzes gelöst.

Das PCR-Programm wurde nur hinsichtlich der Annealingtemperatur abhängig von den verwendeten Primern variiert:

Kolonie-PCR	Temperatur	Haltedauer	Zyklusanzahl
Vordenaturierung	94°C	4 min	1
Denaturierung	94°C	45 s	25
Annealing	55°C (pGEM) bzw. 62°C (pAcGFP-N1)	45 s	
Elongation	72°C	90 s	
Endelongation	72°C	5 min	1
Kühlung	8°C	∞	1

Je PCR-Ansatz wurden 5 - 7 µl auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und die Größe der entstandenen PCR-Produkte kontrolliert.

3.1.13 Kultivierung von Bakterienkulturen

Um DNA aus transformierten Bakterien zu gewinnen, wurden einzelne Kolonien vom Selektionsagar gepickt und damit 3 ml Selektions-LB-Medium angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 240 rpm inkubiert.

3.1.14 Herstellung von Glycerin-Bakterienstocks

Als positiv identifizierte Bakterien-Klone wurde dauerhaft konserviert, um je nach Bedarf wieder mit ihnen arbeiten zu können. Dazu wurden 0,5 - 1 ml Bakterienkultur 1:1 mit 40 %igem Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Dauerlagerung erfolgte bei -80 °C.

3.1.15 Erythrozytenlyse von Blutproben

Frisches Rhesusaffen- bzw. Menschenblut wurde sowohl zur Isolation von RNA als auch von DNA verwendet. Da Erythrozyten keine Nukleinsäure enthalten, wurden diese durch einen osmotischen Schock lysiert.

Die Blutprobe wurde zunächst auf ein Volumen von 50 ml mit Erythrozytenlyse-Puffer aufgefüllt und ca. 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 7 °C und 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das zellhaltige Pellet mit 25 ml Erythrozytenlyse-Puffer gewaschen. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, der Überstand sorgfältig abgekippt und das Zellpellet für DNA- oder RNA-Isolationen verwendet.

3.1.16 Auftrennung von mononukleären Blutzellen (PBMC) aus Vollblut

Mit Hilfe der Ficoll-Gradienten-Zentrifugation können die Bestandteile des Blutes ihrer Größe und Dichte nach aufgetrennt werden. EDTA-Blut wurde zunächst 1:1 mit HEPES-gepuffertem Medium verdünnt. Je 4 ml Ficoll (1,077 d) wurden in 15-ml-Ficollröhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 8 ml verdünntem Blut überschichtet. Durch eine 20minütige (Mensch) bzw. 45minütige (Rhesusaffe) Zentrifugation bei 600 x g und RT trennten sich

PBMC von Erythrozyten und Thrombozyten, die sich im unteren Teil des Röhrchens sammeln. Die PBMC bilden eine Interschicht zwischen dem Medium, welches die obere Phase bildet, und dem Ficoll, welches sich als weißliche Schicht in der Mitte sammelt. Mit Hilfe einer Pasteurpipette ließen sich die PBMC ernten. Rhesusaffen-PBMC wurden anschließend einmal mit 30 ml Erythrozyten-Lysepuffer gewaschen, bei 300 x g 10 min zentrifugiert, einmal mit 1 x PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Reinheit der PBMC ließ sich so deutlich erhöhen und Kontaminationen mit Erythrozyten und Thrombozyten minimieren.

Im Lichtmikroskop können die PBMC als stecknadelförmige Zellen identifiziert und gezählt werden. Durch 10 min Zentrifugieren bei 300 x g und RT erhält man ein Pellet, welches weiterverwendet werden kann.

3.2 Zellkultur

Zellkulturen eukaryontischer Zelllinien wurden in einer wasserdampfgesättigten 5 %igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C inkubiert.

3.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Lebendzahl von Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. 20 µl geernteter Zellen wurden mit 20 µl Trypanblau (0,5 % in 1 x PBS) versetzt und fünf Minuten bei RT inkubiert.

Die Zellmenge wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zellmenge / ml} = (\text{gezählte Zellzahl} / \text{Anzahl gezählter Quadrate}) \times \text{Verdünnung} \times 1000$$

3.2.2 Mycoplasmen-Kontrolle

Zellkulturen wurden in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmenkontaminationen überprüft. Ebenso wurden Zellen, die von anderen Laboren erhalten wurden, vor Inkulturnahme überprüft. Zu diesem Zweck wurden je 200 µl Zellkulturüberstand und als Negativkontrolle reines Medium (ebenfalls im Inkubator) abgenommen, fünf Minuten bei

95 °C inkubiert und anschließend bei 1200 x g für eine Minute bei RT abzentrifugiert. Die PCR-Ansätze wurden nach Standardprotokoll angesetzt. Zunächst wurde eine PCR mit je 1 µl Zellkulturüberstand und einer parallelen Positivkontrolle mit dem Primerpaar MYC1 benutzt. 1 µl dieser ersten PCR wurde anschließend in einer *nested*-PCR mit dem Primerpaar MYC2 verwendet.

Für beide PCR-Ansätze wurde das gleiche Programm verwendet.

Je nach Mycoplasmenspezies treten Banden im Bereich von 200 - 500 bp auf, meist findet man eine Bande bei ca. 450 bp oder eine Doppelbande bei 400 und 450 bp.

MYC-PCR	Temperatur	Haltedauer	Zyklusanzahl
Vordenaturierung	94°C	3 min	1
Denaturierung	94°C	30 s	35
Annealing	55°C	2 min	
Elongation	72°C	1 min	
Endelongation	72°C	7 min	1
Kühlung	8°C	∞	1

3.2.3 Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen

Das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Zum einen wurde mit *Metafectene* (Biontex) in dieser Studie das Prinzip der Lipofektion verwendet. Zum anderen stand im späteren Verlauf der Arbeit ein Nukleofektor der Firma Amaxa zur Verfügung, mit dessen Hilfe sich DNA durch die physikalische Methode der Elektroporation direkt in den Zellkern einschleusen lässt.

Bei der Methode der Lipofektion bilden sich durch polykationische Lipide in wässriger Phase Komplexe aus Nukleinsäure und Liposomen aus. Diese sind in der Lage, die Zellwand endozytotisch zu passieren. Standardweise wurden 1×10^6 K562-Zellen am Tag der Transfektion in einer 22 cm² Petrischale ausgesät und zwei bis drei Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die Transfektion wurden 10 µg DNA mit antibiotikafreiem und serumfreiem Medium auf ein Volumen von 300 µl gebracht. Separat wurden 40 µl *Metafectene* mit 260 µl antibiotikafreiem und serumfreiem Medium gemischt. Das verwendete DNA-*Metafectene*-Verhältnis wurde in Optimierungstransfektionen ermittelt. DNA- und *Metafectene*-Lösung wurden vereint und durch Auf- und Abpipettieren gemischt.

Während der anschließenden 20minütigen Inkubationszeit bei RT sollten sich DNA und Lipofektionsreagenz vereinen. Tröpfchenweise wurde die Lösung auf die Zellsuspension gegeben.

Bei einer Nukleofektion wird durch einen elektrischen Impuls kurzfristig die Zellmembran depolarisiert, wodurch die DNA direkt in den Kern der Zelle eingeschleust wird. Für jede Zelllinie bietet die Firma Amaxa optimierte Puffer und Programme (Zeit und Dauer des Elektroimpulses) an. Für die Zelllinie K562 wurde standardmäßig Puffer 1b und Programm T-03 verwendet. Je Nukleofektion wurden 1×10^6 K562-Zellen, einmal mit $1 \times$ PBS gewaschen und anschließend in $100 \mu\text{l}$ Puffer 1b blasenfrei aufgenommen. $1 - 3 \mu\text{g}$ DNA wurden in einem Volumen $< 5 \mu\text{l}$ zu den Zellen gegeben und alles zusammen blasenfrei in eine 4 mm Küvette überführt. Nach dem Elektroschock wurden sofort $500 \mu\text{l}$ vorgewärmtes Medium zugeben und die Zellen in einer 6 Well-Schale in insgesamt 2 ml RPMI-h-Medium mit 10 % FKS und Pen / Strep ausgesät.

Unabhängig von der Methode wurde Plasmid-DNA für stabile Transfektionen im Vorfeld mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert. Dadurch sollte die stabile Integration der eingeschleusten DNA in das Zellgenom erleichtert werden. Nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die Transfektionseffizienz an einem Fluoreszenzmikroskop bzw. durch FACS-Analysen kontrolliert. Bei einer Anregung von 488 nm geben AcGFP-exprimierende Zellen eine Grünfluoreszenz ab.

3.2.4 Selektion auf transfizierte Zellen

48 Stunden nach Transfektion wurde dem Medium geeignetes Antibiotikum zugesetzt. Zu mit *Mamu-A-*, *-B-*, *-I-* und *-E-* oder *HLA-C-pAcGFP* transfizierten K562-Zellen wurden 2 mg / ml Geneticin (G418) zugegeben. In den folgenden ein bis zwei Wochen starben untransfizierte Zellen. Mit pAcGFP-N1-transfizierte Zellen sollten dagegen resistent seien und sich weiter teilen, da der Vektor eine Geneticinresistenz vermittelt. Die Effizienz der Selektion wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop bzw. durch FACS-Analysen überprüft.

3.2.5 Anreicherung von MHC-Klasse-I-transfizierten K562 Zellen

Durch eine Anreicherung MHC-Klasse-I-transfizierter Zellen konnte die Anzahl der nicht-transfizierten Zellen deutlich verringert werden. Vor allem bei geringer Transfektionseffizienz erwies sich eine Anreicherung als vorteilhaft.

Die Zellzahl der anzureichernden transfizierten Zellen wurde bestimmt und die Zellen zweimal mit MACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen und mit 50 - 100 µl des monoklonalen Antikörpers W6/32 auf Eis inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen zweimal mit MACS-Puffer gewaschen und anschließend in 100 µl MACS-Puffer mit 10 µl *goat anti-mouse* MicroBeads pro 10⁶ Zellen 15 min auf Eis dunkel inkubiert. Im Anschluss wurde erneut zweimal mit MACS-Puffer gewaschen und die Zellen in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Die Anreicherung markierter Zellen erfolgte mit Hilfe einer MiniMACS-Säule und eines starken Magneten. Dazu wurde eine Säule nach Angaben des Herstellers in den Magneten eingespannt und mit 500 µl MACS-Puffer equilibriert. Danach wurden die markierten Zellen auf die Säule gegeben und dreimal mit je 500 µl MACS-Puffer gewaschen, wobei der Durchfluss aufgefangen wurde. Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und auf ein frisches 15 ml Reaktionsgefäß platziert. Mit Hilfe eines Stempels wurden 500 µl MACS-Puffer durch die Säule gedrückt und aufgefangen. Sowohl die Zellen im Durchfluss als auch die MicroBead-markierten Zellen wurden in geeignetem Medium ausgesät und die Anreicherung mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops oder durchflusszytometrisch kontrolliert. Typischerweise wurde eine Anreicherung von 10 - 20 % auf 70 - 80 % positiver Zellen erreicht.

3.2.6 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Zur Konservierung wurden Zellen geerntet und einmal mit 1 x PBS gewaschen. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt, die Zellen in 1 ml Einfriermedium (DMSO, Gibco) aufgenommen und in ein 2 ml Kryo-Röhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden in einem Kryo-Einfrier-Container, der mit Isopropanol befüllt war, bei -80 °C eingefroren. Durch das Isopropanol sinkt die Temperatur um etwa ein Grad pro Minute, wodurch das Einfrieren für die Zellen sehr schonend abläuft. Zur dauerhaften Konservierung wurden die Zellen frühestens nach einem Tag in flüssigen Stickstoff transferiert.

3.2.7 Messung der zytolytischen Aktivität

Die zytolytische Aktivität von NK-Zellen wurde mit Hilfe des ^{51}Cr -Freisetzungstests überprüft.

Zunächst erfolgte eine radioaktive Markierung von Zielzellen mit ^{51}Cr , welches an intrazytoplasmatische Proteine bindet und spontan nur zu einem geringen Teil wieder abgegeben wird. Durch die Zugabe von Effektorzellen in verschiedenen Konzentrationen werden die Zielzellen lysiert, ihre Zellmembran ruptiert und das radioaktive ^{51}Cr wird freigesetzt. Die Menge des freigesetzten ^{51}Cr ist proportional zur Effektivität der Lyse. Nach Ermittlung der maximal möglichen ^{51}Cr freisetzung und Berücksichtigung der spontanen Freisetzung, konnte für die unterschiedlichen Verhältnisse der PBMC zu den Zielzellen die spezifische Lyse mit einer Rechenformel bestimmt werden. Der Wert wurde in Prozent angegeben und errechnete sich folgendermaßen:

$$\text{Spez. Lyse [\%]} = \left(\frac{4 \times \ddot{U} \text{ [cpm]} \times 100}{(3 \times S \text{ [cpm]} + \ddot{U} \text{ [cpm]})} \right)_{\text{Killing}} - \left(\frac{4 \times \ddot{U} \text{ [cpm]} \times 100}{(3 \times S \text{ [cpm]} + \ddot{U} \text{ [cpm]})} \right)_{\text{Spontanrelease}}$$

\ddot{U} = Überstand

S = Sediment

Als Effektorzellen dienten NK-Zellen aus PBMC, gewonnen aus frischem Rhesusaffen-Vollblut. Es mussten stets Blutproben von 2 - 6 Tieren vereint werden, da Blutabnahmen über 10 ml diesen Tieren nicht häufig zumutbar sind.

In eine Rundboden-Mikrotiterplatte wurden pro Napf je 100 μl hepesgepuffertes DMEM-I mit 10 % FKS und Pen / Strep vorgelegt. Zu Reihe A wurden je nach Versuchsaufbau 2×10^6 - 1×10^7 PBMC in 100 μl hepesgepuffertem DMEM mit 10 % FKS und Pen / Strep zugegeben und in einer geometrischen Verdünnungsreihe bis Reihe G verdünnt. Dadurch ergeben sich Lymphozyten / Zielzellen-Verhältnisse von 100:1 - 1:1 bis 500:1 - 8:1. Reihe H blieb stets frei von Lymphozyten, um die spontane Chromfreisetzung zu bestimmen (Spontanrelease).

Als Zielzellen dienten stabil mit Mamu-A-pAcGFP-transfizierte K562-Zellen. Eine stabile Transfektante mit AcGFP in K562-Zellen diente als Referenz. Zur Markierung mit radioaktivem ^{51}Cr wurden jeweils 1×10^6 Zielzellen geerntet und in 200 μl hepesgepuffertem DMEM mit 10 % FKS und Pen / Strep und zusätzlichen 100 μl FKS aufgenommen.

Anschließend wurden 50 μCi $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -Lösung zugegeben und die Zellen eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebautes ^{51}Cr wurde durch dreimaliges Waschen mit DMEM ohne FKS und Pen / Strep entfernt. Zwischen den Waschschrritten wurden die Zellen jeweils für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Für den Test wurden 1×10^4 Zellen in 100 μl hepesgepuffertem DMEM-I mit 10 % FKS und Pen / Strep pro Napf zu den Lymphozyten zugeben. Um die räumlich Nähe der Zellen am Boden der Platte zu gewährleisten, wurde die Platte fünf Minuten bei 40 x g zentrifugiert. Effektor- und Zielzellen wurden nun zusammen vier Stunden bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

Im Anschluss wurde die Platte fünf Minuten bei 40 x g zentrifugiert und 50 μl des Überstandes (Ü) in eine 96-Well-Messplatte pipettiert. Um die sedimentierten Zellen zu lysieren und das intrazelluläre Chrom freizusetzen, wurden je 10 μl 10 %iges TritonX zugegeben und kurz inkubiert. Je 50 μl dieser Lösungen wurden in eine weitere 96-Well-Messplatte überführt (Sediment, S). Zu allen Wells wurden je 200 μl Flüssigszintillator Optiphase Supermix (Wallac) gegeben, die Platte mit einer Klebefolie abgedichtet und die Proben anschließend auf einem Schüttler gemischt. Durch den Szintillator konnten nun die bei den radioaktiven Zerfällen freigesetzten Energien als Lichtblitze aufgezeichnet werden. Die Messung erfolgte im *Wallac Micro Beta Counter* in *counts per minute* (cpm).

Bei der Zusammenfassung von mehreren Testergebnissen erfolgte eine statistische Auswertung zur Signifikanz auf dem 5 % Niveau für die gemessenen Unterschiede in den verschiedenen Testreihen. Dazu wurde der Mann-Whitney-U-Test für nicht normal-verteilte Daten angewandt. Als signifikant wurde ein p-Wert von $< 0,05$ betrachtet.

3.2.8 Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell scanning*; FACS)

Proteinexpression und -interaktion wurde unter anderem mit Hilfe der Technik der Durchflusszytometrie kontrolliert. Die Messungen erfolgten an einem FACScan Durchflusszytometer (Becton Dickinson).

Die Methode der Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse und Charakterisierung physikalischer und molekularer Eigenschaften von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Hauptanwendung ist die Charakterisierung einzelner Zellen anhand ihrer lichtstreuenden und fluoreszierenden (z. T. mit Hilfe von Antikörpern) Eigenschaften. Dazu werden Zellen in Suspension durch spezielle Vorrichtungen des Durchflusszytometers in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl wie Perlen einer Perlenkette aneinandergereiht („hydrodynamische

Fokussierung“) und passieren so einzeln einen Laserstrahl. Physikalische Zelleigenschaften wie Größe und Granularität bestimmen die charakteristische Streuung des Laserlichtes. Die Streuung entlang des Laserlichtstrahls in Vorwärtsrichtung gibt Auskunft über die Größe der Zelle, d. h. je größer die Zelle, desto größer ist die Streuung in Vorwärtsrichtung. Der Parameter für die Vorwärtsstreuung wird als FSC (engl. *forward scatter*) bezeichnet. Des Weiteren erfolgt eine von der Granularität abhängige Streuung im rechten Winkel zum einfallenden Licht. Diese Seitwärtsstreuung wird auch SSC (engl. *sideward scatter*) genannt und ist umso höher, je größer die Granularität der Zelle ist.

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Dabei können sowohl selbstfluoreszierende Proteine, wie z. B. GFP, als auch durch fluoreszenz-markierte Antikörper markierte Proteine quantifiziert werden. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Zurückfallen der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau emittieren sie Lichtenergie, die als Fluoreszenz sichtbar wird. Durch den Energieverlust während des Strahlungsüberganges besitzt das energieärmere emittierte Licht stets eine größere Wellenlänge als das energiereichere absorbierte Licht. Die Absorption des Lichts ist abhängig vom Laser, der Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, und vom Fluorochrom, dessen Absorptionsspektrum im selben Wellenlängenbereich liegen muss.

Mit Hilfe geeigneter fluoreszenz-markierter Antikörper können Proteine auf der Oberfläche von Zellen oder auch intrazellulär nachgewiesen und quantifiziert werden. Diese Fluoreszenzfarbstoffe können ebenso wie selbstfluoreszierende Proteine vom Laserlicht angeregt werden. Bei Markierung von Zellen mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen muss beachtet werden, dass sich die Absorptions- und Emissionsspektren voneinander unterscheiden, damit es nicht zu Überlappungen der Spektren kommt.

Die gewonnenen Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften werden von speziellen Detektoren erfasst und verstärkt (sog. „Photomultiplier“, PMT). Über eine spezielle Computer-Software werden die verschiedenen Parameter der Zelle gespeichert und analysiert.

Die Vorteile der Durchflusszytometrie liegen in der Möglichkeit, verschiedene Parameter einer Zelle simultan zu erfassen. Zusätzlich können innerhalb von Sekunden mehrere Tausend Zellen analysiert werden, wodurch eine aussagekräftige Statistik ermöglicht wird.

3.2.8.1 Antikörpermarkierung für FACS-Analysen

Für eine FACS-Analyse wurden je Probe zwischen 5×10^5 und 1×10^6 Zellen geerntet und zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Dazu wurden die FACS-Probenröhrchen bis ca. 1 cm unter den Rand befüllt und anschließend für 10 min bei RT und $300 \times g$ zentrifugiert. Für Analysen mit primärem und sekundärem fluoreszenzmarkiertem Antikörper wurden je drei Röhrchen pro Probe vorbereitet. Als Negativkontrolle diente ein Röhrchen ohne Antikörper. Die Zellen im zweiten Röhrchen wurden ausschließlich mit dem sekundären Antikörper inkubiert, um eine mögliche unspezifische Bindung dieses Antikörpers an die Zellen ausschließen zu können. Die Zellen des dritten Röhrchens wurden als eigentliche Probe hintereinander mit beiden Antikörpern inkubiert. Bei einem direkt-markierten Antikörper entfällt die Probe zur Kontrolle einer Bindung des sekundären Antikörpers. Stattdessen wurde zu den Zellen eines Röhrchens ein Antikörper des gleichen Isotyps (Isotypkontrolle) als Kontrolle auf unspezifische Bindung zugegeben. Nach der ersten Antikörper-Inkubation wurde zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Die Inkubationszeiten lagen stets zwischen 45 - 90 min und wurden bei 4°C und unter Lichtabschluss durchgeführt. Vor der Messung wurden die Proben erneut zweimal mit 1 x PBS gewaschen und die Zellen in dem Rückfluss aufgenommen.

Die Auswertung erfolgte mit der *FlowJo 5.7.1* (Tree Star Inc.) Software.

3.2.8.2 Intrazelluläre Antikörpermarkierung für FACS-Analysen

Für intrazelluläre Anfärbungen von Zellen müssen die Zellmembranen permeabilisiert werden. Nur so können Antikörper ins Zellinnere gelangen. Um den momentanen Zustand der Zellen zu konservieren, müssen sie vor einer Permeabilisierung der Membranen fixiert werden.

Zunächst wurden 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen pro Probe geerntet und einmal mit 1 x PBS gewaschen. Die Anzahl und Art der Kontrollen entsprach denen bei einer Oberflächenmarkierung von Zellen (s. Kap. 3.2.8.1). Die Fixierung erfolgte in 0,5 - 1 ml 1 %igem Paraformaldehyd für 10 min bei RT. Anschließend wurde einmal mit 1 x PBS und einmal mit 0,25 %igem Saponin in 1 x PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten wie in Kap. 3.2.8.1 beschrieben. Jedoch wurden alle Waschschrte mit 0,25 %igem Saponin in 1 x PBS durchgeführt. Saponin muss bei allen Wasch- und Färbeschritten anwesend sein, da

die Permeabilisierung durch Saponin reversibel ist. Direkt vor der Messung wurde noch einmal mit reinem 1 x PBS gewaschen, um das Saponin vor der Messung zu entfernen.

3.2.9 Degranulierungsassay

Der Degranulierungsassay wurde in der vorliegenden Arbeit als alternative Methode zum Chromfreisetzungstest (s. Kap. 3.2.7) verwendet.

Im Verlauf des Assays werden Effektorzellen durch Zielzellen aktiviert. Dadurch fusionieren zytotoxische Granula mit der Zellmembran der Effektorzellen und geben ihren Inhalt an die extrazelluläre Umgebung ab. Dabei gelangen Proteine wie CD107a/b, die normalerweise nur in der Membran von späten Endolysosomen zu finden sind, zeitweise auf die Zelloberfläche. Dieser Effekt ist stark mit der Zytotoxizität assoziiert (Betts *et al.*, 2003; Betts und Koup, 2004). CD107a wird auch als Lysosomen-assoziiertes Membranprotein-1 (*lysosome-associated membrane protein-1* (LAMP-1)) bezeichnet. Mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten monoklonalen CD107a-Antikörpers kann der Effekt der Degranulierung von NK-Zellen als Antwort auf eine Stimulation mit Zielzellen im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Chromfreisetzungstest, bei dem die Aktivierung der Effektorzellen nur indirekt über das Sterben der Zielzellen gemessen wird, werden beim Degranulierungsassay die Effektorzellen direkt über die Expression von Oberflächenrezeptoren analysiert.

Dabei bedient man sich verschiedener CD-Moleküle. Dies sind Oberflächenmoleküle, die auf einer Reihe von immunrelevanten Zellen exprimiert werden und nach dem System des *cluster of differentiation* (CD) benannt sind.

In dieser Versuchsreihe wurden als Zielzellen die stabilen K562-Transfektanten Mamu-A*01, -A*08, -A*11, -A*1303 und -A*1403 verwendet. Als Referenz wurden mit AcGFP-transfizierte K562-Zellen verwendet. Alle Zielzellen wurden geerntet, einmal mit 1 x PBS gewaschen und gezählt.

Je Versuch wurden aus 20 ml EDTA-Blut vom Tier 2136 oder 2146 die PBMC mit Hilfe einer Ficoll-Gradienten-Zentrifugation isoliert (s. Kap. 3.1.16), die Zellen durch eine Erythrozytenlyse gereinigt (s. Kap. 3.1.15) und gezählt. Je 100 µl Effektor- und Zielzellen in DMEM mit 10 % FKS und Pen / Strep (Zellkonzentrationen je nach PBMC-Ausbeute) wurden in einer 96-Well-Platte verteilt.

Zu allen Wells wurden 10 µg / ml Brefeldin A und 6 µl / ml Monensin gegeben. Dabei verhindert Brefeldin A die Exozytose von zytokinhaltigen Vesikeln, wohingegen Monensin

den intrazellulären Transportmechanismus hemmt. Diese Behandlung führt zu einer Erhöhung des Degranulierungsmarkers CD107a an der Zelloberfläche.

Zur Charakterisierung der NK-Zellen innerhalb der PBMC-Population wurden die Zellmarker CD3 (T-Zellmarker) und CD16 (NK-Zellmarker) verwendet.

Für PBMC alleine und für alle unterschiedlichen Zielzellen wurden die folgenden Kontrollen bzw. Proben angesetzt:

- 1) Antikörperfrei (Kontrolle der Zelleigenschaften ohne AK)
- 2) FITC-gekoppelte Isotypkontrolle (Kontrolle auf unspezifische Bindung)
- 3) FITC-gekoppelter CD3-AK (AK-Kontrolle)
- 4) TC-gekoppelter CD16-AK (AK-Kontrolle)
- 5) PE-gekoppelter CD107a-AK (AK-Kontrolle)
- 6) CD3-FITC-AK, CD16-TC-AK und CD107a-PE-AK (Probe)

Zusätzlich wurden PBMC, die mit allen drei Antikörpern markiert wurden, mit 2,5 µg/ml PMA und 0,5 µg/ml Ionomycin als Positivkontrolle stimuliert. Ionomycin erhöht dabei das intrazelluläre Ca_2^+ -Level und stimuliert über eine erhöhte Interferon-, Perforin-, IL-2- und IL-4-Produktion die Degranulierung von NK-Zellen. Zusätzlich wird dieser Effekt durch die Gabe von PMA, das die Proteinsynthese allgemein anregt, verstärkt.

Brefeldin A, Monensin, PMA, Ionomycin, der CD107a-Antikörper und der Isotyp-Kontrollantikörper wurden direkt zu Versuchsbeginn zugegeben. Nach vier Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurden alle Proben in FACS-Röhrchen überführt und einmal mit 1 x PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe der CD16- und der CD3-Antikörper. Die Inkubation fand unter Lichtabschluss eine Stunde bei 4 °C statt. Vor der Messung wurden die Zellen erneut mit 1 x PBS gewaschen und in einem kleinen Volumen 1 x PBS resuspendiert.

Die Messung erfolgte an einem FACScan Durchflusszytometer (Becton Dickinson) nach dem Prinzip der 3-Farben-FACS-Analyse. Kompensationen wurden den Gerätebeschreibungen entsprechend durchgeführt. Je Probe wurden 100000 Ereignisse aufgenommen und analysiert. Die Auswertung erfolgte mit *FlowJo 5.7.1*. Die Analyse wurde ausschließlich auf Zellen innerhalb des Gatters der Lymphozytenpopulation durchgeführt. $CD3^- / CD16^+$ Zellen wurden als NK-Zellpopulation definiert und anschließend auf ihre CD107a-Expression hin analysiert (vergl. Abb. 4.21). Eine positive Bewertung der Stimulationsantwort erfolgte, wenn die Anzahl der $CD107a^+$ -Zellen in der AcGFP-Kontroll-Stimulation (MHC-Klasse-I-negative AcGFP-exprimierende K562-Zellen als Maximalstimulation) mindestens dreimal so hoch war wie die in der Probe mit unstimulierten PBMC (CD107a-Basalexpression). Der Prozentsatz

an CD107a-positiven Zellen in der „Basalexpressions-Probe“ wurde als Nullwert festgesetzt, wohingegen der Prozentsatz an CD107a-positiven Zellen in der „Maximalstimulation-Probe“ als 100 % Stimulation festgesetzt wurde. Anschließend konnte so die relative CD107a-Expression für alle Mamu-A-Transfektanten in Prozent berechnet werden.

3.2.10 MHC-Klasse-I - KIR-Bindungsassay

Für Interaktionsstudien zwischen Mamu-A-Transfektanten und NK-Zellrezeptoren wurden rekombinante multimerisierte KIR-Ig-Fusionsproteine von Philip Kruse und Meike Hermes (FG Primantengenetik, DPZ) zur Verfügung gestellt. Diese Multimere aus Biotin-gekoppeltem Protein-A und KIR-Ig-Homodimeren wurden mit PE-Cy5.5-gekoppeltem Streptavidin markiert.

Folgende Kontrollen und Proben wurden je Transfektante angesetzt:

- (1) unbehandelt
- (2) Biotin-gekoppeltes Protein-A + Streptavidin-PE-Cy5.5
- (3) Aufreinigung von Zellkulturüberständen untransfizierter HEK-293-Zellen mit Biotin-gekoppeltem Protein-A + Streptavidin-PE-Cy5.5
- (4) Aufreinigung von Zellkulturüberständen KIR-Ig-transfizierter HEK-293-Zellen mit Biotin-gekoppeltem Protein-A + Streptavidin-PE-Cy5.5

Je Probe wurden 5×10^5 Zellen geerntet und einmal in 1 x PBS in FACS-Röhrchen gewaschen. Vor der Multimerisierung wurde die Proteinkonzentration der KIR-Ig-Fusionsproteine bestimmt und 10 µg / Probe mit 0,7 µg Biotin-Protein-A gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurde dem Ansatz Streptavidin-PE-Cy5.5 in einem Verhältnis von 1:200 hinzugefügt. Nach 15 min bei RT wurde der gesamte Ansatz den Zellen zugefügt und diese eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Vor der Messung wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Ein schematischer Versuchsablauf ist in Abbildung 4.26 dargestellt.

3.2.11 Konfokale Mikroskopie

3.2.11.1 Das Prinzip der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie eignet sich zur genauen räumlichen Auflösung dickerer Objekte wie z. B. einzelne Zellen. Sie ermöglicht u. a. eine Darstellung einzelner Schichten in der x-z-Ebene, wodurch z. B. Schnittbilder einer Zelle registriert werden können. Die Laserscan-Mikroskopie ist eine Rastertechnik, bei der das Objekt punktweise von einem Laserstrahl abgetastet wird. Durch eine feine Öffnung (*pinhole*) wird das Laserlicht gebündelt und durch ein Objektiv mit hoher Apertur auf das Objekt projiziert. Strahlung, die vom Objekt ausgeht, wird durch eine spiegelbildlich angeordnete Optik aufgenommen. Die Brennpunkte beider Linsen fallen dadurch im Objektpunkt zusammen. Durch diese Konfokalität werden Lichtstrahlen, die außerhalb des gemeinsamen Brennpunktes liegen, nicht dargestellt.

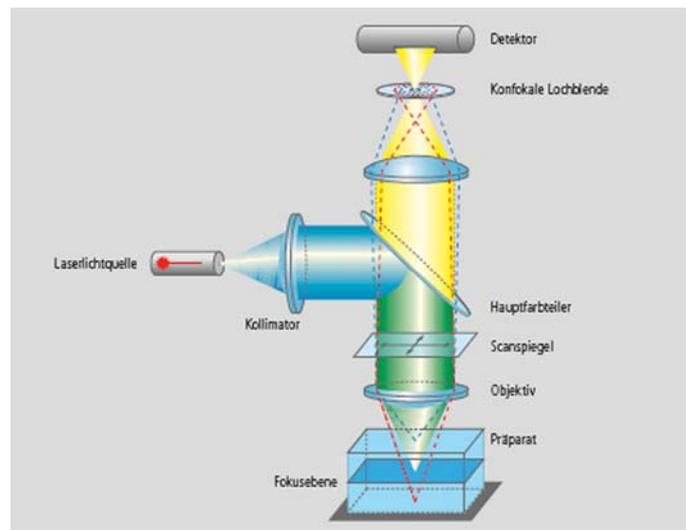


Abb. 3.2: Strahlengang in einem konfokalen Laser *Scanning* Mikroskop (nach www.zeiss.de).

Die Lochblende (*pinhole*) ist zur Fokusebene konjugiert angeordnet. Dadurch wird Licht, welches nicht aus der Fokusebene stammt, vom Detektor nicht erfasst. Durch den Laserstrahl wird das Präparat Pixel- und zeilenweise gerastert. Die Pixeldaten werden von einem Rechner digital zu einem Gesamtbild verarbeitet.

3.2.11.2 Konfokale Mikroskopie am LSM 410

Für die Experimente wurde ein konfokales Lasermikroskop (LSM 5 PASCAL von Zeiss) verwendet, das für schnelle, flexible Bildaufnahmen modifiziert und optimiert wurde.

Das Mikroskop ist mit einem Argon-Laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$) und einem Helium/Neon-Laser ($\lambda = 543 \text{ und } 633 \text{ nm}$) ausgestattet. Die unterschiedlichen Wellenlängen wurden mit Hilfe

verschiedener *Photomultiplier* detektiert. Dadurch war eine Mehrfachmarkierung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen möglich.

In dieser Arbeit wurden die folgenden Filtersätze verwendet.

Tab.3.2: Verwendete Filtersätze am LSM 5 PASCAL (Zeiss).

Bezeichnung	Anregung	Strahlteiler	Emission	Farbe
Filtersatz 38	BP 470/40	FT 495	BP 525/50	grün
Filtersatz 00	BP 530-585	FT 600	LP 615	rot

BP: Bandpassfilter; FT: Farbteiler; LP: Langpassfilter

Die am LSM installierte Software ermöglichte die getrennte Aufnahme von durch AcGFP-emittiertem Licht und durch RPE-Cy5-emittiertes Licht. Zudem konnten die beiden Farblaser überlagert werden. Die Bilder konnten im JPEG-Format abgespeichert werden. Dadurch war eine Weiterbearbeitung mit einem Grafikbearbeitungsprogramm möglich (*Photoshop CS*, Adobe). Bei starker Hintergrundanfärbung konnte so der Kontrast erhöht werden.

3.2.11.3 Präparation von Zellen für mikroskopische Expressions-Analysen

Zur subzellulären Lokalisation von MHC-Klasse-I-Molekülen in transfizierten K562-Zellen wurden diese mit dem monoklonalen MHC-Klasse-I-AK W6/32 behandelt. Nach zweimaligem Waschen von 5×10^5 bis 1×10^6 transfizierter K562-Zellen erfolgte die AK-Markierung für eine Stunde bei 4 °C. Anschließend wurde einmal mit 1 x PBS gewaschen und die W6/32-Markierung mit einem sekundären AK (RPE-Cy5- *goat anti-mouse* IgG) sichtbar gemacht (Inkubation bei 4 °C unter Lichtabschluss). Nach erneutem Waschen der Zellen, wurden diese in einem kleinen Volumen 1 x PBS resuspendiert. Zur Stabilisierung der Fluoreszenz erfolgte eine Vorbehandlung der Objektträger mit je einem Tropfen *Fluorescent Mounting Medium* (Dako). Nach kurzem Antrocknen wurden ca. 20 µl Zellsuspension auf den Objektträger gegeben, mit einem Deckgläschen überschichtet und dieses mit Nagellack fixiert.

3.3 Proteinanalytische Methoden

3.3.1 Präparation von Proteinlysaten

Für *Immunoblot*-Analysen wurden Gesamt-Proteinlysate aus eukaryotischen Zellen präpariert. Dazu wurden 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen geerntet und einmal mit 1 x PBS gewaschen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei $300 \times g$ wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet in $30 \mu\text{l}$ RIPA-Puffer aufgenommen. Die gelösten Proben konnten so bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden. Vor der Auftragung wurden die Proben 1:3 mit 6 x Lämmli-Puffer / DTT (1:1 gemischt) versetzt und 10 min bei 95°C aufgekocht.

3.3.2 Proteinanalyse über SDS-Polyacrylamid-Gradientengele (PAGE)

Die Auftrennung von Proteinproben erfolgte auf 10 %igen Trenngelen, die mit 6 %igen Sammelgelen überschichtet wurden, in einer Elektrophoresekammer. Diese wurde nach Angaben des Herstellers mit Elektrophoresepuffer befüllt, die Proben, wie in Kap. 3.3.1 beschrieben, behandelt und mit einer *Hamilton*-Spritze in die Taschen des SDS-Gels pipettiert. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde ein vorgefärbter Proteinmarker neben die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden bei 12 - 15 mA im Sammelgel vereint und bei 18 -20 mA im Trenngel aufgetrennt.

3.3.3 Immunoblot-Analysen

Die zuvor im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden mit dem *Immunoblot*-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

Nitrocellulose und sechs *Whatman*-Papiere (Filterpapier) wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und in Transferpuffer equilibriert. In einem *Semi-Dry-Blotter* wurden drei Filterpapiere mit der Nitrocellulosemembran, dem Gel und drei weiteren Filterpapieren blasenfrei überschichtet (Abb. 3.3). Bei $2 \text{ mA} / \text{cm}^2$ Gel wurden die Proteine für $1 \frac{1}{2}$ Stunden auf die Nitrocellulosemembran übertragen.

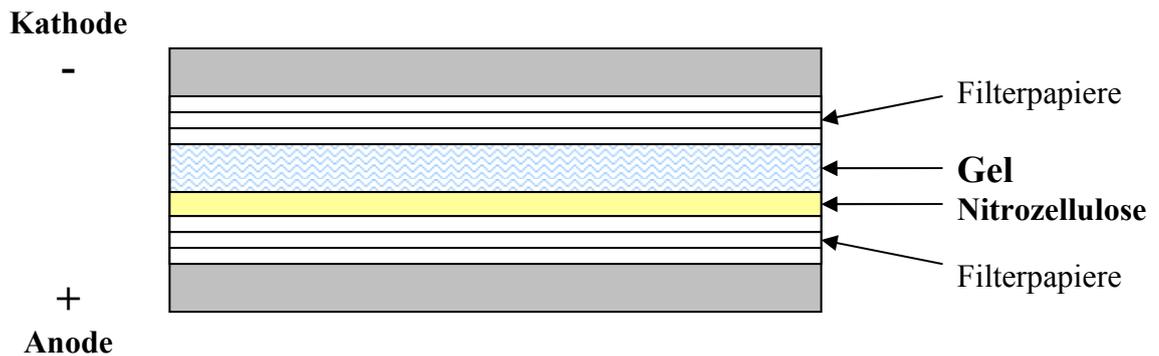


Abb. 3.3: Aufbau eines *Semidry-Blots*

In einem *Semi-Dry-Blotter* werden drei Filterpapiere mit der Nitrozellulosemembran, dem SDS-Gel und drei weiteren Filterpapieren blasenfrei überschichtet. Die negativ-geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld zur Anode und bleiben auf der Nitrozellulosemembran haften.

3.3.4 Protein-Markierung im *Immunoblot*

Nach Abschluss des Proteintransfers wurde der *Blot* abgebaut. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran eine Stunde bei RT in Blockierungslösung geschüttelt. Anschließend wurde die Membran in eine 5 %ige Milchpulverlösung mit 0,05 % Tween mit einem geeigneten monoklonalen Antikörper transferiert. Die Inkubation verlief über Nacht bei 4 °C oder eine Stunde bei RT. Im Anschluss wurde die Membran fünfmal in 1 x TBS mit 0,05 % Tween gewaschen und in 5 %igem Milchpulver mit 0,05% Tween mit einem geeigneten sekundären Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper (1:4000 eingesetzt) eine Stunde bei RT inkubiert. Vor der Chemilumineszenzreaktion wurde die Membran viermal je fünf Minuten in 1 x TBS mit 0,05 % Tween und einmal fünf Minuten in 1 x TBS gewaschen.

3.3.5 Chemilumineszenzreaktion (*enhanced chemiluminescence- (ECL-) reaction*)

Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper ermöglichen durch eine Chemilumineszenzreaktion die Detektion von markierten Proteinen. Die ECL-Lösungen 1 und 2 wurden stets frisch angesetzt, um eine Abnahme der Reaktionsfähigkeit zu vermeiden. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid. Dadurch entsteht eine Lichtemission mit einer Wellenlänge von 428 nm, die auf einen Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

Die Membran wurde eine Minute im Dunkeln in der ECL-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran auf Papier getrocknet und in Folie eingeschlagen. Die Chemilumineszenz wurde auf einem Röntgenfilm in einer Fotokassette festgehalten. Die Expositionsdauer variierte je nach Signalstärke zwischen 30 s und fünf Minuten. Die Entwicklung erfolgte in einer KODAK-Entwicklermaschine.

3.4 Alignierung und Stammbaumrekonstruktion

Sequenzen wurden für phylogenetische Analysen mit dem Computerprogramm *ClustalX 1.81* (Thompson *et al.*, 1997) aligniert. Anschließend wurden die Alignierungen mit Hilfe des Computerprogramms *Bioedit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3* (Hall, 1999) manuell überarbeitet und die DNA-Sequenzen in AS-Sequenzen übersetzt.

Phylogenetische Stammbäume nach dem *Neighbor-Joining*-Verfahren wurden in *Mega 3.1* (Kumar *et al.*, 2004) mit dem *Bootstrap Test of Phylogeny* erstellt. Das Verfahren ermittelt prozentuale Wahrscheinlichkeiten für die Zusammengehörigkeit von Sequenzen. Die Astlängen zwischen Sequenzen geben die AS-Austausche je Aminosäure in Abhängigkeit vom angegebenen Maßstab an. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse wurde durch die Replikationsrate erhöht. Standardmäßig wurden 100000 Wiederholungen pro Baumkonstruktion durchgeführt.

ERGEBNISSE

4.1 Untersuchung der MHC-Klasse-I-Gene des Rhesusaffen

4.1.1 Etablierung von MHC-Klasse-I-spezifischen PCR

MHC-Klasse-I-Gene des Rhesusaffen wurden mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide (s. Kap. 2.13) aus cDNA verschiedener Tiere (vergl. Abb. 10.1) amplifiziert (Abb. 4.2). Zu diesem Zweck wurden separat Konsensus-Sequenzen verschiedener *Mamu-A*-, *Mamu-B*-, *Mamu-I*- und *Mamu-E*-Sequenzen gebildet, mit deren Hilfe sequenzspezifische Primer (SSP) konstruiert wurden. Eine Konsensus-Sequenz, die aus dem Vergleich verschiedener Sequenzen hervorgeht, gibt an jeder Position das am häufigsten vorkommende Nukleotid wieder.

Der *forward*-Primer wurde in den Bereich des Startkodons einschließlich einer Kozak-Konsensus-Sequenz gelegt und enthält am 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle. Die Sequenz des *reverse*-Primers wurde so gewählt, dass die MHC-Klasse-I-Sequenz möglichst vollständig amplifiziert wurde, wohingegen das Stoppkodon jedoch ausgeschlossen wurde. In 3'-Richtung wurde wie beim *forward*-Primer eine Sequenz eines geeigneten Restriktionsenzym eingebaut. Des Weiteren sollte die Amplifikation eine Klonierung der gewonnenen PCR-Produkte in einen Expressionsvektor ermöglichen. Dazu musste der *reverse*-Primer zusätzlich gewährleisten, dass nach der Umklonierung in den pAcGFP-N1-Expressionsvektor der Leserahmen zur Transkription des MHC-Klasse-I-AcGFP-Fusionsproteins aufrechterhalten blieb.

Innerhalb der *Mamu-B*-Gene bilden die von Urvater *et al.* (2000) beschriebenen *Mamu-I*-Gene eine Untergruppe, die auch in ihrer Sequenz einige Unterschiede zu den als *Mamu-B* beschriebenen Genen aufweisen. Die letzte Base des *Mamu-B*-spezifischen *forward*-Primers MBS-F-HindIII führte zum Ausschluss der *Mamu-I*-Sequenzen sowie einiger *Mamu-B*-Sequenzen. Der Primer endete mit einem Cytosin, einige der *Mamu-B*- und die *Mamu-I*-Sequenzen wiesen an dieser Position jedoch ein Guanin auf. Daher wurden für die *Mamu-I*-Untergruppe der *Mamu-B*-Gene entsprechende spezifische Oligonukleotide konzipiert (Abb. 4.1).

forward-Primer:

MAS-F-EcoRI GCTC**GAATTC**CAAGGATGCGCCCCGAACCCTCC
Mamu-A*0511 (AJ551320) -----ATGCGCCCCGAACCCTCCTCCTGGTGCTCTCTG...

MBS-F-HindIII GCTC**AAGCTT**CGGTCATGCGGGTCATGGCGCCC
Mamu-B*30 (AF157402) GAGACGCCGAGATGCGGGTCATGGCGCCCCGAACCCTCCTCCTGTGCTCTCGG...

MIS-F-HindIII GCTC**AAGCTT**CGGTCATGCGGGTCATGGCGCCC
Mamu-I*01011 (AF161865) -ATGCGGGTCATGGCGCCCGAACCCTCCTCCTGTGCTCTCGG...

MES-F-ECORI GCTC**GAATTC**GCCTCATGCGACTAGGAA
Mamu-E*05 (U41837) ATGGCGTCATGGCGACTAGGAACCTACTTCTCCTGTGCTCTCGGCCCTACCAA...

reverse-Primer:

MAS-R-BamHI TCTCTTACGGCTTGTAAGTGGAGGATCCTTATC
 (1012 bp)...TGCCAGGGCTCTGATGTGCTCTTACGGCTTGTAAGTGTGA **Mamu-A*0511**

MBS-R-KpnI TGATGTGTCTCTCACGGCTAAGGTACCTACG
 (1002 bp)...CCAGCGACAGTGCCAGGGCTCTGATGTGCTCTCACGGCTTGA **Mamu-B*30**

MIS-R-KpnI CTGATGTGTCTCTCACAGCTTGGTACCTACG
 (1009 bp)...TCCAGCAACAGTGCCAGGGCTCTGATGTGCTCTCACAGCTTGA **Mamu-I*01011**

MES-R-BAMHI TCTCTCACAGTTATAAACC GGATCCTTATC
 (990 bp)... CAGTGCCAGGGATCTGATGAGTCTCTCACAGTTATAAAGCCTGA **Mamu-E*05**

Abb. 4.1: Primer-Design durch einen Vergleich von Vollängen-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank.

Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe des Computerprogramms *ClustalX 1.81* erstellt. Hier wurde je eine Beispielsequenz der jeweiligen Gengruppe mit Bezeichnung und Zugriffs-Nr. unterhalb der Primersequenz abgebildet. *forward*-Primer wurden so ausgewählt, dass mindestens ein Startkodon und die Kozak-Konsensus-Sequenz enthalten waren. *reverse*-Primer wurden direkt vor das Stoppkodon gelegt. In die Primer-Sequenzen wurden geeignete Restriktionsstellen eingebaut, durch die nach Einklonierung in den pAcGFP-N1-Expressionsvektor der Leserahmen zur Transkription des AcGFP aufrecht erhalten blieb. Es wurden jeweils eigene Primer für *Mamu-A*- (MAS), für *Mamu-B*- (MBS), für *Mamu-I*- (MIS) und für *Mamu-E*-Sequenzen (MES) konstruiert. (...): Anzahl der ausgelassenen bp; **ATG**: Startkodon; **TGA**: Stoppkodon; **_**: Kozak-Konsensus-Sequenz. Eingebaute Restriktionsstellen sind rot abgebildet.

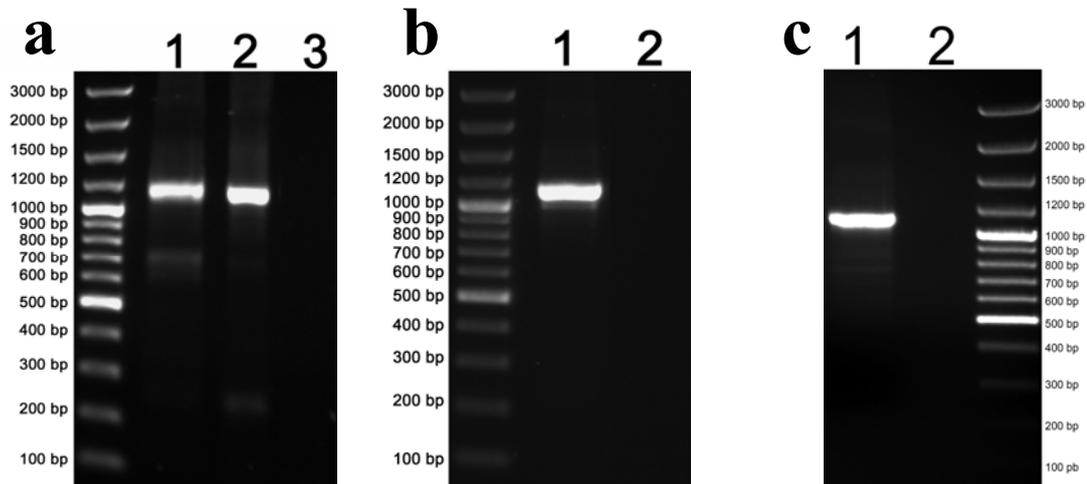


Abb. 4.2: Amplifikation der vollständigen Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Sequenzen aus cDNA.

Dargestellt sind Agarosegele mit Auftrennungen von je 2 µl PCR-Ansatz pro Spur neben einem Längenstandard (links). In die einzelnen Region-spezifischen PCR-Ansätze wurde je 1 µl cDNA als *template* eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte nach PCR-Programm 1. (a) Amplifikation von *Mamu-A* (Spur 1) mit den Primern MAS-F-EcoRI / MAS-R-BamHI und *Mamu-B* (Spur 2) mit den Primern MBS-F HindIII / MBS-R-KpnI. Spur 3 zeigt eine H₂O-Negativkontrolle. (b) Amplifikation von *Mamu-E* (Spur 1) mit den Primern MES-F-EcoRI / MES-R-BamHI neben einer H₂O-Negativkontrolle (Spur 2). (c) Amplifikation von *Mamu-I* (Spur 1) mit den Primern MIS-F-HindIII / MIS-R-KpnI neben einer H₂O-Negativkontrolle (Spur 2). Wie erwartet, zeigten alle PCR-Reaktionen ein Produkt mit einer Länge von ca. 1100 bp (1114 bp bei *Mamu-A*), (1113 bp bei *Mamu-B* / -I), (1102 bp bei *Mamu-E*).

Mit Hilfe der Region-spezifischen Primer wurden MHC-Klasse-I-PCR-Produkte mit einer Länge von durchschnittlich 1110 bp amplifiziert, über ein Agarosegel aufgetrennt (Abb. 4.2) und anschließend in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-TEasy ligiert. Nach einer Transformation der Ligationen in Bakterien wurden positive Kolonien in LB-Amp-Medium über Nacht inkubiert. Plasmid-DNA wurde präpariert und mittels Sequenzierung analysiert (s. Kap. 3.1). Die Sequenzen wurden auf ihre Vollständigkeit und Fehlerfreiheit mit Hilfe eines Vergleiches mit allen bei NCBI veröffentlichten Sequenzen kontrolliert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Klone, die mindestens dreimal mit identischer Sequenz vorlagen, wurden für Umklonierungen in den Expressionsvektor pAcGFP-N1 verwendet (s. Kap. 3.1.9.2). Der Erfolg der Klonierung wurde mit Hilfe einer Kolonie-PCR überprüft (Abb. 4.3; s. Kap. 3.1.12).

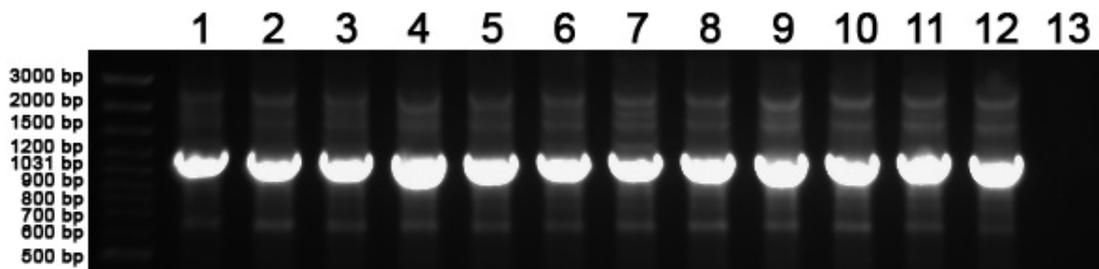


Abb. 4.3: Integrationskontrolle von *Mamu-B*-Sequenzen mit Hilfe einer Kolonie-PCR.

Dargestellt ist ein Agarosegel mit Auftrennungen von je 2 µl PCR-Ansatz pro Spur neben einem Längenstandard (links). Nach Transformation wurden Kolonien einzeln auf die Integration einer *Mamu-B*-Sequenz in den Klonierungsvektor hin überprüft, indem ein Teil der Bakterienkolonie in einem PCR-Ansatz mit den Oligonukleotiden pAcGFPf und pAcGFPr eingesetzt wurde und die DNA mit dem Programm für Kolonie-PCR amplifiziert. Spuren 1 - 12 zeigen die Auftragung der PCR-Ansätze mit den Klonen 1 - 12 einer *Mamu-B*-pAcGFP-Klonierung. Spur 13 zeigt die Auftragung der H₂O-Negativkontrolle. Alle PCR-Ansätze der hier gezeigten *Mamu-B*-pAcGFP-Klone amplifizierten ein PCR-Produkt mit der erwarteten Länge von ca. 1200 bp. Die Kontrollspur (13) blieb leer.

Positive Klone wurden in LB-Kan-Medium über Nacht angezogen, eine Plasmid-Präparation durchgeführt und die DNA erneut mit Hilfe geeigneter Vektor-Primer (pAcGFPf, pAcGFPr) sequenziert. Von fehlerfreien Klonen mit intaktem Leserahmen wurden Plasmide präpariert und für stabile Transfektionen linearisiert (s. Kap. 3.1).

4.1.2 Phylogenetische Analyse der isolierten MHC-Klasse-I-Gene des Rhesusaffen

4.1.2.1 Identifikation unterschiedlicher MHC-Klasse-I-Sequenzen des Rhesusaffen

Die Amplifikation mit Oligonukleotiden, spezifisch für verschiedene MHC-Klasse-I-Regionen, erbrachte unterschiedliche MHC-Klasse-I-Trankripte. Wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben, wurden nur fehlerfreie und mindestens dreifach isolierte Sequenzen in Auswertungen einbezogen.

Im Laufe dieser Arbeit wurden so 31 verschiedene, vollständige Sequenzen von *Mamu-A*, *Mamu-B*, *Mamu-I* und *Mamu-E* aus cDNA von insgesamt 63 Tieren isoliert. Alle Sequenzen wurden mittels der NCBI-Datenbank zunächst auf ihre Identität mit einem bereits bekannten Allel hin überprüft. Dabei konnten die in Tabelle 4.1 gelisteten MHC-Klasse-I-Allele identifiziert werden. Es wurden sieben verschiedene *Mamu-A*-Sequenzen und 21 verschiedene *Mamu-B*-Sequenzen identifiziert. Darunter war eine *Mamu-B*-Sequenz, die zu je 99 % identisch mit zwei Datenbanksequenzen war. Die Sequenz erhielt daher eine Doppelbezeichnung (B*7201 / B*7202) und beide Zugriffs-Nummern sind in der Tabelle 4.1 gelistet. Unter den *Mamu-B*-Sequenzen befand sich ein Pseudogen. Daneben wurden eine *Mamu-I*- und zwei verschiedene *Mamu-E*-Sequenzen isoliert. Zusätzlich wurde ein weiteres Pseudogen aus der *Mamu-A*- / *Mamu-AG*-Region isoliert (*Mamu-80-6*). Die vollständigen DNA-Sequenzen aller isolierten MHC-Klasse-I-Trankripte finden sich mit Übersetzung (bei vollständigem Leserahmen) in die AS-Sequenz im Anhang in Abbildung 10.1.

Tab. 4.1: MHC-Klasse-I-Allele isoliert aus cDNA verschiedener Rhesusaffen.

Neben der MHC-Klasse-I-Region sind die Allel-Bezeichnungen und die Zugriffs-Nr. der NCBI-Datenbank aufgelistet.

MHC-Klasse-I-Region	Allel-Bezeichnung	Zugriffs-Nr.
Mamu-A	A*01	U50836
	A*04	U41380
	A*0504	AF157396
	A*08	AF243179
	A*11	AF199357
	A*1303	AF157401
	A*1403	EF580138
	Mamu-80-6 (Pseudogen)	AB128049
Mamu-B	B*07	U41829
	B*09	NM_001079671
	B*12	AF243178
	B*17	AF199358
	B*21	AJ556879
	B*22	AJ556880

MHC-Klasse-I-Region	Allel-Bezeichnung	Zugriffs-Nr.
Mamu-B	B*26	AJ844602
	B*28	AJ556883
	B*29012	AJ556884
	B*30	NM_001048245
	B*3002	EF372278
	B*45	EF580167
	B*46	AJ556897
	B*47	AJ556898
	B*48	EF580168
	B*6002	AJ556905
	B*64	AJ556908
	B*69	AJ844601
	B*7201 / B*7202	AM902576 / AM902577
	B*7402-V1 (Pseudogen)	EF219485
	B*8801	EF580171
Mamu-I	I*01011	AF161865
Mamu-E	E*02	EF546441
	E*0110	EU109710

4.1.2.2 Identifikation eines neuen *Mamu-B*-Gens und neuer Varianten

Neben bereits bekannten MHC-Klasse-I-Sequenzen des Rhesusaffen konnte ein Transkript mit noch nicht beschriebener Sequenz und zwei Transkripte mit ungewöhnlicher Struktur isoliert werden. Alle drei Sequenzen konnten der *Mamu-B*-Region zugeordnet werden.

Die als neue identifizierte Sequenz war mit keiner der bisher bekannten Sequenzen mehr als 93 % identisch und wurde daher vorläufig als *Mamu-B-NEU* bezeichnet.

Die beiden ungewöhnlichen Transkripte zeichneten sich jeweils durch das Fehlen eines ganzen Sequenzabschnittes aus. Eine dieser Sequenzen war nahezu identisch mit der Sequenz von *Mamu-B-NEU*, nur fehlte ihr der Sequenzabschnitt, der die Transmembranregion kodiert. Diese Sequenzvariante ohne Transmembranregion wurde mit *Mamu-B-NEU-TM* benannt. Dem zweiten Transkript fehlte die komplette *leader*-Sequenz, ansonsten war sie nahezu identisch mit einer isolierten Sequenz, die durch den Vergleich mit der NCBI-Datenbank als *Mamu-B*28* identifiziert wurde. Demzufolge wurden diese beiden Sequenzen mit *Mamu-B*28+L* (mit *leader*-Sequenz) und *Mamu-B*28-L* (ohne *leader*-Sequenz) bezeichnet (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Neue Mamu-B-Sequenzen.

Neben der Klon-Nr. sind die nächst-verwandten Allele, die Hauptcharakteristika und die neue Bezeichnung der Sequenzen gelistet.

Klon-Nr.	Verwandte Allele	Charakteristika	Neue Bezeichnung
1	<i>B*28</i> (AJ556883)	99 % identisch mit <i>B*28</i> , aber ohne <i>leader</i> -Sequenz ⇒ Variante von Mamu-B*28+L	<i>Mamu-B*28-L</i>
2	z. B.: <i>B*8801</i> (EF580171) <i>B*9101</i> (EF580174) <i>I*01011</i> (AF161865) <i>B*8501</i> (EF580165)	93 % identisch mit verschiedenen Allelen ⇒ neues Gen	<i>Mamu-B-NEU+TM</i>
3	z. B.: <i>B*8801</i> (EF580171) <i>B*9101</i> (EF580174) <i>I*01011</i> (AF161865) <i>B*8501</i> (EF580165)	99 % identisch mit Klon-Nr. 2, aber ohne Transmembranregion ⇒ Variante von Mamu-B-NEU+TM	<i>Mamu-B-NEU-TM</i>

4.1.2.3 Genomische Zuordnungen der isolierten Sequenzen

Bisher liegt nur die vollständige genomische Sequenz der Rhesusaffen-MHC-Klasse-I-Region eines Haplotyps vor (Daza-Vamenta *et al.*, 2004; Kulski *et al.*, 2004). Dieser Haplotyp weist zwei *Mamu-A*-Gen-Loci und 19 *Mamu-B*-Gen-Loci auf. Beide *Mamu-A*-Gen-Loci sind funktionell, aber nur 13 der *Mamu-B*-Gen-Loci weisen einen vollständigen Leserahmen auf (Abb. 4.4a).

Ein Vergleich aller hier isolierten MHC-Klasse-I-Sequenzen mit den *Mamu-A*- und *Mamu-B*-Sequenzen dieser annotierten kompletten MHC-Klasse-I-Sequenz (Zugriffs-Nr.: AB128049) sollte Hinweise auf Locus-Zugehörigkeiten der einzelnen in dieser Arbeit beschriebenen Sequenzen liefern.

In Abbildung 4.4 ist eine schematische Darstellung der genomischen MHC-Klasse-I-Sequenz des sequenzierten Haplotyps wiedergegeben. Die MHC-Klasse-I-Sequenzen des bekannten Haplotyps wurden innerhalb der beiden MHC-Klasse-I-Regionen vom Telomer in Richtung des Zentromers aufsteigend durchnummeriert und zusätzlich in den phylogenetischen Bäumen mit einem h1 (für Haplotyp 1) versehen.

In die phylogenetischen Analysen wurden hier die vollständigen AS-Sequenzen, abzüglich der *leader*-Sequenz und der durch den 3'-Primer generierten AS, einbezogen (Abb. 4.4). Parallel wurden die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen sowie die $\alpha 3$ -Domäne mit Transmembranregion und zytoplasmatischem Teil zusätzlich getrennt von einander analysiert (vergl. Abb. 10.2). Sequenzen mit unvollständigem Leserahmen (Pseudogene) und Deletionsvarianten (*B*28-L*,

B-NEU-TM) wurden ausgeschlossen und die Auswertungen separat für *Mamu-A*- und *Mamu-B*-/*-I*-Sequenzen durchgeführt. Als Außengruppe wurde die Sequenz von *Mamu-E*0110* ausgewählt. Sie unterschied sich deutlich von allen *Mamu-A*- und *Mamu-B*-Sequenzen.

Unter den hier isolierten *Mamu-A*-Sequenzen finden sich Zugehörige zu beiden Genen des bekannten Haplotyps. *Mamu-A*01* ist identisch mit der genomischen Sequenz h1A1 und *Mamu-A*0504* ist identisch mit h1A2 (Abb. 4.4b, angezeigt durch eine vertikale Verbindung im phylogenetischen Baum).

Einige der 22 vollständigen *Mamu-B*-/*-I*-Sequenzen konnten mit hoher Wahrscheinlichkeit als Allele verschiedener Gene des Haplotyps h1 definiert werden. Je weniger AS-Austausche zwischen einer genomischen und einer neu isolierten Sequenz vorlagen, und je höher die Wahrscheinlichkeit für einen gemeinsamen Ursprung der Sequenzen laut Genbaumanalyse war, desto wahrscheinlicher handelt es sich um ein Allel des jeweiligen Gens. Demzufolge kann angenommen werden, dass *Mamu-B*12* ein Allel des *h1B12*-Gens ist und die Sequenzen *Mamu-B*30* und *-B*3002* mit hoher Wahrscheinlichkeit Allele des *Mamu-B*-Gens *h1B15* sind. Einige der isolierten Sequenzen zeigten keine nähere Verwandtschaft mit einer genomischen MHC-Klasse-I-Sequenz. *Mamu-B*17*, *-B*21*, *-B*22*, *-B*48*, *-B*64*, *-B*69* und *-B-NEU* konnten keinem Gen des Haplotyps h1 zugeordnet werden. Entweder könnten sie sehr diverse Allele von Genen des h1-Haplotyps sein oder es handelt sich um Allele von Genen, die nicht im h1-Haplotyp vorkommen (Abb. 4.4c). Dies entspricht der Annahme von einem An- und Abwesenheitspolymorphismus der MHC-Klasse-I-Gen-Loci in dieser Region beim Rhesusaffen (Otting *et al.*, 2005).

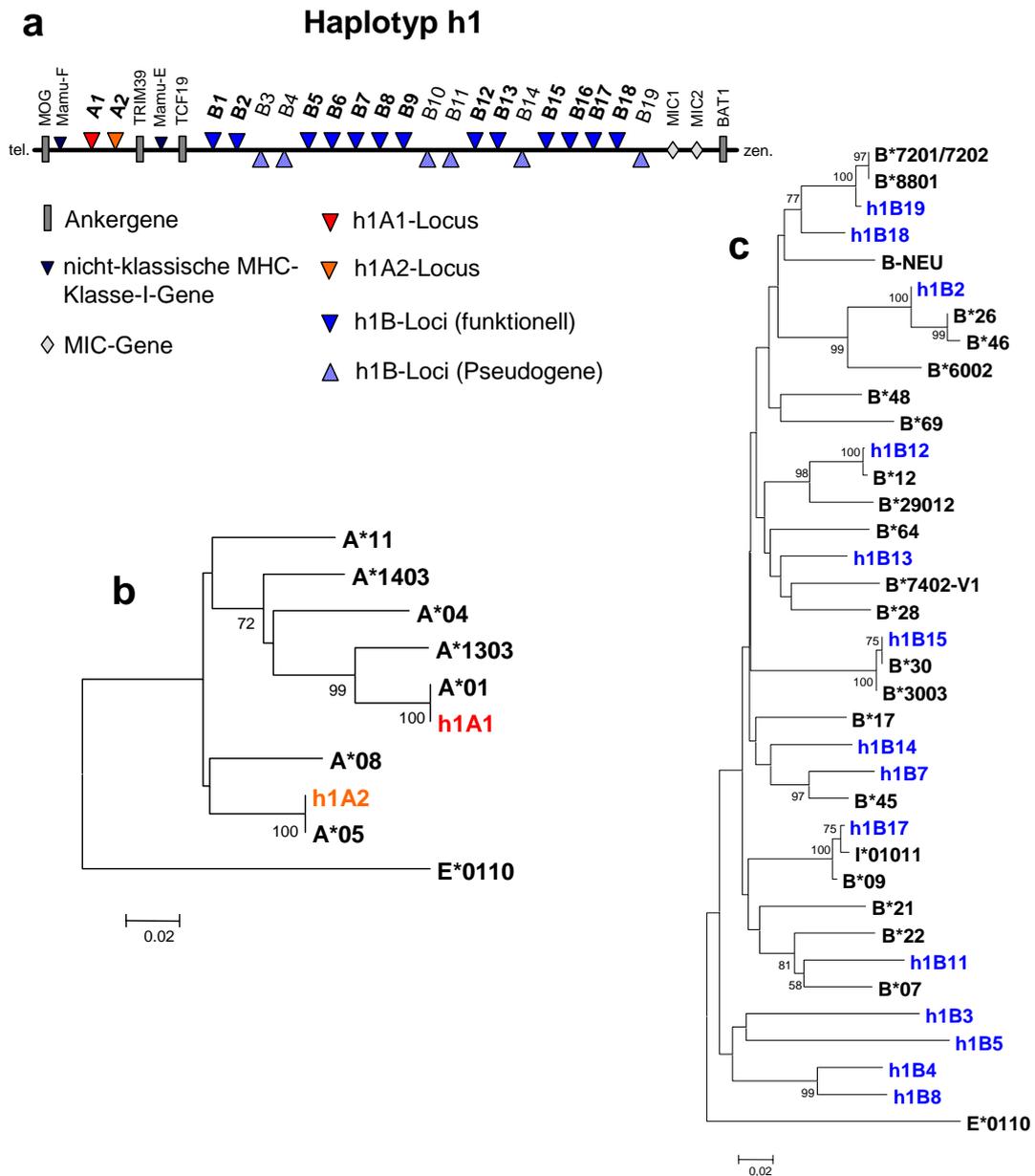


Abb. 4.4: Genomische Zuordnung der in der Arbeit isolierten Mamu-A- und Mamu-B / -I-Sequenzen.

(a) Schematische lineare Darstellung der genomischen MHC-Klasse-I-Region des Rhesusaffen vom Telomer (tel., links) zum Zentromer (zen., rechts) des sequenzierten Haplotyps h1 (Zugriffs-Nr.: AB128049). MHC-Klasse-I-Gen-Loci sind als Dreiecke dargestellt. Graue Dreiecke geben die nicht-klassischen MHC-Klasse-I-Gene *Mamu-F* und *-E* wieder. Ein rotes und ein orangefarbenes Dreieck stellen die *Mamu-A*-Gen-Loci *A1* und *A2* dar. Blaue Dreiecke stehen für die 19 *Mamu-B*-Gen-Loci. Schraffierte blaue Dreiecke zeigen einen unvollständigen Leserahmen an. Die Nummerierung der *Mamu-A*- und *Mamu-B*-Gen-Loci erfolgte jeweils innerhalb einer Region vom Telomer zum Zentromer hin. „Ankerogene“ wurden durch graue Rechtecke markiert und dienen der Orientierung im Genom. Die Gene *MIC1* und *MIC2* sind als graue Rauten dargestellt. Die phylogenetischen Bäume (b) und (c) basieren auf vollständigen AS-Sequenzen der Gene des Haplotyps h1 und der hier isolierten Sequenzen abzüglich der *leader*-Sequenz und der durch den 3'-Primer generierten AS. Gene mit unvollständigem Leserahmen und Varianten (*B*28-L*, *B-NEU-TM*) wurden nicht in die Auswertungen miteinbezogen. Die Bezeichnungen der hier isolierten Sequenzen (schwarz) entspricht Tab. 4.1. Die Farbgebung der *Mamu-A*- und *Mamu-B*-Sequenzen des Haplotyps h1 in Abb. b und c entspricht Abb. a. Die Berechnung der phylogenetischen Bäume erfolgte mit *MEGA 3.1* nach dem NeighborJoining-Verfahren mit 100000 Wiederholungen. (a) die isolierten Sequenzen *Mamu-A*01* und *Mamu-A*0504* konnten eindeutig dem *h1A1*- bzw. dem *h1A2*-Gen-Locus zugeordnet werden. (b) für *Mamu-B*-Sequenzen war dies nicht möglich; dennoch konnten einige Sequenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit als Allele eines Locus eingeordnet werden (z. B. *B*30* als Allel von *h1B15*). Andere, wie z. B. *B-NEU*, gehören vermutlich einem in diesem Haplotyp abwesenden Gen-Locus an. Zu berücksichtigen ist, dass die Sequenzbezeichnungen aus der NCBI-Datenbank in keinem Zusammenhang mit den Bezeichnungen der genomischen Sequenzen stehen.

4.2 Etablierung von Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Transfektanten in humanen Zellen

Die Expression der Mamu-A-, Mamu-B-, Mamu-I- und Mamu-E-AcGFP-Fusionsproteine erfolgte in der humanen Zelllinie K562. Diese Zelllinie exprimiert keine klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle und nur geringe Mengen an nicht-klassischen MHC-Klasse-I-Molekülen (Lozzio und Lozzio, 1979). Daher eignen sich diese Zellen gut zur Untersuchung der Expression von transfizierten MHC-Klasse-I-Genen.

Ausgewählte MHC-Klasse-I-Sequenzen wurden in den Vektor pAcGFP-N1 kloniert. Bei Aufrechterhaltung des Leserahmens konnten die MHC-Klasse-I-Proteine in Fusion mit dem AcGFP-Protein des Vektors abgelesen werden (Abb. 4.5). Linearisierte Plasmid-DNA von Mamu-A-, Mamu-B-, Mamu-I- und Mamu-E-AcGFP-Konstrukten wurde mit Hilfe von Lipofektion oder Elektroporation in K562-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden selektioniert bzw. angereichert und die Transfektionseffizienz kontrolliert (s. Kap. 3.2.3 bis Kap. 3.2.5).

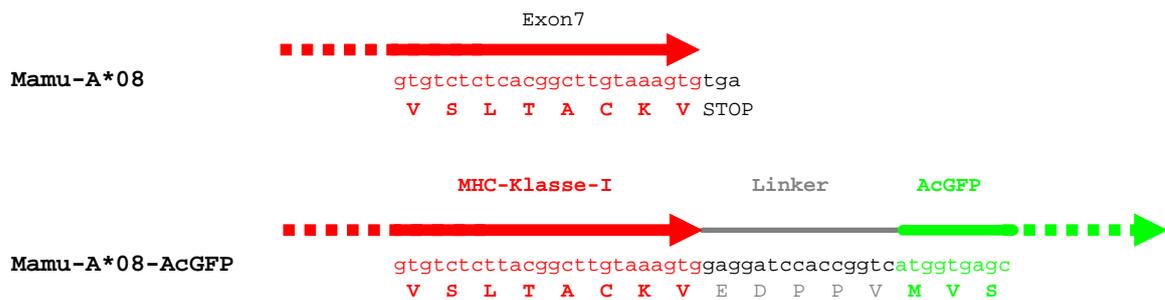


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der Herstellung von MHC-Klasse-I-AcGFP-Fusionsproteinen.

Anhand der Sequenz von *Mamu-A*08* ist beispielhaft die Generierung von MHC-Klasse-I-AcGFP-Fusionsproteinen dargestellt. Gezeigt ist das 3'-Ende der Originalsequenz von Exon 7 mit der daraus resultierenden AS-Sequenz (oben). Nach Klonierung in den Expressionsvektor pAcGFP-N1 mit Hilfe der konstruierten Oligonukleotide bleibt der offene Leserahmen erhalten und das MHC-Klasse-I-Protein kann in Fusion mit dem in der Vektorsequenz kodierten AcGFP abgelesen werden (unten).

Im Rahmen der Arbeit wurden fünf verschiedenen Mamu-A-, 13 Mamu-B-, ein Mamu-I- und ein Mamu-E-Konstrukt stabil in K562-Zellen transfiziert. Zur methodischen Kontrolle wurde zusätzlich ein humanes MHC-Klasse-I-Gen, für das strukturelle und funktionelle Daten vorliegen (Boyington *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2001), stabil in K562-Zellen transfiziert. (Tab. 4.3). Die Amplifikation eines *HLA-C*-Transkriptes gelang aus cDNA des Probanden 1 mit den Primern *HLA-C* GFPF und *HLA-C* GFPR in Anlehnung an die in Kapitel 4.1.1 beschriebene Isolation von MHC-Klasse-I-Transkripten des Rhesusaffen (vergl. Abb. 10.3). Die isolierte Sequenz konnte durch einen Vergleich mit der NCBI-Datenbank als *HLA-Cw*0303* (Zugriffs-Nr.: M99390) identifiziert werden.

Tab. 4.3: Etablierte MHC-Klasse-I-Transfektanten.

MHC-Klasse-I-Gen	Bezeichnung
Mamu-A	Mamu-A*01
	Mamu-A*08
	Mamu-A*11
	Mamu-A*1303
	Mamu-A*1403
Mamu-B	Mamu-B*09
	Mamu-B*12
	Mamu-B*17
	Mamu-B*28-L
	Mamu-B*28+L
	Mamu-B*3002
	Mamu-B*45
	Mamu-B*47
	Mamu-B*48
	Mamu-B*6002
	Mamu-B*64
	Mamu-B-NEU-TM
	Mamu-B-NEU+TM
Mamu-E	Mamu-E*0110
Mamu-I	Mamu-I*01011
HLA-C	HLA-Cw*0303

4.2.1 Analyse der Antigenbinderegion

Eine Analyse der Antigenbindestellen der etablierten Transfektanten sollte Hinweise auf deren funktionelle Eigenschaften liefern. Für MHC-Klasse-I-Moleküle sind die an der Antigenbindung beteiligten AS-Reste hinreichend bekannt (Bjorkman *et al.*, 1987; Saper *et al.*, 1991).

Phylogenetische Analysen wurden mit der gesamten AS-Sequenzen ohne die antigenbindenden AS-Reste der MHC-Klasse-I-Moleküle (Abb. 4.6a) sowie ausschließlich mit AS-Resten, die an der Antigenbindung beteiligt sind, durchgeführt (Abb. 4.6b). Als Gesamtsequenz wurde hier die AS-Sequenz der $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -Domäne, mit Transmembranregion und zytoplasmatischem Teil betrachtet. Die *leader*-Sequenzen wurden nicht in die Auswertungen miteinbezogen.

In die Analysen wurden die Sequenzen aller etablierten Mamu-A-, Mamu-B-, Mamu-E- und Mamu-I-Transfektanten und HLA-Sequenzen mit verschiedenen Bindeepitopen miteinbezogen (Barnstable *et al.*, 1978). Diese Epitope sind maßgeblich an der Rezeptorbindung beteiligt und können daher zur funktionellen Charakterisierung der in der Arbeit verwendeten Sequenzen beitragen. Als Vertreter des *HLA-C*-Gens wurde zum einen die aus Blut von

Proband 1 (s. Kap. 2.2) isolierte Sequenz *HLA-Cw*0303* des C1-Typs hinzugezogen. Zum anderen wurde als Vertreter des C2-Typs die Sequenz *HLA-Cw*0401* (Zugriffs-Nr.: M84386) ausgewählt. *HLA-Bw*53* (Zugriffs-Nr.: M58636) und *HLA-B*44* (Zugriffs-Nr.: AJ535113) tragen das Bw4⁺-Epitop und sind Allele des *HLA-B*-Gens. *HLA-B*1502* (Zugriffs-Nr.: D50293) und *HLA-A*68* (Zugriffs-Nr.: EF062994) sind Beispiele für *HLA-B*- bzw. *HLA-A*-Allele, die das Bw6⁺-Epitop tragen.

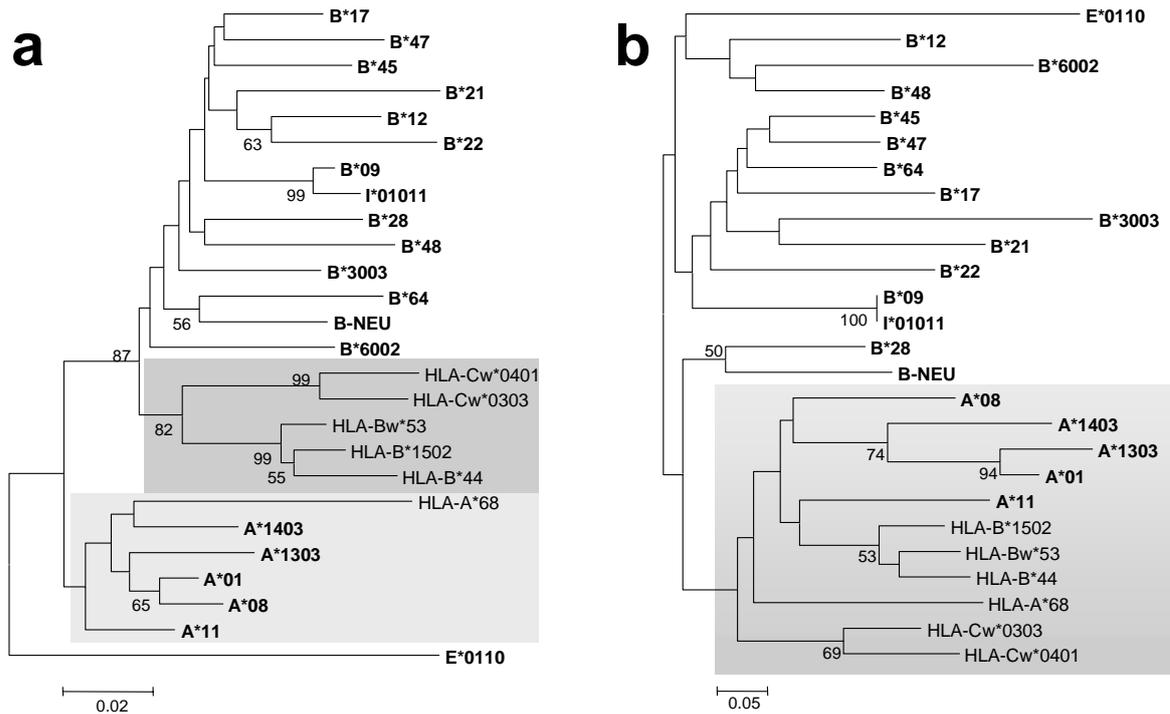


Abb. 4.6: Phylogenetische Analysen der Gesamtsequenz und der Antigenbinderegion.

Dargestellt ist ein phylogenetischer Baum der Gesamtsequenz (a) neben einem phylogenetischen Baum der an der Antigenbindung beteiligten AS-Reste (b). Die Gesamtsequenz umfasste die $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -Domänen, die TM-Region und den zytoplasmatischen Teil, abzüglich der durch den 3'-Primer vorgegebenen Sequenzen und den AS-Resten der Antigenbindung. Für die Erstellung des phylogenetischen Baums in Abbildung b wurden nur die AS-Reste der Antigenbindung verwendet. In die Auswertung wurden alle AS-Sequenzen der in dieser Arbeit etablierten MHC-Klasse-I-Transfektanten und *HLA*-Sequenzen mit unterschiedlichen Epitopen im Bereich der Antigenbinderegion einbezogen. Deletionsvarianten (*B*28-L*, *B-NEU-TM*) wurden nicht in die Auswertungen miteinbezogen. Die Bezeichnungen der Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Sequenzen entsprechen der Tab. 4.3. Unter den *HLA*-Sequenzen wurden Beispiele für den C1-Typ (*HLA-Cw*0303*), für den C2-Typ (*HLA-Cw*0401*) und für Sequenzen mit dem Bw4⁺- (*HLA-Bw*53*, *HLA-B*44* und *HLA-A*68*) und Bw6⁺-Epitop (*HLA-B*1502*) hinzugezogen. Die Berechnung der phylogenetischen Bäume erfolgte mit *MEGA 3.1* nach dem NeighborJoining-Verfahren mit 100000 Wiederholungen. (a) Die Analyse der Gesamtsequenz ohne die antigenbindenden AS-Reste gibt die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen der humanen und der Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Gen-Loci wieder. *Mamu-A*-Sequenzen bilden eine Gruppe mit dem Vertreter der *HLA-A*-Sequenzen des Menschen (hellgrau hinterlegt). Die humanen *HLA-B*- und *HLA-C*-Sequenzen bilden eine eigene Gruppe (dunkelgrau hinterlegt), ebenso die *Mamu-B*- und *Mamu-I*-Sequenzen. (b) Bei der Analyse der antigenbindenden AS-Reste zeigte sich, dass, bezüglich der Antigenbindung, *Mamu-A*-Sequenzen eine gemeinsame Gruppe mit den humanen Sequenzen bilden (hell- bis dunkelgrau hinterlegt). Die Sequenzen von *Mamu-B*28* und *-B-NEU* bilden wiederum eine Gruppe mit allen *Mamu-A*- und *HLA*-Sequenzen. Die restlichen *Mamu-B*- und *Mamu-I*-Sequenzen bilden eine eigene Gruppe.

Ohne die unter starker Selektion stehenden AS-Reste der Antigenbinderegion, gab die phylogenetische Betrachtung der Restsequenz die Verwandtschaft der *Mamu-A*-Gene mit den *HLA-A*-Genen (hellgrau hinterlegt) wieder. *HLA-B*- und *HLA-C*-Sequenzen bildeten eine eigene Gruppe (dunkelgrau), die sich jedoch zusammen mit den *Mamu-B*-Sequenzen von der *Mamu-A* / *HLA-A*-Gruppe abgrenzte (Abb. 4.6a). Im Gegensatz dazu lieferte die Analyse der antigenbindenden AS-Reste alleine ein völlig anderes Bild. Hier zeigten alle *Mamu-A*-Sequenzen mehr Gemeinsamkeiten mit den humanen Sequenzen (hell- bis dunkelgrau hinterlegt) als mit allen anderen *Mamu-B*-Sequenzen. Einzig *Mamu-B*28* und *Mamu-B-NEU* bilden eine gemeinsame Gruppe mit den *Mamu-A*- und *HLA-A*-Sequenzen und grenzen sich von den anderen *Mamu-B*-Sequenzen ab (Abb. 4.6b).

4.2.2 Immunoblot-Analysen der MHC-Klasse-I-Transfektanten

Die Expression aller MHC-Klasse-I-Fusionsproteine wurde im *Immunoblot* nachgewiesen, indem auch die Größenbestimmung des rekombinanten Proteins möglich war. Dazu standen Antikörper, gerichtet gegen beide Teile des Fusionsproteins, zur Verfügung. Zum einen ein anti-GFP-AK, zum anderen zwei anti-MHC-Klasse-I-AK (zur Verfügung gestellt von A. Ziegler, Humboldt-Universität, Berlin). Die anti-MHC-Klasse-I-Antikörper HC-10 und HC-A2 erkennen zwei unterschiedliche Epitope in der α 1-Domäne der schweren Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls unter denaturierenden Bedingungen. HC-10 bindet an das Epitop P₅₇XXW₆₀D₆₁R₆₂ und HC-A2 erkennt das Epitop xL₇₈xT₈₀L₈₁R₈₂G₈₃x (Sernee *et al.*, 1998; Stam *et al.*, 1986).

Die humanen HLA-Moleküle weisen einheitlich das HC-10-Epitop auf. Bei der Analyse des Bindebereiches der isolierten Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Moleküle (Abb. 4.7) zeigte sich, dass nur wenige das HC-10-Epitop besitzen. Dazu gehören alle *Mamu-A*-Sequenzen. Unter den übrigen Sequenzen befand sich eine Gruppe, die nur das HC-A2-Epitop exprimieren. Dazu gehören die Allele *Mamu-B*28(-L/+L)*, *-B*45*, *-B-NEU(-TM/+TM)* und *Mamu-E*0110*. Die übrigen Sequenzen zeigten weder das HC-10- noch das HC-A2-Epitop. Diese Moleküle ließen sich daher nur durch den anti-GFP-AK im *Immunoblot* nachweisen.

α -1-Domäne	HC-10	HC-A2
AS-Position	60	70
A*01	EGPEYWDR	ETRNMKTETQNAPVNLRTLLRYY
A*08	EGPEYWDR	NTRIYKAATQNYREGLQNLRGYY
A*11	EGPEYWDR	ETRISKANTQTYRENLRRTALRYY
A*1303	EGPEYWDR	ETQNMKTETQNAPVALRNLRGYY
A*1403	EGPEYWDR	ETRNMKTATQNPVALRNLLRYY
B*09	EGPEYWEE	ETRIAKARAQTERGNLRTALRYY
B*12	EGPEYWEE	QTRNAKANAQTDVSLGNLRRYY
B*17	EGPEYWEE	ATRRAKEAAQTHRENLRRTALRYY
B*28 (+L/-L)	EGPEYWED	VTRRAKARAQTDVRD
B*3002	EGPEYWEE	QTRNTEAHAQNHRVCLRTVPGYY
B*45	EGPEYWEE	QTRIDKANAQTHRGN
B*47	VGPEYWEE	QTRIAKGNAQTHRVDLRTLLRYY
B*48	EGPEYWEE	ETRIAEDAAQTFRVGLGILRGYY
B*6002	EGLEYWEE	QTLAKDFQSFVGLGNLRGYY
B*64	EGPEYWEE	QTRIAKARAQTDRADLGTLLRYY
B-NEU (+TM/-TM)	EGPEYWEE	QTRIVKDNAQTFRVGL
I*01011	EGPEYWEE	ETRIAKARAQTERGNLRTALRYY
E*0110	EGPEYWDQ	ETRSARATAQTFRVN
HLA-Cw*0303	EGPEYWDR	ETQKYKRQAQTDVSLRNLRGYY

Abb. 4.7: Identifikation der HC-10- und HC-A2-Epitope in den MHC-Klasse-I-Sequenzen der etablierten Transfektanten.

Darstellung der AS-Sequenzen von Position 55 - 85 in der α 1-Domäne aller etablierter Transfektanten. Die Auflistung erfolgte numerisch. Die AS-Reste des HC-10-Epitops sind jeweils blau hinterlegt, die des HC-A2-Epitops sind jeweils grün hinterlegt. Alle isolierten Mamu-A-Transfektanten enthalten in ihrer AS-Sequenz das HC-10-Epitop, jedoch nicht das HC-A2-Epitop. Die AS-Sequenzen der Mamu-B-Transfektanten enthalten entweder das HC-10-Epitop (*B*21*, *B*22*), das HC-A2-Epitop (*B*28(+L/-L)*, *B*45*, *B-NEU(+TM/-TM)*, *E*0110*) oder keines der beiden AK-Epitope (*B*09*, *B*12*, *B*17*, *B*3002*, *B*47*, *B*48*, *B*6002*, *B*64* und *I*01011*). Die humane Referenzsequenz *HLA-Cw*0303* enthält das HC-10-Epitop.

Beispielhaft sind in Abbildung 4.8 und 4.9 einige Nachweise der Expression von Transfektanten mit den verschiedenen anti-MHC-Klasse-I-Antikörpern gezeigt. Die Expression der MHC-Klasse-I-AcGFP-Fusionsproteine wurde für alle etablierten Transfektanten im *Immunoblot* kontrolliert (vergl. Abb. 10.4 und 10.5).

Bei Expression eines MHC-Klasse-I-Fusionsproteins mit allen Domänen wurde eine Größe von ca. 65 kDa erwartet. Dabei macht die schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls, bestehend aus α 1-, α 2-, α 3-Domäne, Transmembranregion und zytoplasmatischem Teil, ca. 38 kDa aus, während das AcGFP-Protein ca. 27 kDa groß ist. Einzig Mamu-B-NEU ohne Transmembranregion weist mit ca. 61 kDa eine abweichende Größe auf.

Abbildung 4.8 zeigt den Nachweis aller Mamu-A-AcGFP-Proteine im *Immunoblot* mit dem anti-GFP-AK (Abb. 4.8a) und mit dem anti-MHC-Klasse-I-AK HC-10 (Abb. 4.8b). Alle Mamu-A-Transfektanten exprimieren ein Protein von erwarteter Größe (ca. 65 kDa) und werden spezifisch durch den anti-GFP-AK erkannt (Abb. 4.8a). In Abbildung 4.8b ist dargestellt, dass Mamu-A-Moleküle spezifisch über das HC-10-Epitop im *Immunoblot* detektiert werden.

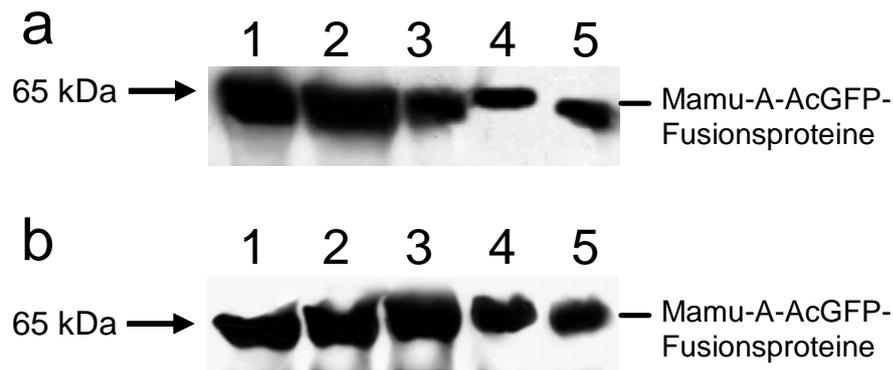


Abb. 4.8: Expressionskontrolle der Mamu-A-AcGFP-Fusionsproteine mit verschiedenen AK.

Immunoblot-Analysen mit Auftrennungen von 5×10^4 Zellen pro Spur auf einem 10 %igen SDS-Gel. *Blot (a)* wurde über Nacht bei 4°C mit dem monoklonalen anti-GFP-AK (1:5000), *Blot (b)* wurde über Nacht bei 4°C mit dem monoklonalen anti-MHC-Klasse-I-AK HC-10 (1:5) inkubiert. Beide *Blots* wurden anschließend 1 h mit dem polyklonalen HRP-gekoppelten IgG-AK inkubiert. Nach der ECL-Reaktion wurde der Röntgenfilm 30 s bzw. 15 s auf dem *Blot* entwickelt. Es wurden jeweils folgende Transfektanten aufgetragen: (1) MamuA*01, (2): Mamu-A*08, (3) Mamu-A*11, (4) Mamu-A*1303, (5) Mamu-A*1403. Alle fünf Mamu-A-Transfektanten zeigten auf beiden *Blots* Banden bei ca. 65 kDa. Die Fusionsproteine wurden sowohl von dem anti-GFP-AK (a), als auch von dem anti-MHC-Klasse-I-AK HC-10 erkannt (b).

Abbildung 4.9 zeigt die spezifische Erkennung der Fusionsproteine Mamu-B*28, ohne und mit *leader*-Sequenz, Mamu-B*45 und Mamu-B-NEU, ohne und mit Transmembranregion, durch den MHC-Klasse-I-AK HC-A2. Zur Kontrolle wurden in Spur 1 Zellen der Mamu-A*01-Transfektante aufgetragen. Dieses Molekül trägt das HC-10-Epitop, aber nicht das HC-A2-Epitop (s. Abb. 4.7). Der Antikörper erkennt nur MHC-Klasse-I-Proteine, die das entsprechende Epitop aufweisen (Spur 2 bis 6). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Mamu-B-NEU-TM im *Immunoblot*, durch das Fehlen der transmembranen Region, eine niedrigere Bande (ca. 61 kDa) als alle anderen Fusionsproteine hervorruft (Spur 5).



Abb. 4.9: Expressionskontrolle der Mamu-B-AcGFP-Fusionsproteine mit dem HC-A2-AK.

Immunoblot-Analysen mit Auftrennungen von 1×10^5 Zellen pro Spur auf 10 %igem SDS-Gelen. Die *Blots* wurden über Nacht mit dem monoklonalen anti-MHC-Klasse-I-AK HC-A2 (1:5) und anschließend 1 h mit dem polyklonalen HRP-gekoppelten IgG-AK inkubiert. Nach der ECL-Reaktion wurden die Röntgenfilme jeweils 1 min auf dem *Blot* entwickelt. Die Abbildung zeigt die Auftragung von sechs verschiedenen Transfektanten auf drei verschiedenen *Blots*. (1) Mamu-A*01, (2) Mamu-B*28-L, (3) Mamu-B*28+L, (4) Mamu-B*45, (5) Mamu-B-Neu-TM, (6) Mamu-B-NEU+TM. Mamu-A*01 wird von dem Antikörper nicht erkannt (Spur 1), die Transfektanten MamuB*28 (-L/+L), -B*45 und -B-NEU(-TM/+TM) tragen das HC-A2-Epitop (s. 4.7) und werden von dem Antikörper erkannt. Es tritt eine charakteristische Bande bei 65 kDa auf. Die um den Transmembranteil verkürzte Variante von Mamu-B-NEU (Spur 5) zeigt im *Blot* eine Bande bei 61 kDa.

4.2.3 Analyse der subzellulären Lokalisation von MHC-Klasse-I-Molekülen des Rhesusaffen

Zur funktionellen Charakterisierung von MHC-Klasse-I-Molekülen des Rhesusaffen wurden Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von MHC-Klasse-I-AcGFP-Fusionsproteinen in K562-Zellen vorgenommen. Die Expressionsstärke auf der Zellmembran und die intrazelluläre Lokalisation der MHC-Klasse-I-Moleküle kann dabei Hinweise auf einen klassischen oder nicht-klassischen Charakter der Moleküle liefern (s. Kap. 1.2.2.1). So konnten Untersuchungen humaner MHC-Klasse-I-Moleküle zeigen, dass klassische HLA-Moleküle auch nach Transfektion in humane Zellen auf der Oberfläche exprimiert werden (Barakonyi *et al.*, 2004). Nicht-klassische HLA-Moleküle weisen dagegen andere Expressionsmuster auf. HLA-E-Oberflächenexpression findet beispielsweise weitgehend nur in Zusammenhang mit *leader*-Peptiden der klassischen HLA-Moleküle statt (Lee *et al.*, 1998). HLA-F-Expression wurde nahezu nur intrazellulär nachgewiesen (Lee und Geraghty, 2003). HLA-G hat eine eingeschränkte Gewebeverteilung und die Expression während einer Schwangerschaft kann die Abstoßung des Fötus durch das mütterliche Immunsystem verhindern (Le Bouteiller und Mallet, 1997).

Die etablierten Transfektanten wurden zum einen mit Hilfe eines konfokalen Laserscanmikroskops (LSM, s. Kap. 3.2.11) und zum anderen durchflusszytometrisch analysiert (s. Kap. 3.2.8). Am LSM konnten anhand der Fluoreszenz des AcGFP-Anteils die Mamu-A-, Mamu-B-, Mamu-I- und Mamu-E-AcGFP-Fusionsproteine in den Zellen lokalisiert werden. Die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression wurde zusätzlich mit Hilfe des mAK W6/32 sichtbar gemacht (s. Kap. 3.2.11.3). Bei Oberflächenexpression der rekombinanten MHC-Klasse-I-AcGFP-Moleküle sollte es bei Anregung mit dem Helium / Neon-Laser ($\lambda = 543$ und 633 nm) nach AK-Markierung zu einer ringförmigen roten Anfärbung der Zellmembran kommen. Die Anregung durch den Argon-Laser ($\lambda = 488$ nm) sollte ein deckungsgleiches grünes Bild durch den intrazellulären AcGFP-Anteil des Fusionsproteins liefern. In Abbildungen, in denen beide Aufnahmen übereinander gelegt wurden, sollte die Oberflächenexpression der MHC-Klasse-I-AcGFP-Proteine durch eine ringförmige gelbe Anfärbung der Zellmembran wiedergegeben werden. Demgegenüber wurde für die AcGFP-Kontrolltransfektante keine MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche, aber eine starke zytoplasmatische AcGFP-Expression erwartet (Abb. 4.10 - 4.12).

Parallel zu LSM-Aufnahmen wurden mit allen Transfektanten FACS-Analysen durchgeführt. Auch hier wurden die Zellen mit dem mAK W6/32 markiert (s. Kap. 3.2.8.1). Am

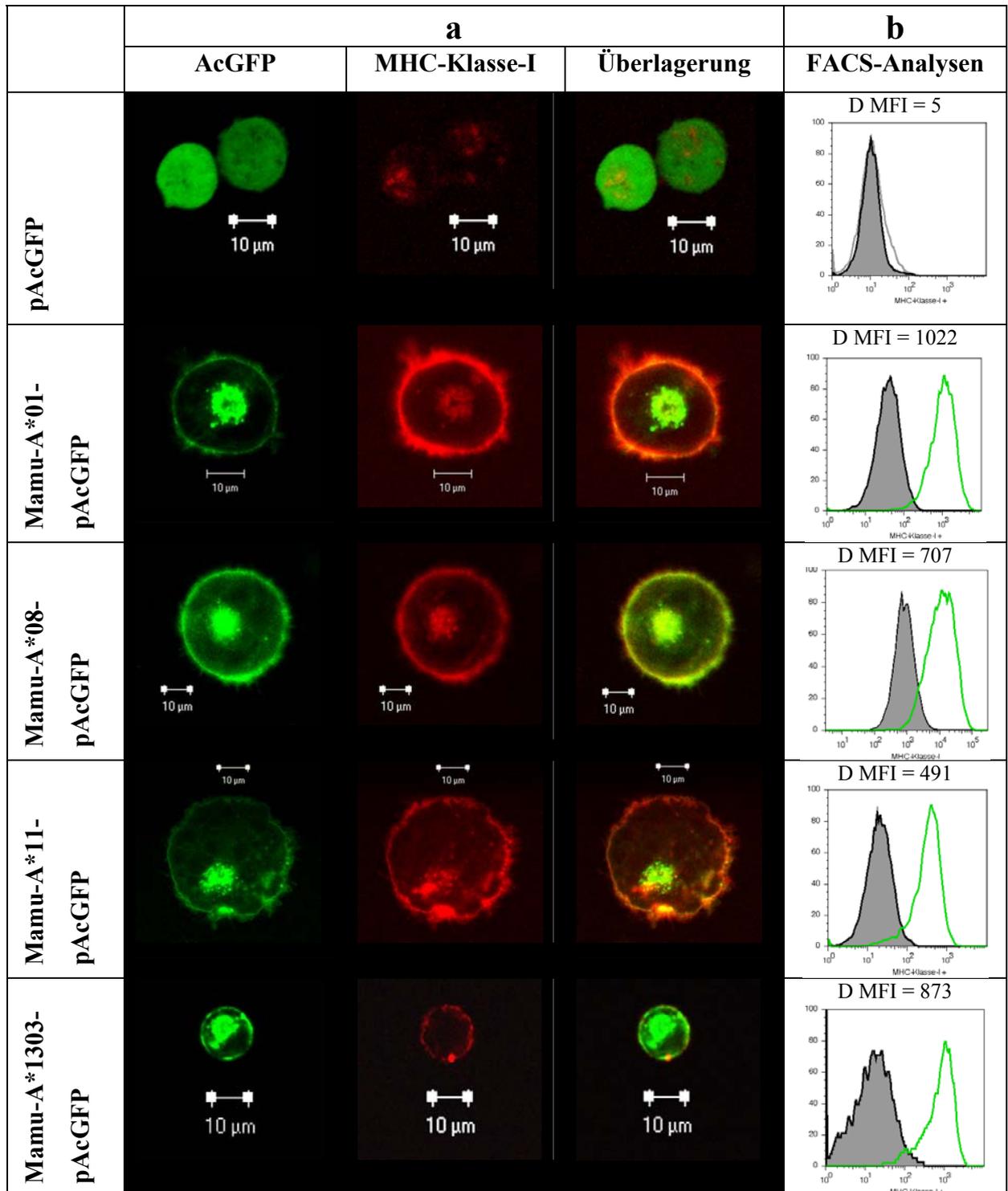
Durchflusszytometer wurden die mittleren Fluoreszenzstärken (MFI) der Transfektanten bestimmt und in den Auswertungen als Histogramme dargestellt. Als basale MHC-Klasse-I-Expression wurde jeweils die MFI der MHC-Klasse-I-negativen AcGFP-Kontrolltransfektante in die Analysen miteinbezogen (schwarze Kurve). Die Zunahme der MFI-Werte der einzelnen Transfektanten gegenüber der Kontrolltransfektante, berechnet durch die Differenz der beiden MFI-Werte (D MFI), korreliert mit der Zunahme der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression, wobei Unterschiede in der Expressionsstärke durch den potenzierenden Effekt der Verwendung eines sekundären Antikörpers stärker hervortreten.

Die erste histographische Darstellung der Abbildungen 4.10 bis 4.12 gibt jeweils einen Vergleich der MFI-Werte der untransfizierten K562-Zellen und der AcGFP-Kontrolltransfektante wieder und zeigt, dass die AcGFP-Kontrolltransfektante eine, den untransfizierten Zellen entsprechende, niedrige MHC-Klasse-I-Expression aufwies (D MFI = 5).

Alle Mamu-A-Transfektanten zeigten in LSM-Aufnahmen im Bereich der Zellmembran eine ringförmige Expression. Auch die MHC-Klasse-I-AK-Markierung (rot dargestellt) wies eine ringförmige Struktur auf. Bei Überlagerung der beiden Aufnahmen, wiesen alle Transfektanten eine gelbe Färbung der ringförmigen Struktur auf (Abb. 4.10a). Dies zeigte eine hohe MHC-Klasse-I-Expression auf der Oberfläche der entsprechenden transfizierten Zellen an.

Neben den Einzelzellanalysen der MHC-Klasse-I-Expression am LSM konnten durch durchflusszytometrische Untersuchungen der Transfektanten die durchschnittlichen Erhöhungen der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpressionen gegenüber der AcGFP-Kontrolltransfektante anhand der Differenz der beiden MFI-Werte ($D = MFI$) bestimmt werden (Abb. 4.10b). Die stärkste Oberflächenexpression wies dabei Mamu-A*01, mit einem D MFI-Wert von 1022, auf. Mamu-A*08, Mamu-A*11 und Mamu-A*1303 zeigten ebenfalls starke MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche mit D MFI-Werten von 707, 491 bzw. 873. Die schwächste Oberflächenexpression wies Mamu-A*1403 mit einem D MFI-Wert von 198 auf.

Zusammenfassend konnte für Mamu-A-Transfektanten, sowohl durch Aufnahmen einzelner transfizierter Zellen, als auch durch Untersuchungen der gesamten Zellpopulationen am Durchflusszytometer, gezeigt werden, dass die rekombinanten Mamu-A-AcGFP-Moleküle in K562-Zellen stark auf der Zelloberfläche exprimiert werden.



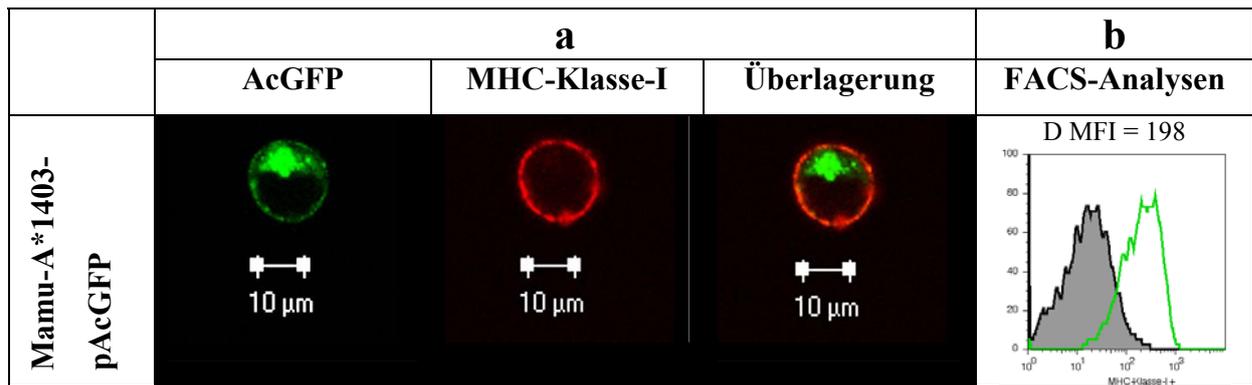


Abb. 4.10: Subzelluläre Lokalisation der Mamu-A-AcGFP-Fusionsproteine.

(a) Aufnahmen der Expression der MHC-Klasse-I-AcGFP-Fusionsproteine in K562-Zellen am LSM. Die erste Aufnahme zeigt jeweils die Expression der Fusionsproteine anhand des AcGFP-Anteils, die zweite die MHC-Klasse-I-Oberflächenmarkierung durch mAK W6/32. Die dritte Abbildung gibt die Überlagerung der beiden Aufnahmen wieder. Alle Mamu-A-Transfektanten zeigten eine ringförmige Färbung im Bereich der Zellmembran in allen drei Darstellungen. (b) FACS-Analysen der MHC-Klasse-I-Transfektanten mit mAK W6/32 und RPE-Cy5-gekoppeltem pAK Ziege anti-Maus IgG. In die Analysen wurden nur lebende, AcGFP-positive Zellen einbezogen und jeweils 3×10^4 Ereignisse aufgezeichnet. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der einzelnen Proben sind als Histogramme dargestellt. Die erste Abbildung zeigt einen Vergleich der AcGFP-Kontrolltransfektante (grau hinterlegt) mit untransfizierten K562-Zellen (grau). Die Differenz der beiden MFI-Werte ist gering (D MFI = 5) und belegt damit, dass die AcGFP-Kontrolltransfektante wie untransfizierte K562-Zellen kaum MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche exprimiert. Die grünen Kurven der folgenden Abbildungen geben die MFI-Werte der einzelnen MHC-Klasse-I-Transfektanten wieder. Als Referenzwert ist die AcGFP-Kontrolltransfektante durch eine grau hinterlegte Kurve in jede Einzelabbildung eingefügt. Die Differenzen der beiden MFI-Werte (D MFI) sind über dem Histogrammen angegeben. Die Messung der einzelnen Transfektanten erfolgte in unterschiedlichen Experimenten. Alle Mamu-A-Transfektanten zeigten gegenüber der AcGFP-Kontrolltransfektante eine deutlich erhöhte MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression.

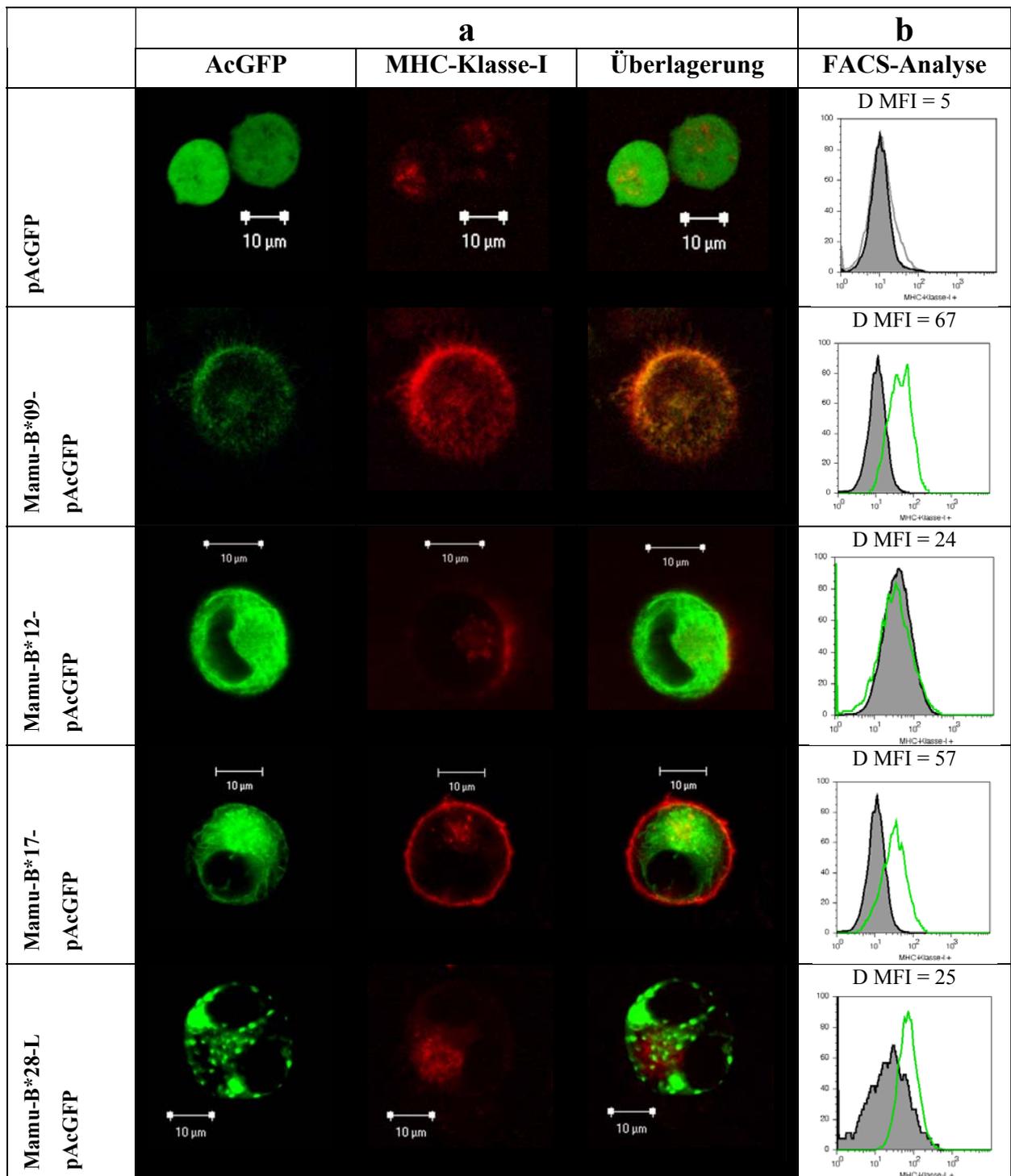
Entsprechend den Mamu-A-Transfektanten wurden auch die Mamu-B-Transfektanten auf Einzelzellebene am LSM und auf Zellpopulationsebene am Durchflusszytometer untersucht (Abb. 4.11). Die LSM-Aufnahmen einzelner Mamu-B-transfizierter Zellen zeigten anhand des AcGFP-Anteils der Fusionsproteine sehr unterschiedliche Expressionsmuster.

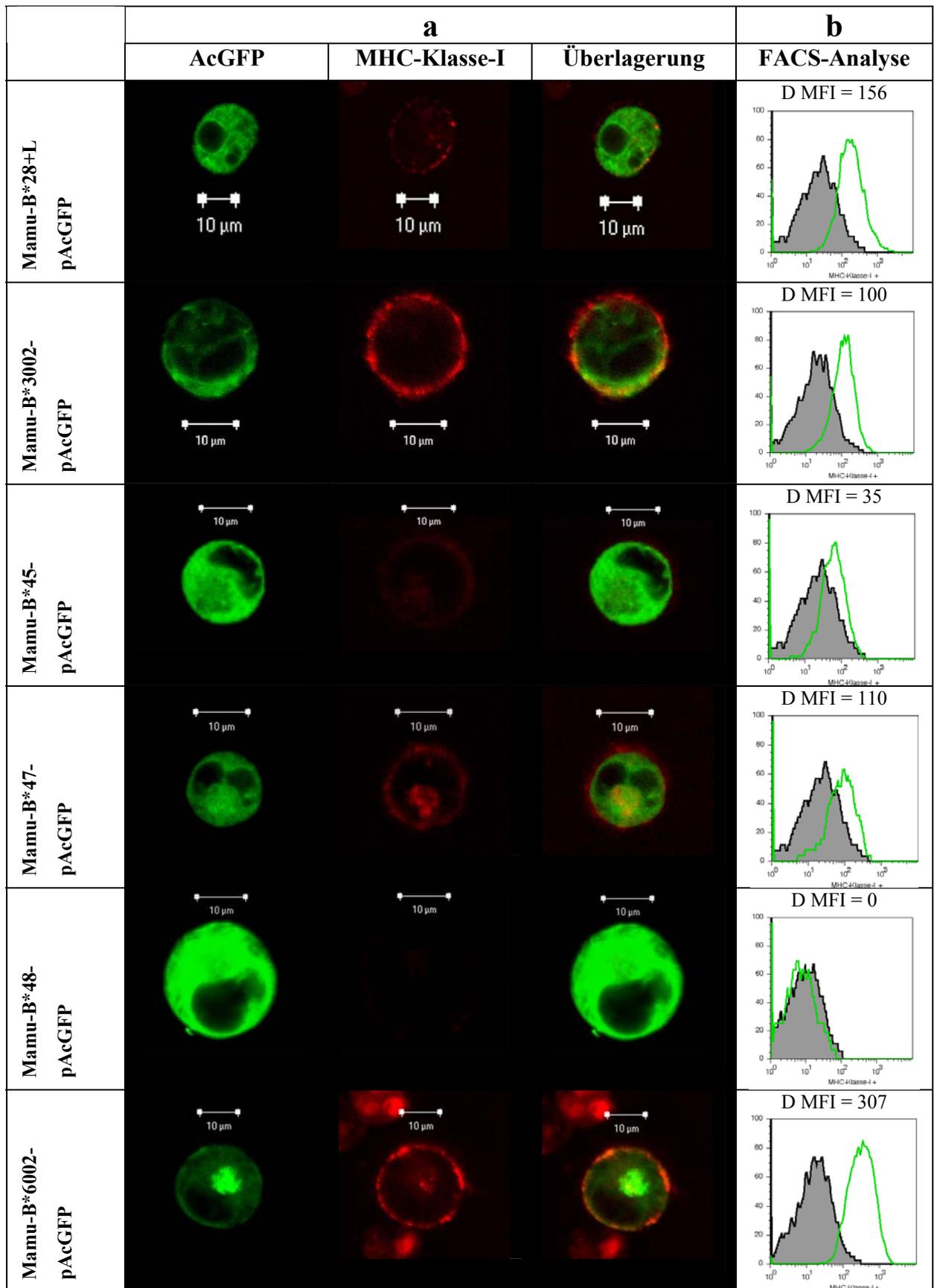
Einige Transfektanten wiesen, ähnlich wie die Mamu-A-Transfektanten, eine ringförmige Expression im Bereich der Zellmembran auf (Mamu-B*28+L, -B*6002 und -B-NEU+TM). Die AK-Markierung an der Zelloberfläche demonstrierten sowohl bei den LSM-Aufnahmen als auch bei FACS-Analysen, dass diese Transfektanten eine starke MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression aufwiesen (D MFI-Werte von 156, 307 und 531).

Alle anderen Mamu-B-Transfektanten waren durch eine diffuse Verteilung der MHC-Klasse-I-AcGFP-Expression charakterisiert. Unter diesen Mamu-B-Transfektanten konnten dennoch einige an der Zelloberfläche mit dem MHC-Klasse-I-AK markiert werden (Mamu-B*17, -B*09, -B*3002, -B*47 und -B*64). Zum Teil deckten sich die Färbungen durch AK-Markierungen im Bereich der Zellmembran auch mit der Grünfluoreszenz (gelbe Färbung in den Überlagerungen der beiden Aufnahmen). Die durchflusszytometrischen Analysen auf

Zellpopulationsebene zeigten mit D MFI-Werten zwischen 57 und 133 ebenfalls eine schwache MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression an.

Eine zweite Gruppe der Mamu-B-Transfektanten mit intrazellulärer Expression umfasste die Transfektanten Mamu-B*12, -B*28-L, -B*45 und -B-NEU-TM. Die LSM-Aufnahmen nach MHC-Klasse-I-AK-Markierung konnten nahezu keine Anfärbungen abbilden. Dementsprechend konnten die FACS-Analysen keine oder nur sehr geringe MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche aufzeigen (D MFI-Werte zwischen 0 und 35).





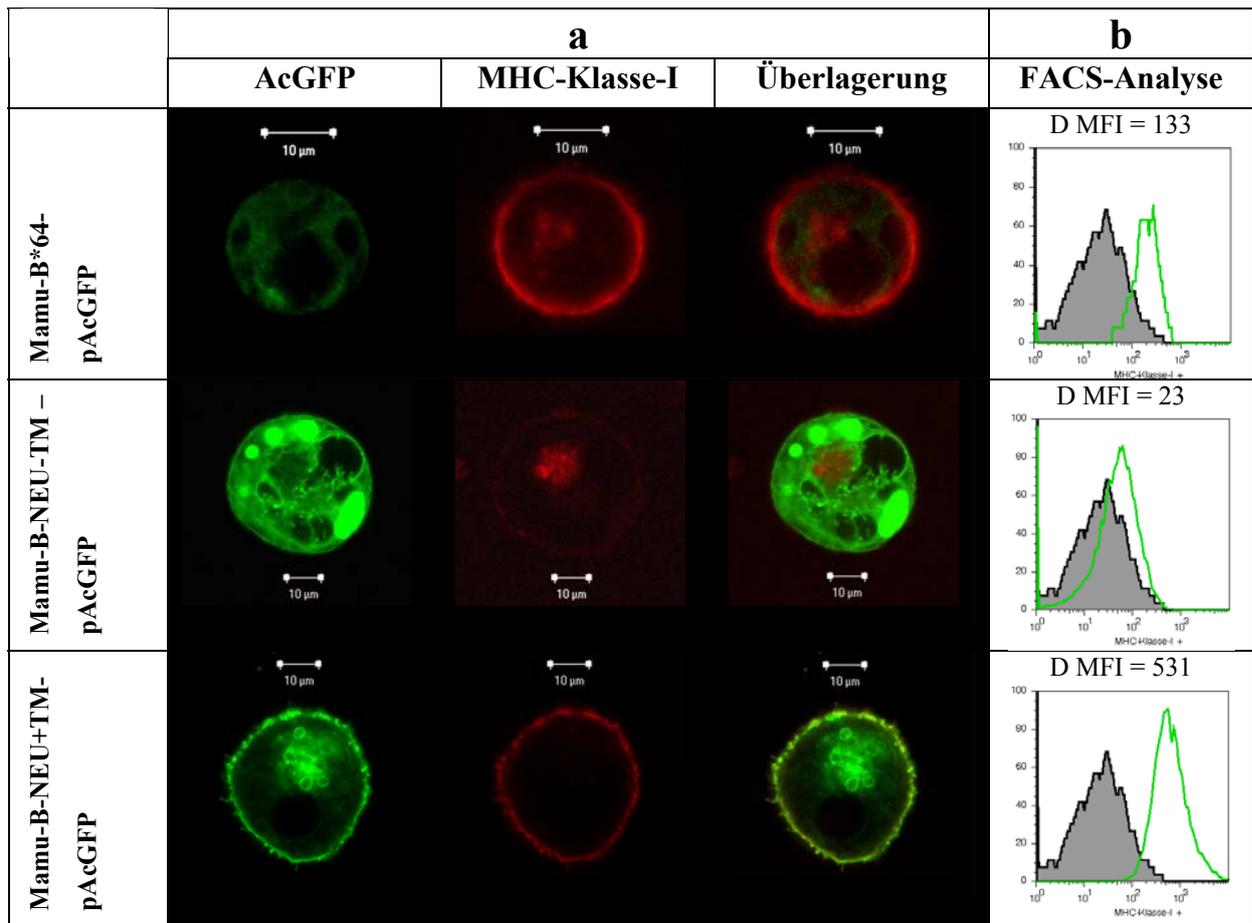


Abb. 4.11: Subzelluläre Lokalisation der Mamu-B-AcGFP-Fusionsproteine.

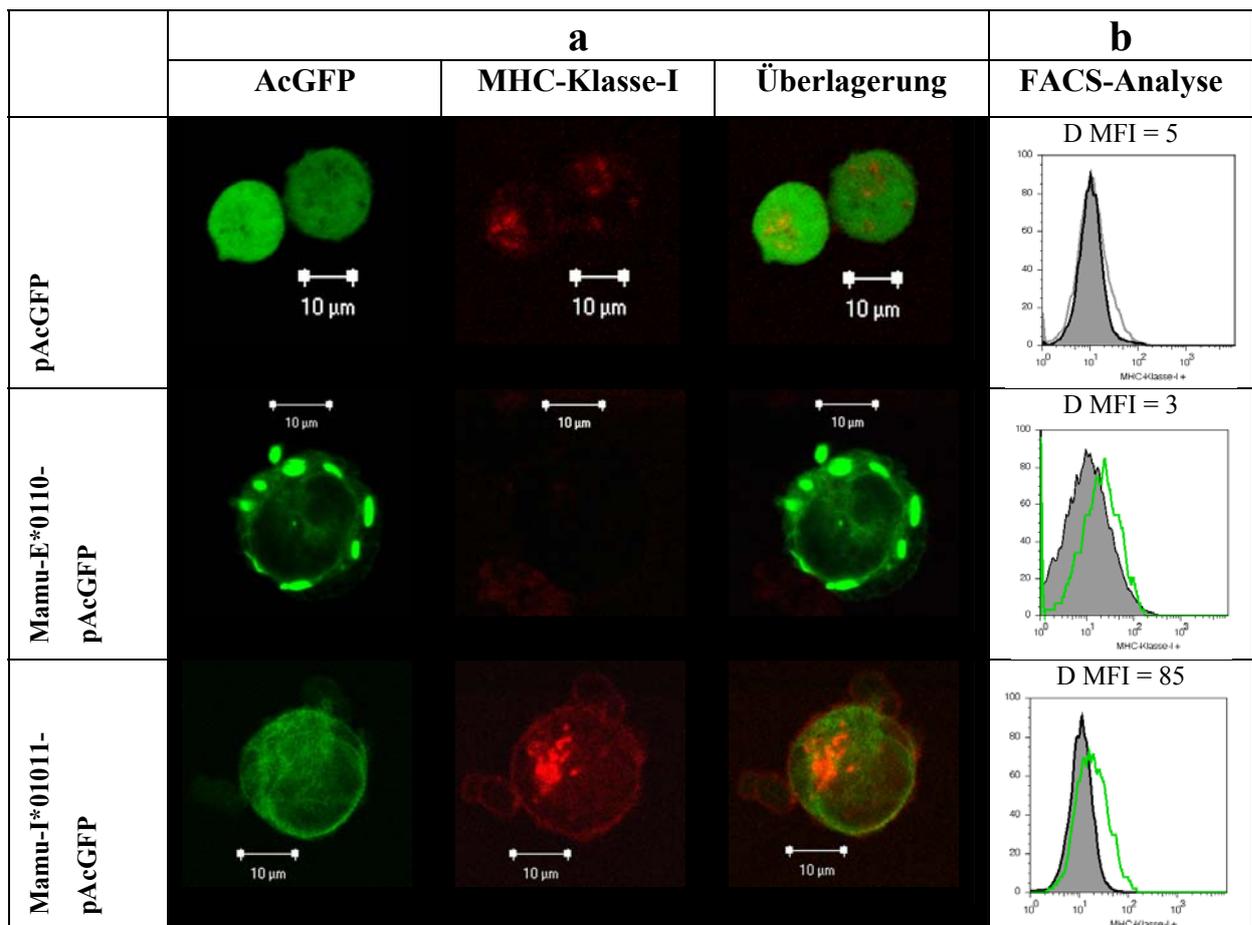
Zur Versuchsdurchführung und Abbildungserläuterung siehe Abbildung 4.10. (a) LSM Aufnahmen zeigten für Mamu-B-AcGFP-Fusionsproteine in K562-Zellen unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen. Für die Transfektanten Mamu-B*28+L, -B*6002 und -B-NEU+TM konnte kaum intrazelluläre, aber starke MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nachgewiesen werden. Die Transfektanten Mamu-B*17, -B*09, -B*3002, -B*47 und -B*64 wiesen neben einer mehr intrazellulären Expression nur eine schwache MHC-Klasse-I-AK-Markierung auf der Zelloberfläche auf. Für die Transfektanten Mamu-B*12, -B*28-L, -B*45 und -B-NEU-TM ließen sich neben intrazellulären Expressionen nahezu keine MHC-Klasse-I-Oberflächenexpressionen darstellen. (b) Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten für die Transfektanten Mamu-B*28+L, -B*6002 und -B-NEU+TM starke MHC-Klasse-I-Expression mit einer Zunahme der MFI-Werte zwischen 156 und 307 gegenüber der AcGFP-Kontrolltransfektante. Mamu-B*17, -B*09, -B*3002, -B*47 und -B*64 wiesen ebenfalls eine Zunahme MFI-Werte (D MFI = 57 - 133) auf, wohingegen für die Transfektanten Mamu-B*12, -B*28-L, -B*45 und -B-NEU-TM kaum eine Zunahme zu verzeichnen war (D MFI = 0 - 35).

In Abbildung 4.12 wurden die Auswertungen für die Transfektanten Mamu-E*0110, -I*01011 und für die Kontrolltransfektante HLA-Cw*0303 zusammengefasst.

Mamu-E*0110 wurde als Vertreter der nicht-klassischen MHC-Klasse-I-Gene mit in die Analysen einbezogen. Die LSM-Aufnahmen einzelner transfizierter Zellen konnten für Mamu-E*0110-Transfektanten eine intrazelluläre AcGFP-Expression mit einzelnen Ansammlungen, aber keine nachweisbare MHC-Klasse-I-AK-Markierung auf der Zelloberfläche darstellen. Auch die durchflusszytometrischen Analysen bestätigten mit einem D MFI-Wert von 3, dass die Mamu-E*0110-AcGFP-Fusionsproteine nicht auf der Zelloberfläche der transfizierten K562-Zellen exprimiert wurden.

Mamu-I*01011 zeichnete sich ebenfalls durch eine intrazelluläre AcGFP-Expression aus. Mit Hilfe der AK-Markierung konnte jedoch eine schwache MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression sowohl bei LSM-Aufnahmen als auch in FACS-Analysen (D MFI = 85) detektiert werden.

Die Transfektante HLA-Cw*0303 wurde als Positivkontrolle mit in die Analysen einbezogen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass MHC-Klasse-I-defiziente Zelllinien nach einer Transfektion mit HLA-C-cDNA-Konstrukten eine starke MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression aufweisen (Barakonyi *et al.*, 2004; Winter und Long, 1997). Auch in dieser Arbeit bestätigten die LSM-Aufnahmen, mit einer ringförmigen Anfärbung nach AK-Markierung mit W6/32, die Fähigkeit von HLA-C-transfizierten K562-Zellen zur MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (Abb. 4.12a). Dies konnte zusätzlich durch die Analysen am Durchflusszytometer bestätigt werden (Abb. 4.12b). Die HLA-Cw*0303-Transfektante zeigte eine Erhöhung des MFI-Wertes gegenüber der AcGFP-Kontrolltransfektante um 1150.



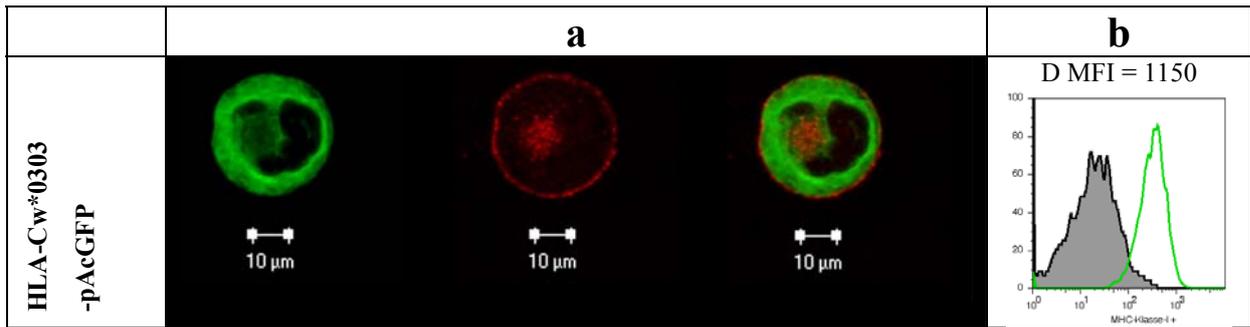


Abb. 4.12: Subzelluläre Lokalisation der Mamu-I-, Mamu-E- und HLA-C-AcGFP-Fusionsproteine.

Zur Versuchsdurchführung und Abbildungserläuterung siehe Abbildung 4.10. (a) Die Mamu-E*0110-Transfektante zeigte in LSM-Aufnahmen eine intrazelluläre Expression und keine MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nach AK-Markierung. Die Mamu-I-Transfektante wies ebenfalls eine intrazelluläre Expression, aber eine schwache MHC-Klasse-I-AK-Markierung auf. Dem gegenüber konnte für die HLA-Cw*0303-Transfektante neben intrazellulärer Expression auch eine deutliche MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression durch AK-Markierung nachgewiesen werden. (b) Für Mamu-E*0110 konnte bei durchflusszytometrischen Analysen keine Zunahme der MFI durch MHC-Klasse-I-Oberflächenmarkierung dargestellt werden (D MFI = 3) und Mamu-I*01011 zeigte nur eine schwache Zunahme mit einem D MFI-Wert von 85. Die Positivkontrolle HLA-Cw*0303 wies dagegen eine starke MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche auf (D MFI = 1150).

Die hier untersuchten MHC-Klasse-I-Gene der Rhesusaffen zeichneten sich nach Transfektion in K562-Zellen durch sehr unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen der rekombinanten MHC-Klasse-I-AcGFP-Proteine aus. Dabei zeigten Aufnahmen von transfizierten Einzelzellen und durchflusszytometrische Analysen der gesamten Zellpopulation der Transfektanten jeweils die gleichen Tendenzen bezüglich der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression.

Alle Mamu-A-Transfektanten wiesen einheitlich eine starke MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche auf (s. Abb. 4.10). Die Mamu-B-Transfektanten zeigten sehr hohe Variabilitäten der Expression der rekombinanten MHC-Klasse-I-AcGFP-Proteine. Für die Transfektanten Mamu-B*28+L, -B*6002 und -B-NEU+TM konnte, ähnlich wie für die Mamu-A-Transfektanten, eine starke Oberflächenexpression der rekombinanten Mamu-B-Moleküle dargestellt werden. Transfektanten einer zweiten Gruppe (Mamu-B*17, -B*09, -B*3002, -B*47 und -B*64) wiesen eine weitgehend intrazelluläre Expression, dargestellt in LSM-Aufnahmen, auf. Jedoch konnte für die Transfektanten eine deutliche MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nachgewiesen werden. Eine dritte Gruppe umfasste die Transfektanten Mamu-B*12, -B*28-L, -B*45 und -B-NEU-TM. Sie zeichneten sich ebenfalls durch eine weitgehend intrazelluläre Expression des MHC-Klasse-I-AcGFP-Proteins aus, zeigten allerdings nach AK-Markierung mit W6/32 sowohl bei Einzelaufnahmen am LSM als auch in FACS-Analysen nahezu keine MHC-Klasse-I-Expression an der Zelloberfläche (s. Abb. 4.11). Die Mamu-E*0110-Transfektante als Vertreter eines nicht-klassischen MHC-Klasse-I-Moleküls zeichnete sich durch eine rein intrazelluläre Expression des

Mamu E*0110-AcGFP-Fusionsproteins aus. Für die Transfektante Mamu-I*01011 konnte dagegen eine schwach Oberflächenexpression nachgewiesen werden. Als Positivbeispiel einer starken MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche wurde zusätzlich die HLA-Cw*0303-Transfektante in die Auswertung miteinbezogen (s. Abb. 4.12).

4.2.4 Vergleich der Analysen der Antigenbinderegionen mit den Ergebnissen zur subzellulären Lokalisation

Da die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen stark von der Bindung des passenden Peptids abhängen kann (Townsend *et al.*, 1989), wurden die in Kapitel 4.2.1 durchgeführten Analysen der Antigenbinderegion im Folgenden mit den Ergebnissen der subzellulären Lokalisation in Zusammenhang gebracht (Abb. 4.13). Dazu wurden die etablierten Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Transfektanten in drei Gruppen nach der Stärke ihrer MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche eingeteilt. Für die Transfektanten der in Abbildung 4.13 rot abgebildeten Sequenzen wurde eine vergleichsweise starke Oberflächenexpression festgestellt. Transfektanten der dunkelblau abgebildeten Sequenzen wiesen eine schwache und Transfektanten der hellblau dargestellten Sequenzen nahezu keine MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression auf. Bei dieser vergleichenden Analyse zeigte sich, dass neben den *Mamu-A*-Sequenzen auch die Sequenzen der stark auf der Oberfläche exprimierten Moleküle Mamu-B*28 und Mamu-B-NEU+TM in ihrer Antigenbinderegion mehr den *HLA*-Sequenzen gleichen, als den Sequenzen aller anderen verwendeten Transfektanten. Die Sequenzen der schwach auf der Zelloberfläche exprimierten und der rein intrazellulär exprimierten MHC-Klasse-I-Moleküle formen bei dieser Analyse eine eigene Gruppe. Einzige Ausnahme in dieser Einteilung bildet Mamu-B*6002. Trotz starker Oberflächenexpression haben die AS-Reste der Antigenbinderegion mehr Ähnlichkeiten mit den Sequenzen der schwach und intrazellulär exprimierten MHC-Klasse-I-Moleküle, als mit den Sequenzen der stark auf der Oberfläche exprimierten Molekülen.

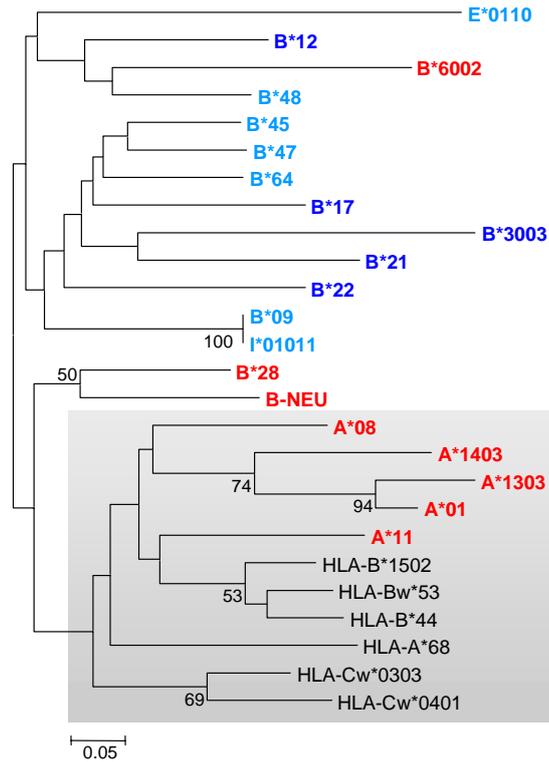


Abb. 4.13: Phylogenetische Analyse der Antigenbinderegion.

Dargestellt ist der phylogenetische Baum aus Abbildung 4.6b, der die AS-Reste, die an der Antigenbindung beteiligt sind, vergleicht. Sequenzen der Transfektanten, die eine starke MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche aufwiesen sind rot dargestellt. Sequenzen der Transfektanten mit schwacher MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression sind dunkelblau, Sequenzen der Transfektanten ohne Oberflächenexpression sind hellblau dargestellt. Abgesehen von Mamu-B*6002 konnte für alle Transfektanten, deren Sequenz in der Antigenbinderegion mehr den *HLA*-Sequenzen ähnelt, eine starke MHC-Klasse-I-Expression auf der Oberfläche von K562-Zellen festgestellt werden. Alle Transfektanten mit schwacher Oberflächenexpression oder rein intrazellulärer Expression bilden in der phylogenetischen Analyse der Antigenbinderegion eine separate Gruppe.

4.2.5 Detail-Analyse ungewöhnlicher MHC-Klasse-I-Transkripte des Rhesusaffen

Bei der Gewinnung von MHC-Klasse-I-Sequenzen des Rhesusaffen aus cDNA wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Transkripte mit ungewöhnlicher Struktur isoliert. Einmalige Artefakte wurden wie bereits beschrieben dadurch ausgeschlossen, dass nur solche Transkripte mit in die Analysen einbezogen wurden, die mindestens dreimal sequenzidentisch aus cDNA verschiedener Rhesusaffen isoliert wurden.

Eines dieser ungewöhnlichen Transkripte war in seiner Sequenz nahezu identisch mit der Sequenz des als *Mamu-B*28* identifizierten Transkripts (s. Kap. 4.1.2.2). Ihr fehlte jedoch der gesamte Sequenzanteil, der für die *leader*-Region kodiert. Beide Varianten von *Mamu-B*28* waren zu 99 % identisch mit einer bei der NCBI-Datenbank veröffentlichten *Mamu-B*28*-Sequenz mit der Zugriffs-Nr. AJ556883 (Otting *et al.*, 2005). Daher wurden die hier isolierten

Sequenzen mit *Mamu-B*28+L* und *Mamu-B*28-L* bezeichnet. Ein Sequenzvergleich der beiden isolierten Varianten von *Mamu-B*28* mit der bei NCBI veröffentlichten Referenzsequenz zeigte, dass das an Position 5 der α 1-Domäne liegende Methionin von *Mamu-B*28-L* als Start der Transkription genutzt werden kann und daher die Translation ermöglicht. Die AS-Sequenz von *Mamu-B*28+L* wies vier Austausch im Vergleich zur Referenzsequenz auf. *Mamu-B*28-L* wies nur einen AS-Austausch auf (Abb. 4.14).

Leader	
AJ556883	-----L LSGALAL TETWA
B*28+L	MRAMAPRTLLL.....
B*28-L	-----
α1-Domäne	
AJ556883	GSHSMRYFGITVSRPGRGEPRIYWGYYDDTQFMRFDSDAESPRMEPRAPWVEQEGPEYWEDVTRRAKARAQIDRVLDGLTRGYNQSEG
B*28+LR.....
B*28-L	-----
α2-Domäne	
AJ556883	GSHTIQILYGC DLGPDGRLLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQNTQRKWEAAGVAEQMRAYLEGECEVWLRRYLENGKETLQRA
B*28+LG.....
B*28-LV.....
α3-Domäne	
AJ556883	DPPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEEQTQDTELVEITRPGDGTFFQKMAAVVVPSSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRW
B*28+LL.....
B*28-L	-----
Transmembrandomäne	
AJ556883	EPSSQSTIPIVSIVAGLAVLAVVVTGAVVAAVMMRRKSS
B*28+L	..F.....
B*28-L	-----
Zytoplasmatische Domäne	
AJ556883	GKGGSSYQAASSDSAQG
B*28+L
B*28-L

Abb. 4.14: Vergleich der *Mamu-B*28*-ähnlichen Sequenzen mit der Referenzsequenz.

Die Alignierung wurde mit Hilfe von *ClustalX 1.81* erstellt. Als Referenzsequenz wurde die in der NCBI-Datenbank verfügbare *Mamu-B*28*-Sequenz (Zugriffs-Nr.: AJ556883) hinzugezogen. Die am 3'-Ende durch den verwendeten Primer generierten sieben Aminosäuren wurden bei diesem Vergleich herausgenommen. Nicht vorhandene AS sind durch einen Strich dargestellt. Identische AS sind durch einen Punkt angezeigt. Die isolierte Sequenz von *Mamu-B*28+L* gab die vollständige AS-Sequenz wieder und zeigte vier AS-Austausche im Vergleich zu der von Otting und Mitarbeitern isolierten Sequenz. *Mamu-B*28-L* fehlten die ersten 28 AS, die die gesamte *leader*-Sequenz und drei weitere AS umfassen (blau hinterlegt). Beim Vergleich zur Referenzsequenz findet man nur einen AS-Austausch.

Für beide hier isolierten *Mamu-B*28*-Varianten konnten in K562-Zellen stabile Transfektanten etabliert werden. Im *Immunoblot* ließen sich beide MHC-Klasse-AcGFP-Fusionsproteine sowohl mit dem anti-GFP-AK als auch mit dem anti-MHC-Klasse-I-AK HC-A2 nachweisen (s. Abb. 4.9). In durchflusszytometrischen Analysen konnten die MHC-Klasse-I-Moleküle der *Mamu-B*28*-Transfektante ohne *leader*-Sequenz kaum auf der Zelloberfläche dargestellt werden (D MFI = 25). Mit *leader*-Sequenz ließ sich dagegen eine deutliche MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression mit einem D MFI-Wert von 156 darstellen (Abb. 4.15c). Die Darstellungen am Laserscannmikroskop decken sich mit den durchflusszytometrischen Ergebnissen (Abb. 4.15a und b). Für *Mamu-B*28-L*-transfizierte

Zellen konnte nur intrazelluläre Expression des Fusionsproteins dargestellt werden, die Mamu-B*28+L-Transfektante zeigte dagegen auch eine MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression.

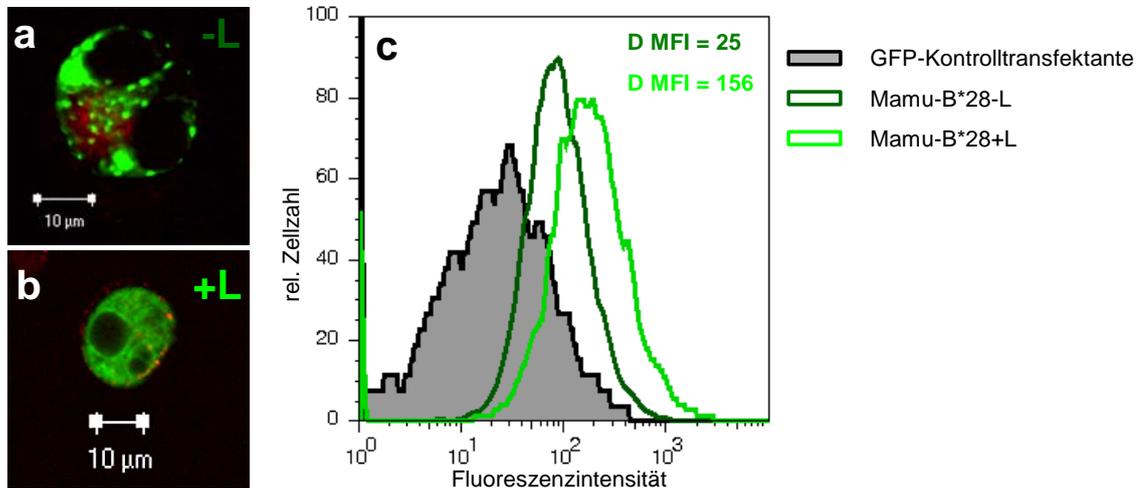


Abb. 4.15: Vergleich der subzellulären Expression der Mamu-B*28-Varianten mit und ohne leader.

(a) und (b) Einzelzell-Darstellungen der Überlagerung von LSM-Aufnahmen der Expression der Mamu-B*28-Fusionsproteine anhand des AcGFP-Anteils und der MHC-Klasse-I-Expression nach AK-Markierung mit W6/32. (a) Mamu-B*28-L. (b) Mamu-B*28+L. (c) Durchflusszytometrische Analyse der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI), dargestellt als Histogramme, von Mamu-B*28-transfizierten K562-Zellen, markiert mit dem mAK W6/32 und dem pAK IgG-RPE-Cy5 im Vergleich zur AcGFP-Kontrolltransfektante. Die dunkelgrüne Kurve zeigt die MFI der Mamu-B*28-L-transfizierten K562-Zellen, die hellgrüne Kurve die der Mamu-B*28+L-transfizierten K562-Zellen, die schwarze, grau hinterlegte Kurve gibt die MFI der AcGFP-Kontrolltransfektante wieder. Die Zunahme der MFI im Vergleich zur Kontrolle ist für beide Mamu-B*28-Transfektanten als MFI-Wert abzüglich der MFI der Kontrolltransfektante angegeben (D MFI).

Neben der MHC-Klasse-I-Sequenz ohne *leader*-Sequenz konnte auch ein Transkript mit einer Deletion im Sequenzbereich, der für den Transmembrananteil kodiert, isoliert werden. Wie schon für Mamu-B*28 wurde auch für diese verkürzte Sequenz eine nahezu Sequenz-identische vollständige Sequenz nachgewiesen werden. Beide Sequenzen waren auf Nukleotidebene zu 99 % identisch, konnten jedoch keiner bisher bekannten Sequenz zugeordnet werden. Daher wurden sie vorläufig als *Mamu-B-NEU-TM* und *Mamu-B-NEU+TM* bezeichnet. Der *Mamu-B-NEU-TM*-Sequenz fehlten genau 30 AS, die die Transmembranregion umfassen (Abb. 4.16). Daher fehlt dieser Variante die Möglichkeit der Verankerung in der Zellmembran und sie konnte in den Analysen der subzellulären Lokalisation der MHC-Klasse-I-Moleküle als interne Kontrolle ohne MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche verwendet werden.

Leader	
B-NEU+TM	MRVMAPRTLL LLLSGALALTETWA
B-NEU-TM
α1-Domäne	
B-NEU+TM	GSHTMRYFTTAVSRPGRGEPFIVVGYVDDTQFVRFSDAESPRME PRAQWMEQEGPEYWEEQTRIVKDNAQTFRVGLGTLRGYYNQSEA
B-NEU-TM
α2-Domäne	
B-NEU+TM	GSHTIQTHYGCDLGPDRLLRGYYQDAYDGRDYIALNEDLRSWTAADEAAQITQRKWEAAGVAEQWRAYLEGKQVECLRRYLENGKEMLQRA
B-NEU-TMN.....
α3-Domäne	
B-NEU+TM	DPPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEISLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFOKMGAVVVPSEEGEQRVTCHVQHEGLLEPLTLKW
B-NEU-TMP.....E.....G.....R.
Transmembrandomäne	
B-NEU+TM	EPSSQSSIPIVGI VAGLAVLAVVVTGAVVAAMRRRKS
B-NEU-TM	-----
Zytoplasmatische Domäne	
B-NEU+TM	GGKGGSYSAASSDSAQG
B-NEU-TM

Abb. 4.16: Vergleich der AS-Sequenz der isolierten Mamu-B-NEU-Sequenzen.

Die Alignierung wurde mit Hilfe von *ClustalX 1.81* erstellt. Die am 3'-Ende durch den verwendeten Primer generierten sieben Aminosäuren wurden bei diesem Vergleich herausgenommen. Nicht vorhandene AS sind durch einen Strich dargestellt, identische AS sind durch einen Punkt angezeigt. Die Sequenz von *B-NEU+TM* gibt die vollständige AS-Sequenz wieder. Der *B-NEU-TM*-Sequenz fehlt der komplette Transmembranteil (blau hinterlegt). Die Sequenz *B-NEU-TM* ist 30 AS kürzer und zeigt fünf AS-Austausche im Vergleich zu *B-NEU+TM*.

Das Fehlen der Transmembranregion konnte nach Transfektion der beiden *Mamu-B-NEU*-Varianten in K562-Zellen in *Immunoblot*-Analysen als Größenunterschied dargestellt werden (Abb. 4.17d). In Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation ließ sich wie erwartet für die Variante ohne Transmembranregion keine MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression darstellen, sie zeigte eine rein intrazelluläre Expression (Abb. 4.17a). Dagegen wies die Variante mit Transmembranregion eine vergleichsweise starke MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche auf und war durch eine nahezu fehlende intrazelluläre Expression gekennzeichnet (Abb. 4.17b). FACS-Analysen bestätigten diese Beobachtungen (Abb. 4.17c). Nur für Mamu-B-NEU+TM konnte eine deutliche Zunahme der mittleren Fluoreszenz (D MFI = 531) dargestellt werden.

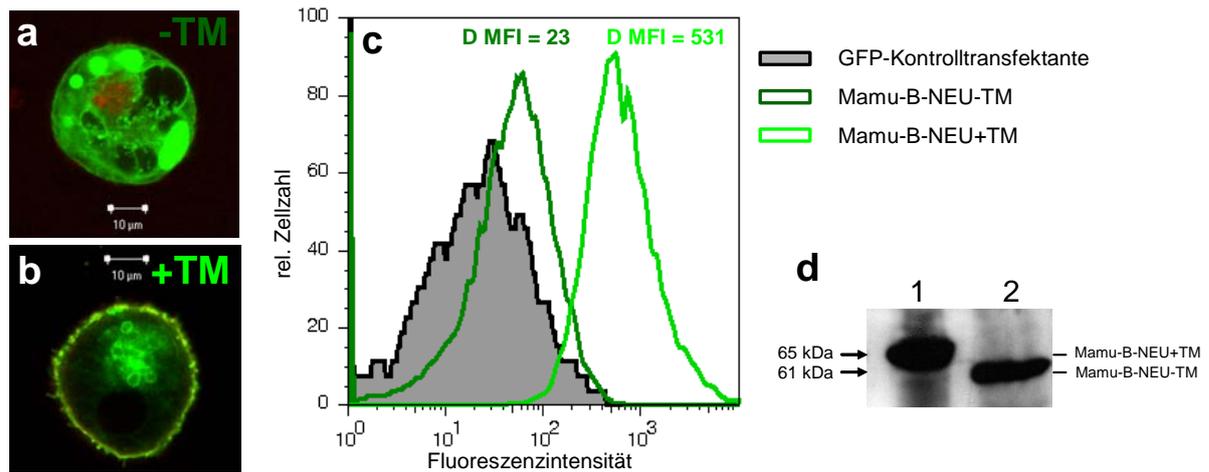


Abb. 4.17: Vergleich der subzellulären Expression der *Mamu-B-NEU*-Varianten mit und ohne TM.

(a) und (b) Einzelzell-Darstellungen der Überlagerung von LSM-Aufnahmen der Expression der Mamu-B-NEU-Fusionsproteine anhand des AcGFP-Anteils und der MHC-Klasse-I-Expression nach AK-Markierung mit W6/32. (a) Mamu-B-NEU-TM. (b) Mamu-B-NEU+TM. (c) Durchflusszytometrische Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), dargestellt als Histogramme, von Mamu-B-NEU-transfizierten K562-Zellen markiert mit dem mAK W6/32 und dem pAK IgG-RPE-Cy5 im Vergleich zur AcGFP-Kontrolltransfektante. Die dunkelgrüne Kurve zeigt die MFI der Mamu-B-NEU-TM-transfizierten K562-Zellen, die hellgrüne Kurve die der Mamu-B-NEU+TM-transfizierten K562-Zellen, die schwarze, grau hinterlegte Kurve gibt die MFI der AcGFP-Kontrolltransfektante wieder. Die Zunahme der MFI im Vergleich zur Kontrolle ist für beide Mamu-B-NEU-Transfektanten als MFI-Wert abzüglich der MFI der Kontrolltransfektante angegeben (D MFI). (d) Immunoblot mit anti-GFP-mAK. Dargestellt ist der Größenunterschied zwischen B-NEU mit (1) und ohne (2) Transmembranregion. Links sind die Größen der beiden Banden in kDa angegeben, rechts sind die Bezeichnungen der aufgetragenen Transfektanten-Zelllysate angegeben.

Des Weiteren sollte geklärt werden, ob die Variante *Mamu-B-NEU-TM* im Zellinneren als natives Molekül vorliegt oder einer sofortigen Degradation unterliegt und dadurch keine funktionelle Aufgaben übernehmen kann. Für *HLA-G*-Allele konnten beispielsweise verschiedene Spleißvarianten beschrieben werden, unter denen einigen auch das Exon 5, das die transmembrane Region verschlüsselt, oder mehr fehlt. Es konnte gezeigt werden, dass solche Spleißvarianten für lösliche native Moleküle kodieren (Paul *et al.*, 2000). Um dieser Frage nachzugehen, wurden intrazelluläre Markierungen mit verschiedenen AK durchgeführt. Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben erkennt der AK W6/32 native MHC-Klasse-I-Molekülstrukturen in Assoziation mit β 2M. Daneben standen zwei AK (HC-10 und HC-A2) zur Verfügung, die denaturierte MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen. Diese binden spezifisch an zwei unterschiedliche lineare Sequenzepitope in der α 1-Domäne, die unter anderem durch Instabilität der MHC-Klasse-I-Komplexe zugänglich werden. In Kapitel 4.2.2 konnte gezeigt werden, dass beide Varianten von Mamu-B-NEU das Epitop für den AK HC-A2 enthalten und nach Denaturierung im Immunoblot von dem AK erkannt werden (vergl. Abb. 4.9).

Die in Abbildung 4.18 dargestellten durchflusszytometrischen Analysen vergleichen eine Zelloberflächenmarkierung der Mamu-B-NEU-TM-Transfektante mit dem AK W6/32 mit intrazellulären Markierungen mit dem AK W6/32 bzw. dem AK HC-A2.

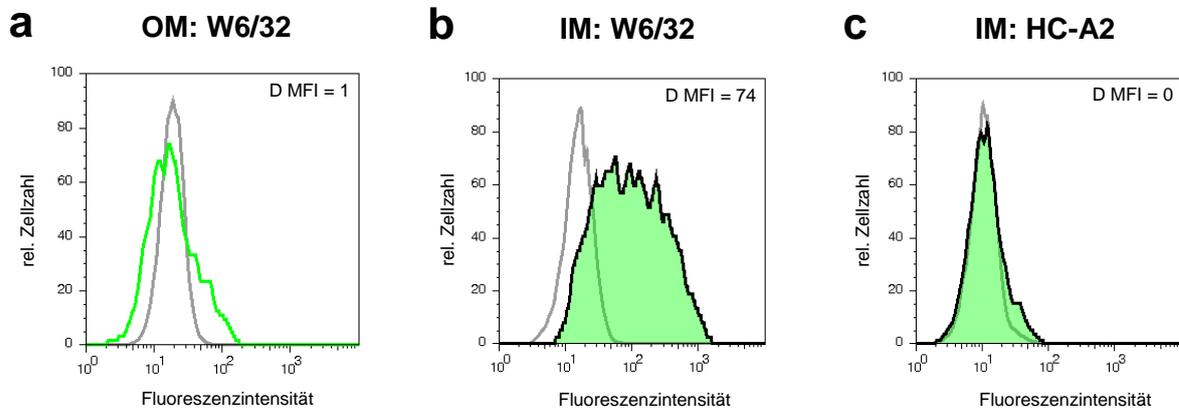


Abb. 4.18: Intrazellulärer Nachweis von Mamu-B-NEU-TM.

Durchflusszytometrische Analysen der Transfektante Mamu-B-NEU-TM markiert mit anti-MHC-Klasse-I-Antikörpern. **(a)** Nachweis von MHC-Klasse-I-Molekülen mit dem mAK W6/32 an der Zelloberfläche (OM, **a**) und intrazellulär (IM, **b**). **(c)** Intrazellulärer Nachweis von MHC-Klasse-I-Molekülen mit dem mAK HC-A2 (IM, **c**). Alle Proben wurden anschließend mit dem RPE-Cy5-gekoppelten Ziege anti-Maus IgG-pAK angefärbt. Je Messung wurden 3×10^4 Ereignisse aufgezeichnet. In die Auswertung wurden nur lebende, AcGFP-positive Zellen einbezogen. Alle Abbildungen zeigen histogrammische Darstellungen der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Mamu-B-NEU-TM-Transfektante (grüne Kurven) im Vergleich zur AcGFP-Kontrolltransfektante (graue Kurven). Die Zunahme der MFI im Vergleich zur Kontrolle ist als MFI-Wert abzüglich des MFI-Wertes der Kontrolltransfektante angegeben (D MFI). Für die Mamu-B-NEU-TM-Transfektante konnte **(a)** keine MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (D MFI = 1) und **(c)** keine intrazelluläre MHC-Klasse-I-Markierung mit dem HC-A2-AK (D MFI = 0) nachgewiesen werden. Dagegen wurde bei intrazellulärer Markierung mit W6/32 **(b)** eine Zunahme der MFI beobachtet (D MFI = 74).

Wie schon in Abbildung 4.17 gezeigt, konnte für die Mamu-B-NEU-TM-Transfektante wiederholt kaum MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression dargestellt werden (D MFI = 1). Die intrazellulären Markierungen zeigten dagegen Unterschiede bei den beiden AK-Markierungen. Mamu-B-NEU-TM wies bei intrazellulärer Markierung mit W6/32 eine Zunahme der mittleren Fluoreszenz gegenüber der Kontrolltransfektante auf (D MFI = 74). Dagegen konnte nach Markierung mit dem HC-A2-AK keine Zunahme der MFI beobachtet werden (D MFI = 0). Die Ergebnisse zeigen, dass Mamu-B-NEU-TM als natives Molekül im Zellinneren vorliegt und somit eine physiologische Funktion haben könnte.

4.3 Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Moleküle als Liganden für NK-Zellrezeptoren

Zur funktionellen Charakterisierung der MHC-Klasse-I-Moleküle des Rhesusaffen wurden immunologische Tests durchgeführt, in denen die etablierten stabilen Transfektanten als Zielzellen Verwendung fanden. In Kapitel 4.2.3 konnte gezeigt werden, dass die MHC-Klasse-I-Transfektanten sehr divergente subzelluläre Lokalisationen aufwiesen. Für die im Folgenden dargestellten Versuche waren jedoch nur Transfektanten mit starker MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression geeignet. Da die Mamu-A-Transfektanten einheitlich eine starke Oberflächenexpression aufwiesen, wurden nur diese in die experimentellen Analysen miteinbezogen.

Interaktionen von MHC-Klasse-I-Molekülen mit NK-Zellrezeptoren führen je nach Art des Rezeptors zu einer Inhibition oder einer Aktivierung von NK-Zellen. Zum Nachweis der veränderten NK-Zellaktivierung bieten sich immunologische Tests an, bei denen Ziel- und Effektorzellen über einen längeren Zeitraum inkubiert werden und im Anschluss eine Veränderung von Ziel- oder Effektorzellen gegenüber einem Referenzwert gemessen werden kann. Für solche Messungen eignet sich z. B. der Chromfreisetzungstest. Dabei wird anhand von freigesetztem radioaktiven Chrom gegenüber einem Referenzwert die Zielzellyse ermittelt (s. Kap. 3.2.7). Eine andere Möglichkeit bietet der Degranulierungsassay, bei dem nicht die Zielzellen, sondern die Effektorzellen analysiert werden. In der Durchflusszytometrie können dabei NK-Zellen gezielt hinsichtlich ihrer Aktivierung betrachtet werden (s. Kap. 3.2.9).

4.3.1 Einfluss von Mamu-A-Molekülen auf die NK-Zellaktivierung im Chromfreisetzungstest

Zur Etablierung von Chromfreisetzungstests mit Rhesusaffen Lymphozyten als Effektorzellen wurde zu Beginn der Arbeiten parallel mit menschlichem und Rhesusaffenblut gearbeitet. Damit sollte kontrolliert werden, ob und wie gut Lymphozyten des Rhesusaffen in der Lage sind, die humanen K562-Zellen zu lysieren.

Aus je ca. 25 ml EDTA-Blut wurden mittels einer Ficoll-Gradienten-Zentrifugation Leukozyten isoliert. Humanes Blut stand jeweils von einem Probanden (s. Kap. 2.2) zur Verfügung. Um jedoch genügend Rhesusaffenblut für einen Test zur Verfügung zu haben, mussten Blutproben mehrerer Tiere (vergl. Tab. 10.1) vereinigt werden. Der Test wurde wie

in Kapitel 3.2.7 beschrieben angesetzt. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden mindestens drei unabhängige Tests durchgeführt.

Ein Vergleich der spezifischen Lyse durch humane und Rhesusaffen Lymphozyten zeigte deutliche Unterschiede in der Effektivität der Zelllyse sowie der maximalen Zelllyse. Dabei demonstrierten drei unabhängige Versuche den gleichen Trend in ihren Ergebnissen (nicht gezeigt). Die Inkubation von AcGFP-transfizierten K562-Zellen mit humanen Lymphozyten führte zu einer maximalen spezifischen Lyse von durchschnittlich 60 %. Die Lymphozyten der Rhesusaffen lösten eine maximale spezifische Lyse von durchschnittlich 40 % aus. Der Vergleich zeigte, dass Rhesusaffen-PBMC zwar in der Lage sind, die AcGFP-transfizierten humanen K562-Zellen abzutöten, die Effizienz jedoch gegenüber humanen PBMC um ca. 15 Prozentpunkte geringer ist (Abb. 4.19).

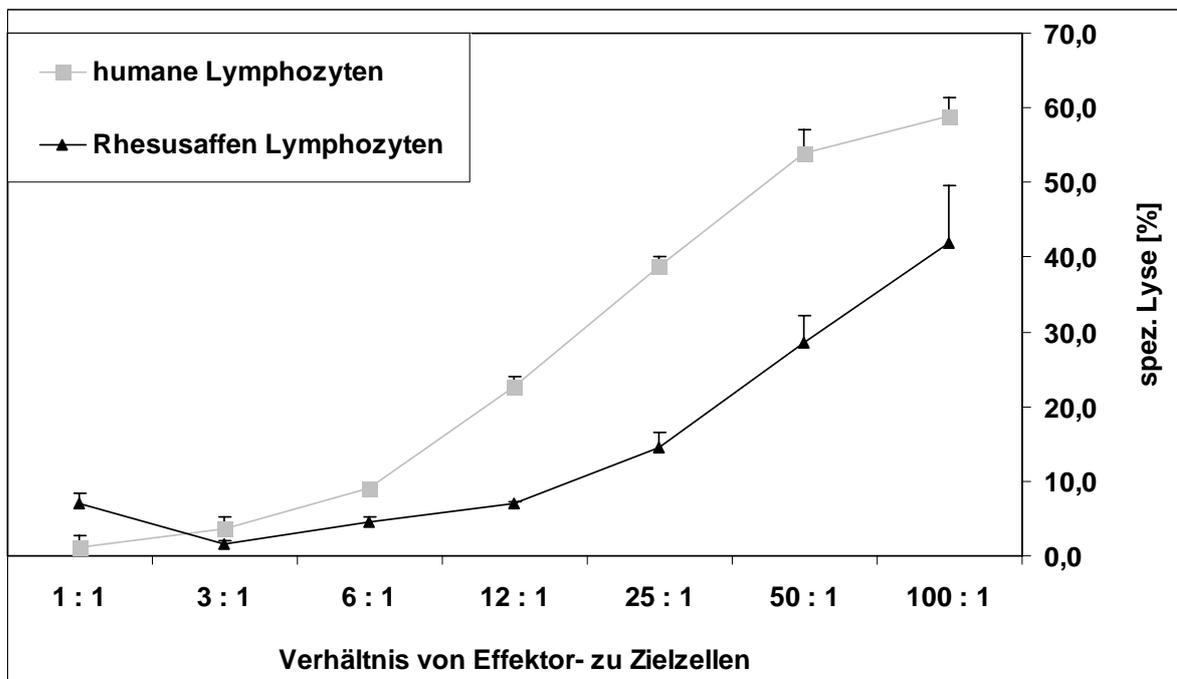


Abb. 4.19: Vergleich der Zytotoxizität von humanen und Makaken-PBMC.

Dargestellt ist einer von drei vergleichbaren Tests. Als Zielzelle wurde die AcGFP-Transfektante verwendet. Die spezifische Lyse durch humane Lymphozyten (Proband Nr. 2) ist als graue Kurve, die durch Rhesusaffen-Lymphozyten (Tier-Nr. 12418 und 12419) als schwarze Kurve dargestellt. Die Standardabweichungen sind als schwarze Balken über den einzelnen Mittelwerten angegeben. Der Vergleich zeigte, dass Rhesusaffen-Lymphozyten zwar in der Lage sind, die K562-AcGFP-Zellen abzutöten, jedoch bei gleichem Lymphozyten-Zielzellverhältnis geringere spezifische Lysen als humane Lymphozyten erreichen.

Um Interaktionen zwischen Mamu-A-Molekülen und Rezeptoren auf NK-Zellen nachzuweisen, wurden parallel zu einer K562-Kontrolltransfektante, die nur AcGFP exprimierte, die folgenden K562-Transfektanten mit starker MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression verwendet: Mamu-A*01, Mamu-A*08 und Mamu-A*11.

Je Transfektante wurden mindestens fünf unabhängige Analysen durchgeführt. In Abbildung 4.20 sind die Mittelwerte der spezifischen Lysen in Prozent und die Standardabweichungen angegeben. Für die drei Mamu-A-Transfektanten A*01, A*08 und A*11 zeigten sich einheitlich leichte Tendenzen einer Reduktion der spezifischen Lyse gegenüber der K562-AcGFP-Kontrolltransfektante. Aufgrund der niedrigen, durchschnittlichen Maximallyse von unter 40 % und den hohen Standardabweichungen lassen sich jedoch fast keine signifikanten Ergebnisse angeben. Einzig bei dem höchsten Effektor-Zielzell-Verhältnis konnte für die spezifische Lyse der Mamu-A*11-Transfektante gegenüber der AcGFP-Kontrolltransfektante eine statistische Signifikanz auf dem 5 % Niveau ermittelt werden. Zwei Beispiele für graphische Auswertungen einzelner Tests finden sich in Abbildung 10.6.

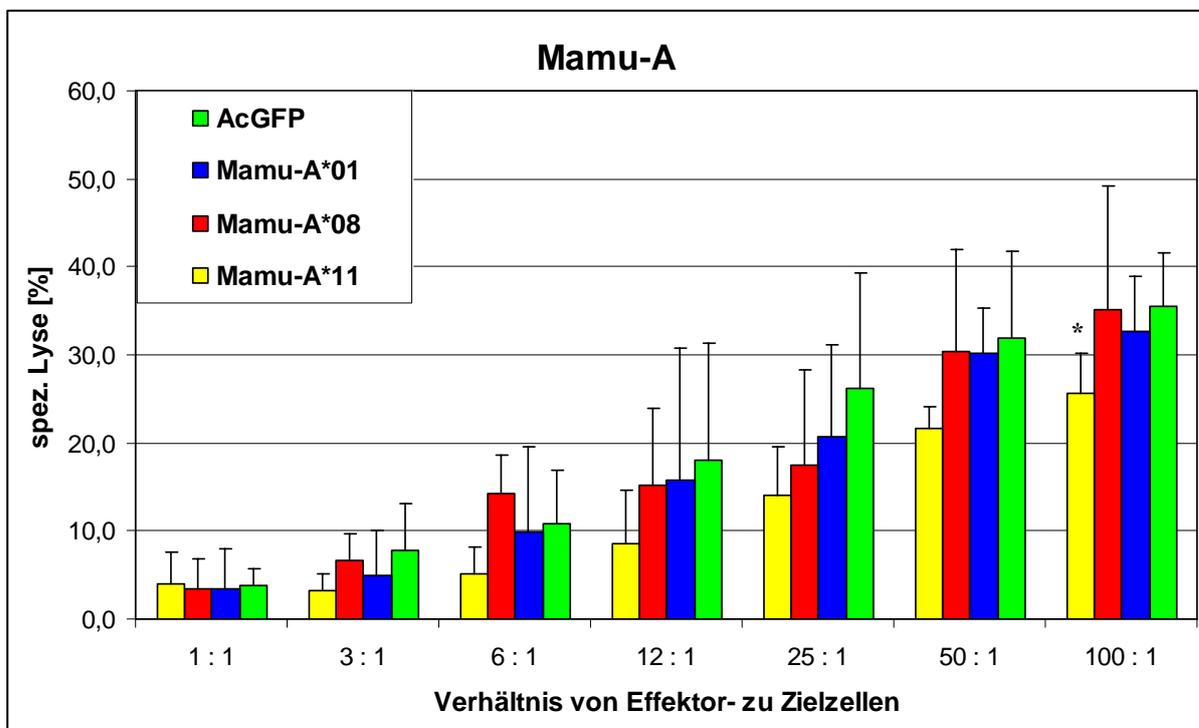


Abb. 4.20: Analyse der spezifischen Lyse von Mamu-A-Transfektanten durch Rhesusaffen-Lymphozyten im Chromfreisetzungstest.

Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte mit *Excel 2003*. Dargestellt ist eine Zusammenfassung von fünf unabhängigen Tests. Aufgetragen ist die spezifische Lyse in Prozent gegen die Lymphozyten-Anzahl pro Zielzelle. Jeder Balken gibt den Mittelwert von 15 Ansätzen mit gleichem PBMC / Zielzellverhältnis aus fünf unabhängigen Chromfreisetzungstests wieder. Die Standardabweichung ist als schwarzer Balken für jeden als farbiger Balken dargestellten Mittelwert angegeben. In allen fünf Chromfreisetzungstests wurden neben der K562-AcGFP-Kontrolltransfektante die stabilen K562-Transfektanten Mamu-A*01, Mamu-A*08 und Mamu-A*11 eingesetzt. Als Effektorzellen dienten PBMC aus Rhesusaffenblut (Tier-Nr.: 2146, 2181, 2209, 2232, 12418, 12419, 12740, 12741, 12742, 12743, 12744, 12745, 13411, 13414, 13415, 13416). (*) zeigt Signifikanz ($p < 0,05$) nach Mann-Whitney-U-Test an.

4.3.2 Einfluss von Mamu-A-Molekülen auf die NK-Zellaktivierung im Degranulierungsassay

Mit dem Degranulierungsassay kam ein weiteres Verfahren zur Analyse von Ziel- und Effektorzell-Interaktion zur Anwendung (s. Kap. 3.2.9). Im Gegensatz zum Chromfreisetzungstest, der Effekte auf Zielzellen misst, werden bei diesem Testverfahren Veränderungen der Effektorzellen analysiert.

Für die Degranulierungsassays wurden, wie schon in den Chromfreisetzungstests, nur Mamu-A-Transfektanten eingesetzt. Zusätzlich zu den K562-Transfektanten Mamu-A*01, Mamu-A*08 und Mamu-A*11 konnten, bedingt durch die Etablierung weiterer stabiler MHC-Klasse-I-Transfektanten, K562-Transfektanten, die die MHC-Klasse-I-Moleküle Mamu-A*1303 und Mamu-A*1403 exprimieren, hinzugezogen werden.

Für die Degranulierungsassays standen zwei Rhesusaffen in regelmäßigen Abständen für Blutabnahmen zu Verfügung. Dies gewährleistete eine Vergleichbarkeit der Experimente mit PBMC eines Tieres. Zusätzlich ermöglichte eine *Mamu-A*-Genotypisierung der beiden Rhesusaffen eine Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich der unterschiedlichen *Mamu-A*-Genausstattung (s. Kap. 4.4).

Das Ausmaß der Degranulierung korreliert mit der NK-Zellaktivierung. Als Marker kann dafür die Expression von CD107a (*LAMP1*) verwendet werden. Sie geht mit einer Ausschüttung der Zellgranula, die vor allem Granzym B und Perforin enthalten, und der NK-Zell-vermittelten Lyse einher. Daher kann eine Verringerung der CD107a-Expression auch als Maß für eine Inhibition der NK-Zellaktivierung gewertet werden, die durch die Interaktion von MHC-Klasse-I-Liganden mit inhibitorischen NK-Zellrezeptoren vermittelt wird.

In Vorversuchen wurde zunächst das optimale Lymphozyten-Zielzell-Verhältnis ermittelt (nicht gezeigt). Dabei konnte ein Verhältnis von einer Lymphozytenzelle zu drei Zielzellen die stärkste CD107a-Expression und daher die stärkste NK-Zellaktivierung bei Inkubation mit untransfizierten K562-Zellen auslösen. Die optimale Inkubationszeit der PBMC mit Zielzellen lag bei vier Stunden.

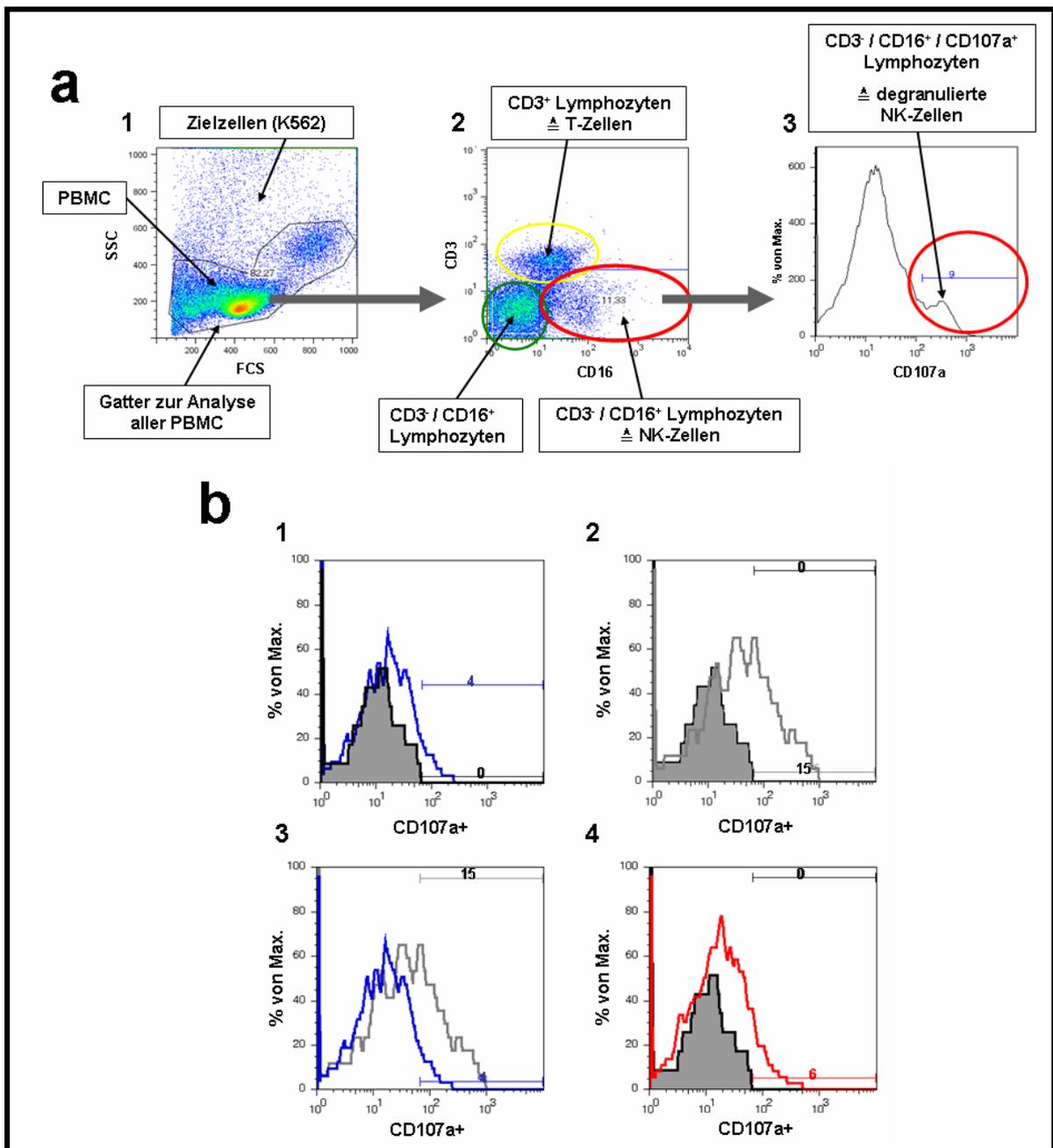


Abb. 4.21: Schematische Darstellung der Auswertung von Degranulierungsassays.

Die Abbildung zeigt eine beispielhafte Auswertung mit PBMC isoliert von Tier 2136. (a) Charakterisierung der CD107a⁺ NK-Zellen. PBMC wurden für 4 h mit AcGFP-transfizierten K562-Zellen stimuliert und mit Antikörpern gegen CD3, CD16 und CD107a markiert. Für jede Probe wurden innerhalb der gesamten Zellpopulation zunächst die Lymphozyten isoliert (a.1) und anschließend hinsichtlich ihrer CD3- und CD16-Oberflächenexpression untersucht (grün, gelb und rot markiert, a.2). CD3⁻ / CD16⁺-Lymphozyten wurden als NK-Zellen definiert und auf ihre CD107a-Oberflächenexpression hin analysiert (a.3). (b) Berechnung der prozentualen Degranulierung von Mamu-A-Transfektanten am Beispiel von Mamu-A*11. NK-Zellen (CD3⁻ / CD16⁺) wurden hinsichtlich ihrer CD107a-Expression ohne und mit Stimulation durch die AcGFP-Kontrolltransfektante untersucht. Unstimulierte NK-Zellen wiesen eine Degranulierung von 4 % (= 4 % CD107a-positive Zellen) im Vergleich zu NK-Zellen, stimuliert mit der AcGFP-Kontrolltransfektante, auf (b.1). Mit der AcGFP-Kontrolltransfektante stimulierte NK-Zellen waren zu 16 % positiv für CD107a (b.2), sie degranulierten daher 11 % stärker als unstimulierte NK-Zellen (b.3). NK-Zellen stimuliert mit der Mamu-A*11-Transfektante zeigten eine deutliche Reduktion der Stimulation, verglichen mit der Kontrolltransfektante. Nur 6 % der NK-Zellen waren hier positiv für CD107a. (b.4). Die CD107a-Expression innerhalb der Probe mit unstimulierten PBMC wurde als Basalexpression herangezogen und auf 0 % gesetzt. Die CD107a-Expression hervorgerufen durch Stimulation mit der Kontrolltransfektante wurde als maximale CD107a-Expression gewertet und auf 100 % gesetzt (Maximalstimulation). Dadurch ergab sich in diesem Beispiel für die Mamu-A*11-Transfektante eine prozentuale CD107a-Expression von 55 %.

Die Auswertung konzentrierte sich mit Hilfe des T-Zellmarkers CD3 und des NK-Zellmarkers CD16 auf NK-Zellen innerhalb der PBMC-Population (Abb. 4.21). Dadurch konnten sowohl alle CD3⁻ / CD16⁻ PBMC (z. B. B-Lymphozyten), als auch die CD16⁺-T-Zellen von der Analyse ausgeschlossen werden. Der Anteil der CD3⁻ / CD16⁺ NK-Zellen innerhalb der PBMC-Population betrug zwischen 5 - 9 % und liegt damit im erwarteten Bereich für NK-Zellen. Anschließend wurde der prozentuale Anteil an CD107a⁺ NK-Zellen bestimmt. Die Menge der CD107a⁺ NK-Zellen stimuliert mit untransfizierten K562-Zellen wurde als maximal gewertet und auf 100 % gesetzt (Maximalstimulation). Für NK-Zellen stimuliert mit unterschiedlichen Mamu-A-Transfektanten wurden die prozentualen Anteile an der Maximalstimulation errechnet. Eine Verringerung der CD107a-Expression kann als Inhibition der NK-Zellaktivierung betrachtet werden.

In Abbildung 4.22 wurde je ein repräsentatives von fünf vergleichbaren Experimenten pro Rhesusaffe gezeigt. Eine statistische Auswertung der unabhängigen Tests kann streng genommen nicht vorgenommen werden, da in Abhängigkeit von äußeren Umständen der prozentuale Anteil der NK-Zellen und deren Eigenschaften (z. B. Rezeptorexpression, Zustand der Aktivierung von NK-Zellen) stark schwanken können. Dennoch wurden Mittelwerte der Stimulationswerte der fünf unabhängigen Tests gebildet und sind in einer Übersichtsdarstellung in Abbildung 10.7 zu sehen.

Alle Versuche zeigten einheitlich, dass Mamu-A-Moleküle die Degranulierung von Rhesusaffen NK-Zellen verringern. Dabei wird die stärkste Inhibition bei beiden untersuchten Tieren durch Mamu-A*01 vermittelt. Die vom *Mamu-A1*-Gen kodierte Moleküle Mamu-A*01, -A*08 und -A*11 zeigten zudem eine stärkere Inhibition als die von den Genen *Mamu-A3* und *Mamu-A4* kodierte Moleküle Mamu-A*1303 und Mamu-A*1403.

Im Hinblick auf die *Mamu-A*-Genaussattung der beiden verwendeten Rhesusaffen (s. Kap. 4.4) zeigten die Degranulierungsassays zudem, dass bei genomischer Anwesenheit der Allele *Mamu-A*01* und *Mamu-A*11* die Degranulierung der NK-Zellen stärker reduziert werden konnte als bei Abwesenheit der Allele. Dieser Zusammenhang ließ sich jedoch für die drei weiteren *Mamu-A*-Allele nicht darstellen.

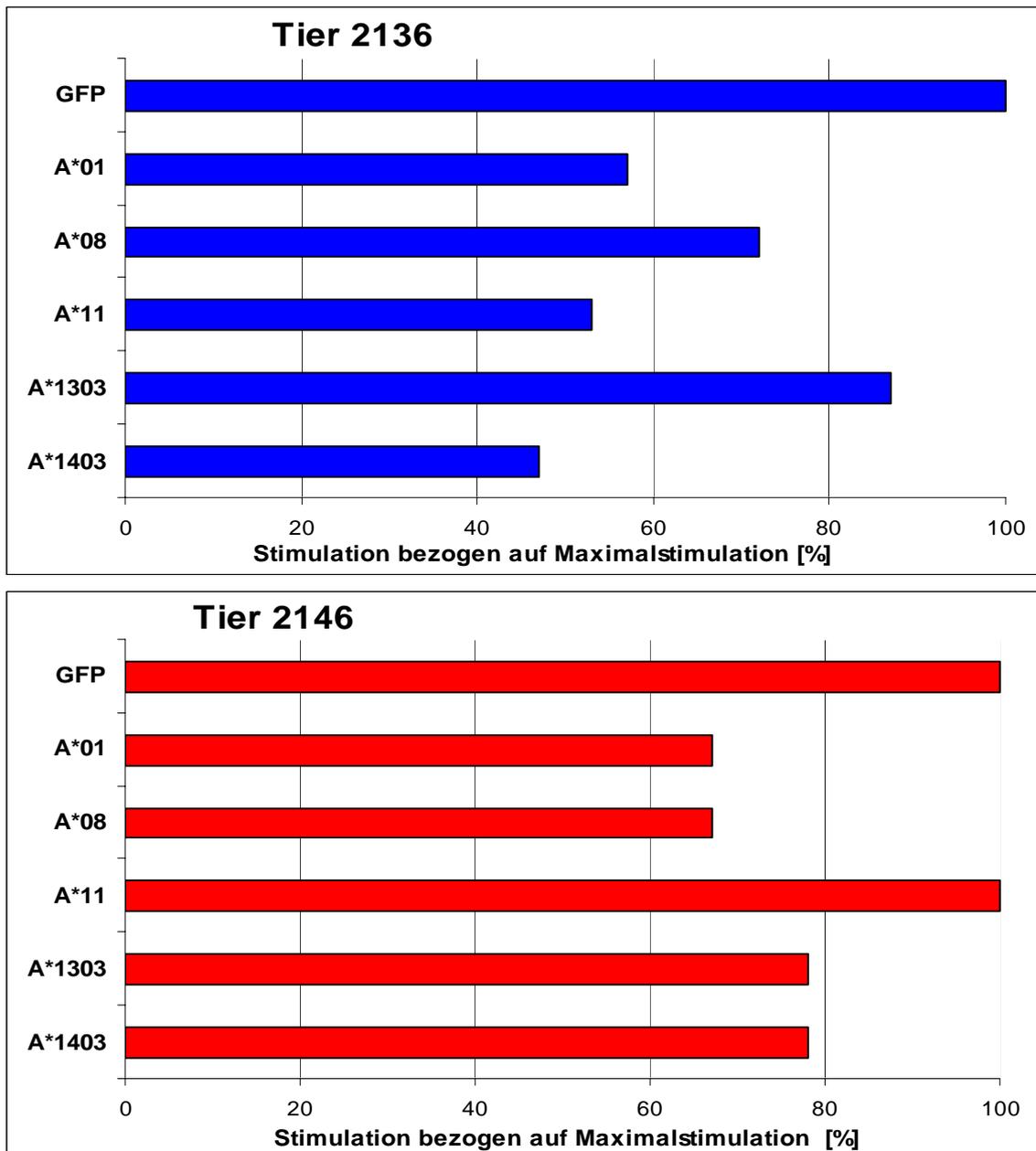


Abb. 4.22: Verringerung der NK-Zelldegranulierung durch Mamu-A-Moleküle.

Gezeigt ist je ein repräsentativer von fünf vergleichbaren Tests mit PBMC isoliert aus Tier 2136 und Tier 2146. Von einer statistischen Auswertung verschiedener Experimente wurde abgesehen, da einzelne Tests nur bedingt miteinander vergleichbar sind und pro Tag aufgrund der geringen Blutmenge jeweils nur ein Test angesetzt werden konnte. Die NK-Zellmenge wie auch deren Expressionsmuster kann jedoch stark tagesabhängig variieren und damit die Maximalstimulation sowie die prozentualen Veränderungen in Proben inkubiert mit einzelnen Transfektanten stark verändern. Da die AcGFP-Kontrolltransfektante keine MHC-Klasse-I-Moleküle exprimiert, wird bei Inkubation mit NK-Zellen eine maximale Stimulation erreicht. Dieser Wert an CD107a-positiven Zellen wurde in allen Tests auf 100% gesetzt. Die Degranulierung der einzelnen Mamu-A-Transfektanten wurde prozentual zur Maximalstimulation berechnet und als Balken angegeben. Verwendet wurden jeweils die Transfektanten Mamu-A*01, Mamu-A*08, Mamu-A*11, Mamu-A*1303 und Mamu-A*1403. Die graphische Darstellung wurde mit *Excel 2003* erstellt. Die Degranulierungsassays zeigten, dass Mamu-A-Transfektanten in der Lage sind, die Degranulierung von NK-Zellen beider Tiere zu verringern.

4.4 *Mamu-A*-Typisierung

Für die Degranulierungsassays standen im Verlauf der Doktorarbeit zwei Rhesusaffen für häufige Blutabnahmen zur Verfügung (Tier-Nr.: 2136 und 2146). Dies eröffnete die Möglichkeit, die Ergebnisse der Degranulierungsassays mit den einzelnen *Mamu-A*-Transfektanten im Zusammenhang mit der genetischen Ausstattung der beiden Rhesusaffen in der *Mamu-A*-Region zu betrachten. Zu diesem Zweck wurden beide Tiere für die in Degranulierungsassays verwendeten *Mamu-A*-Allele genotypisiert.

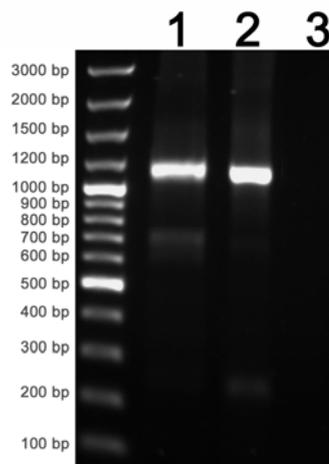


Abb. 4.23: Analyse der *Mamu-A*-spezifischen PCR mit cDNA der Tiere 2136 und 2146.

Dargestellt ist ein Agarosegel mit Auftrennungen von je 2 μ l PCR-Ansatz pro Spur neben einem Längenstandard (links). Pro PCR-Ansatz wurde je 1 μ l cDNA und die *Mamu-A*-Oligonukleotide MASF/MASR eingesetzt. Es wurde das PCR-Programm Nr. 2 verwendet. (1) *Mamu-A*-PCR von Tier 2136. (2) *Mamu-A*-PCR von Tier 2146. (3) H₂O-Negativkontrolle. In den Spuren 1 und 2 waren Banden der erwarteten Produktlänge von 1150 bp zu sehen. Die Negativkontrolle wies keine Bande auf (Spur 3).

Aus EDTA-Blut wurde nach einer Erythrozytenlyse die RNA isoliert und daraus cDNA hergestellt. Diese wurde zunächst in einer PCR mit *Mamu-A*-spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt. Die Oligonukleotide MASF / MASR (modifiziert nach Boyson *et al.*, 1996b) amplifizierten jeweils ein Produkt mit einer Länge von 1150 bp (Abb. 4.23). Nach einer Aufreinigung dieser PCR-Produkte stand von beiden Tieren ein Pool an *Mamu-A*-Sequenzen zur weiteren Untersuchung zur Verfügung.

Je 1 μ l der extrahierten *Mamu-A*-PCR-Produkte wurde jeweils in die allelspezifischen PCR eingesetzt. Durch dieses Verfahren der *nested*-PCR, bei der nur *Mamu-A*-Amplifikate als *template* eingesetzt wurden, konnte eine höhere Spezifität der allelspezifischen Amplifikation erreicht werden.

Entsprechend den in den Degranulierungsassays verwendeten *Mamu-A*-Transfektanten wurden aus der *Mamu-A*-Region die Allele A*01, A*08, A*11, A*1303 und A*1403 mit

sequenzspezifischen Oligonukleotiden (SSP, vergl. Tab. 2.1) typisiert. Obwohl kein Allel des *Mamu-A2*-Gens als stabile Transfektante zur Verfügung stand, wurde dieses Gen zusätzlich in die Genotypisierungen miteinbezogen, um einen vollständigen Überblick über die *Mamu-A*-Region der beiden Rhesusaffen zu erlangen. Für die Allele *Mamu-A*01*, *-A*08*, und *-A*11* wurden Oligonukleotide in Anlehnung an bereits etablierte SSP verwendet (Kaizu *et al.*, 2007). Die Oligonukleotide für die Gene *Mamu-A*1303*, *-A*1403* sowie für *Mamu-A2* wurden neu konstruiert. Dabei wurden ebenfalls PCR-Produktlängen von unter 500 bp gewählt, um eine Amplifikation zu erleichtern. Die PCR-Programme mit entsprechenden *annealing*-Temperaturen (Tab. 4.4) wurden jeweils in einer eigenen Versuchsreihe optimiert (nicht gezeigt). Die PCR-Produkte mit erwarteter Länge wurden aufgereinigt und mit den entsprechenden Oligonukleotiden sequenziert.

Da bei der *Mamu-A2*-PCR Produkte mit allelischen Unterschieden in der Sequenz zu erwarten waren, wurden diese PCR-Produkte in den pGEM-TEasy-Vektor kloniert und 18 Klone pro Rhesusaffe sequenziert.

Tab. 4.4: Erwartete PCR-Produktlängen und verwendete PCR-Programme für Mamu-A-Typisierungen.

Oligonukleotide	PCR-Programm	Erwartete Länge des PCR-Produktes (cDNA)
A*01F / A*01R	3	291 bp
A*08F / A*08R	4	201 bp
A*11F / A*11R	5	437 bp
A*1303F / A*1303R	6	354 bp
A*1403F / A*1403R	6	376 bp
Mamu-A2F / Mamu-A2R	7	244 bp

Die gelelektrophoretische Auswertung zeigte für Tier 2136 deutliche Banden für die Gene *Mamu-A*11* und *-A*1403*. Eine schwache Bande war zusätzlich in der Spur mit der Auftragung der *Mamu-A*1303*-PCR zu sehen. Die Auftragung der *Mamu-A2*-PCR zeigte ebenfalls eine deutliche Bande bei erwarteter Länge. Das Agarosegel mit der Auftragung der SSP-*Mamu-A*-PCR-Analysen von Tier 2146 wies starke Banden für die Gene *Mamu-A*01*, *-A*08* und *-A*1303* auf, für die beiden anderen Gene (*Mamu-A*11* und *Mamu-A*1403*) zeigte die elektrophoretische Auftrennung schwache Banden. Wie bei Tier 2136 war auch hier eine deutliche Bande in der Spur mit der *Mamu-A2*-PCR zu sehen (Abb. 4.24). Um die gelelektrophoretischen Ergebnisse abzusichern wurden auch schwache Banden sequenziert.

Die Sequenzierungen verifizierten, dass nur die starken Banden der erwarteten Sequenz entsprechen. Die schwachen Banden wiesen abweichende *Mamu-A*-Sequenzen auf. Die trotz sehr stringenter PCR-Bedingungen fehlerhaften Amplifikationen sind vermutlich auf die hohe

Ähnlichkeit der *Mamu-A*-Allele untereinander zurückzuführen. Dennoch konnten durch die Sequenzierung für alle getesteten *Mamu-A*-Allele eindeutige Ergebnisse erzielt werden.

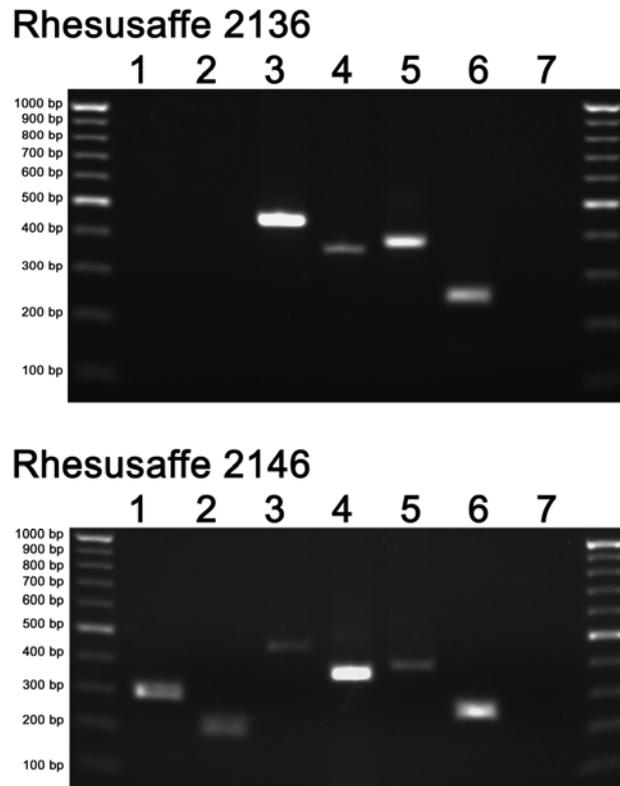


Abb. 4.24: *Mamu-A*-Genotypisierung durch PCR.

Dargestellt sind Agarosegele mit Auftrennungen von je 2 µl PCR-Ansatz pro Spur neben einem Längenstandard (links). Für die einzelnen SSP wurde je 1 µl cDNA als *template* verwendet. (1) *Mamu-A*01*-PCR, (2) *Mamu-A*08*-PCR, (3) *Mamu-A*11*-PCR, (4) *Mamu-A*1303*-PCR, (5) *Mamu-A*1403*-PCR, (6) *Mamu-A2*-PCR, (7) H₂O-Negativkontrolle. Für Tier 2136 konnten für die Gene *A*11* und *A*1403* und *A2* eindeutige Banden amplifiziert werden. Eine schwache Bande zeigte sich zusätzlich in der *A*1303*-PCR. Für Tier 2146 konnten für die Gene *A*01*, *A*08* und *A*1303* und für *A2* eindeutige Banden amplifiziert werden. Für die beiden Gene *A*11* und *A*1404* amplifizierten die SSP schwache Banden. Alle PCR-Programme amplifizierten nur Banden in erwarteter Länge.

Mit Hilfe der Oligonukleotide, spezifisch für das *Mamu-A2*-Gen, konnten beide Tiere eindeutig als *A2*-positiv eingeordnet werden. Die Sequenzierung von 18 Klonen pro Rhesusaffe zeigte, dass Tier 2136 ein noch nicht beschriebenes Allel des *Mamu-A2*-Gens aufweist. Die Sequenz konnte mit 93 % Identität zu *Mamu-A*0502* (NCBI-Datenbank, Zugriffs-Nr.: AF157394) in der Hälfte der Sequenzierungen nachgewiesen werden. Die andere Hälfte war auf Amplifikationen des *Mamu-A4*-Gens zurückzuführen und war identisch mit der Sequenz *Mamu-A*1403*. Ob das Tier für das *Mamu-A2*-Gen homozygot oder heterozygot ist, bleibt jedoch ungeklärt, da das sequenzierte Amplifikat nur 244 bp von insgesamt 1150 bp umfasst. Tier 2146 ist dagegen für das *Mamu-A2*-Gen eindeutig heterozygot. Eine mehrfach identifizierte Sequenz ist identisch mit allen Sequenzen der Allele *Mamu-A*0504* - *A*0518* (diese Sequenzen wurden dem *Mamu-A2*-Gen zugeordnet) und

konnte in 70 % der Sequenzierungen isoliert werden. Eine nähere Zuordnung (identische mit einem der Allele *Mamu-A*0504 - A*0518*) bleibt auch hier aufgrund der kurzen Sequenzlänge unmöglich, da sich die Sequenzen von *Mamu-A*0504 - A*0518* in diesem Bereich nicht unterscheiden. Eine zweite Sequenz, zu 99 % identisch mit *Mamu-A*0502*, konnte in 10 % der Fälle identifiziert werden. Alle anderen Sequenzen waren auf Amplifikationen der *Mamu-A*01*-Sequenz zurückzuführen. Auf eine genauere Bestimmung der Allele des A2-Gens der beiden Tiere wurde verzichtet, da das A2-Gen nicht in die Degranulierungsassays einbezogen wurde.

Aus der vorangegangenen Isolation von *Mamu-A*-Genen (s. Kap. 4.1.2.1) war zudem bekannt, dass der Rhesusaffe 2136 für das *Mamu-A1*-Gen ein weiteres Allel aufweist. Drei isolierte Klone erbrachten eine einheitliche Sequenz, die identisch mit *Mamu-A*04* ist. Damit ist dieses Individuum für das *Mamu-A1*-Gen heterozygot mit den Allelen *Mamu-A*04* und *Mamu-A*11*. Für das *Mamu-A2*-Gen konnte aus dem Rhesusaffen 2136 bisher nur eine Sequenz detektiert werden. Ob das Tier homozygot oder heterozygot ist, bleibt offen. Für das *Mamu-A3*-Gen konnte kein Allel nachgewiesen werden. Dagegen war das Tier positiv für das *Mamu-A4*-Gen mit dem Allel *Mamu-A*1403*.

Der Rhesusaffe 2146 war ebenfalls heterozygot für das *Mamu-A1*-Gen (*A*01 / A*08*). Auch für das *Mamu-A2*-Gen konnten zwei Allele nachgewiesen werden (*A*0502 / A*0504 - A*0518*). Ferner trägt das Tier 2146 das *Mamu-A3*-Gen mit dem Allel *Mamu-A*1303*. Das *Mamu-A4*-Gen konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (vergl. Abb. 4.25).

Tab. 4.5: Ergebnisse der *Mamu-A*-Genotypisierung der Tiere 2136 und 2146

Gen (Otting <i>et al.</i> , 2007)	Allel (% Identität zur angegebenen Referenzsequenz)	2136	2146
<i>Mamu-A1</i>	A*01 (97 % AF157401)	-	+
<i>Mamu-A1</i>	A*08 (99 % AF243179)	-	+
<i>Mamu-A1</i>	A*11 (99 % AF199357)	+	-
<i>Mamu-A1</i>	A*0402 (100 % EU262738)	+	-
<i>Mamu-A3</i>	A*1303 (98 % AF157401)	-	+
<i>Mamu-A4</i>	A*1403 (96 % EF580138)	+	-
<i>Mamu-A2</i>	-	+	+

PCR-basiert sowie mit Hilfe von Klonierungen und Sequenzierungen konnte so nachgewiesen werden, dass die beiden untersuchten Rhesusaffen einen sehr unterschiedlichen Genotyp in der MHC-Klasse-I-A-Region aufweisen. In Tabelle 4.5 sind die jeweils vorhandenen *Mamu-A*-Gene mit den identifizierten Allelen (soweit bekannt) angegeben. Sowohl ihre allelische als auch ihre Genausstattung unterscheiden sich dabei stark. Der Rhesusaffe 2136 hat die Gen-Locus-Kombination *A1* / *A2* / *A4*. Demgegenüber weist der Rhesusaffe 2146 neben *A1* und *A2* den Gen-Locus *A3* auf (Abb. 4.25).

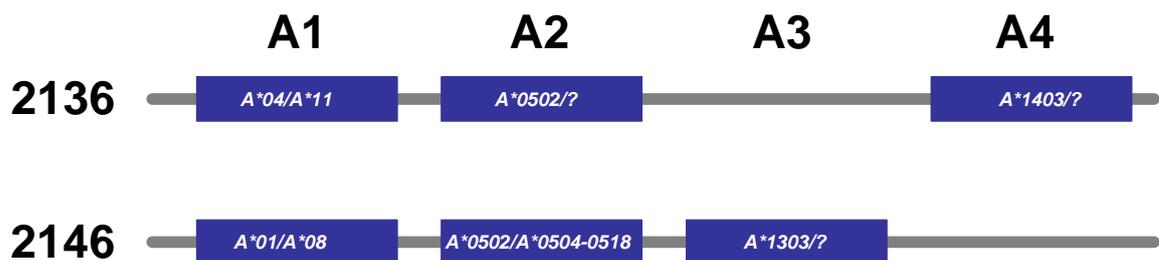


Abb. 4.25: Schematische Darstellung der genetischen *Mamu-A*-Konfigurationen der untersuchten Tiere. Der Rhesusaffe 2136 weist die Gene *Mamu-A1*, -*A2* und -*A4* auf, Rhesusaffe 2146 die Gene *Mamu-A1*, -*A2* und -*A3*. Die beiden Tiere sind heterozygot für das *Mamu-A1*-Gen und vermutlich auch für das *Mamu-A2*-Gen. Die Gene *Mamu-A3* und -*A4* liegen wahrscheinlich entweder homozygot oder hemizygot vor. Die Darstellung gibt keine Haplotypen wieder.

4.5 Erkennung einzelner Mamu-A-Moleküle durch KIR-Fusionsproteine

Beide verwendeten immunologischen Testverfahren konnten, trotz interner Schwankungen, zeigen, dass Mamu-A-Moleküle offensichtlich als Liganden von NK-Zellrezeptoren erkannt werden und in der Lage sind, die Aktivierung von NK-Zellen zu vermindern. Beim Menschen spielen KIR-Moleküle eine Hauptrolle bei der Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen durch NK-Zellen. Daher wurden diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit für spezifische Bindungsstudien ausgewählt.

4.5.1 Spezifische Interaktion von Mamu-A-Molekülen und rekombinanten KIR-Ig-Fusionsproteinen

Für den experimentellen Nachweis von spezifischen Interaktionen zwischen Mamu-A- und KIR-Molekülen standen KIR-Ig-Fusionsproteine des Rhesusaffen zur Verfügung (bereitgestellt von Philip Kruse und Meike Hermes, FG Primatengenetik, DPZ). Bei der Herstellung wurden die für die Ig-Domänen verschiedener KIR-Moleküle kodierenden Exons in einen Expressionsvektor kloniert, der zusätzlich die Information für den konstanten Teil des humanen Schwereketten-Immunglobulins enthält und die Expression eines Homodimers in humanen Zellen ermöglicht. Die *leader*-Sequenz des humanen IL-2 gewährleistete dabei die Sekretion der KIR-Ig-Fusionsproteine in den Zellüberstand. Zur Expression wurde die humane Zelllinie HEK293 gewählt. Die KIR-Ig-Fusionsproteine wurden mit Hilfe einer Protein-A-Sepharose-Säule aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt und anschließend im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Erhöhung der Nachweisgrenze multimerisiert. Dabei kann biotinyliertes Protein-A mehrere Fusionsproteine über deren Ig-Anteil binden.

Mit Hilfe dieses Analyseansatzes wurde getestet, ob die etablierten Mamu-A-Transfektanten (s. Kap. 4.2) Liganden für die zur Verfügung gestellten rekombinanten KIR-Moleküle sind. Der Nachweis am Durchflusszytometer erfolgte über PE-Cy5.5-gekoppeltes Streptavidin. Ein schematischer Versuchsablauf ist in Abbildung 4.26 dargestellt.

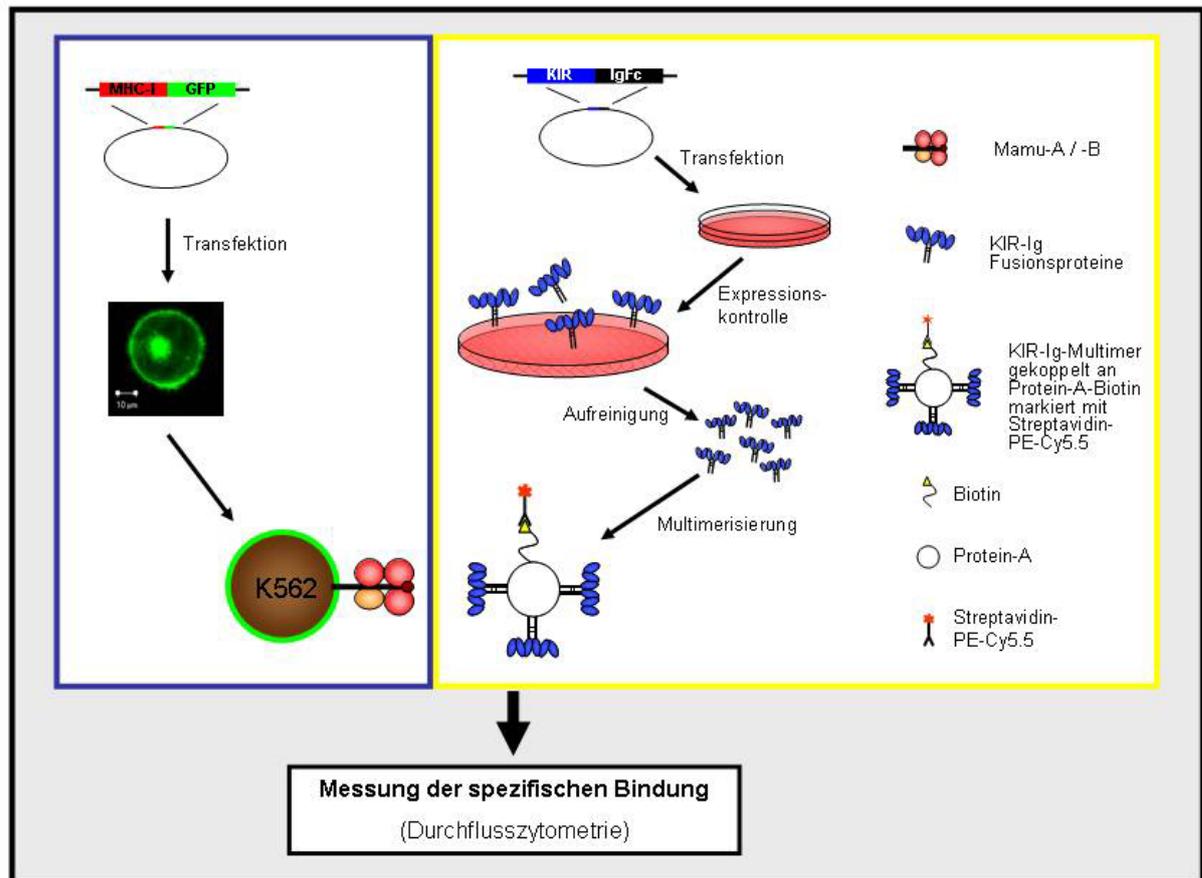


Abb. 4.26: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Messung von Interaktionen zwischen Mamu-A-Molekülen und KIR-Ig-Fusionsproteinen.

Der blau eingefasste Teil zeigt die Bereitstellung von Mamu-A-Transfektanten in K562-Zellen mit C-terminalem AcGFP (s. Kap. 4.2). Der gelb eingefasste Teil gibt schematisch die Generierung von KIR-Ig-Fusionsproteinen in HEK293-Zellen wieder. Die Aufreinigung erfolgte über Protein-A-Sepharose-Säulen. Die aufbereiteten KIR-Ig-Fusionsproteine (bereitgestellt von Philip Kruse und Meike Hermes, FG Primatengenetik, DPZ) wurden mittels Biotin-gekoppeltem Protein-A multimerisiert. Der Nachweis erfolgte am Durchflusszytometer über PE-Cy5.5-gekoppeltes Streptavidin.

Zur Verfügung standen drei verschiedene KIR-Ig-Proteine, KIR3DLneu1, KIR3DLneu3 und KIR3DLneu7, die jeweils drei Ig-Domänen aufwiesen. Die zur Generierung der Fusionsproteine verwendeten cDNA-Sequenzen beinhalteten bei allen drei KIR einen langen zytoplasmatischen Schwanz. Dieser strukturelle Aufbau charakterisiert sie als inhibierende NK-Zellrezeptoren (s. Kap. 1.4.2.1). Auf weitere Eigenheiten der zur Verfügung gestellten KIR-Ig-Fusionsproteine wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

Abbildung 4.27 zeigt ein von drei unabhängigen Experimenten, mit jeweils gleichen Tendenzen. In die Auswertung wurden alle lebenden, AcGFP-positiven Zellen einbezogen und hinsichtlich ihrer mittleren PE-Cy5.5-Fluoreszenz (MFI) untersucht. Als Referenzwert wurden untransfizierte K562-Zellen in die Auswertung miteinbezogen. Alle Transfektanten wurden zur Kontrolle auf unspezifische Bindung mit Biotin-gekoppeltem Protein-A, angefärbt mit Streptavidin-PE-Cy5.5 (schwarze Kurve), und mit einem multimerisierten KIR-

negativen Zellkulturüberstand (graue Kurve) behandelt (s. Kap. 3.2.10). In Abbildung 4.27 wurden je Einzelabbildung die MFI der beiden oben beschriebenen Kontrollen und die der KIR-Ig-Multimer-behandelten Zellen als Histogramme übereinander gelegt. Die MFI der mit KIR-Ig-Multimeren behandelten Mamu-A-Transfektanten abzüglich der MFI der jeweiligen Kontrollen, korreliert mit der Stärke der KIR-Ig-Bindung an die behandelten Zellen und wurden als Differenz der MFI-Werte für jede histographische Auswertung als D MFI-Wert angegeben.

Die Auswertung zeigt, dass sowohl die Zugabe der beiden Kontrollen zu den einzelnen Transfektanten als auch die Behandlung der untransfizierten Zellen mit KIR-Ig-Multimeren keine signifikante Erhöhung der MFI hervorrief. Eine deutliche Erhöhung der D MFI-Werte konnte nur für die mit KIR3DLneu3-Multimeren inkubierten Transfektanten Mamu-A*01 und Mamu-A*1303 nachgewiesen werden. Mamu-A*01-Transfektanten wiesen einen D MFI-Wert von 59 auf und Mamu-A*1303-Transfektanten demonstrierten eine Zunahme der MFI um 39. Zusätzlich konnte eine leichte Erhöhung für Mamu-A*1403-exprimierende Zellen behandelt mit KIR3DLneu1 (D MFI = 5) bzw. mit KIR3DLneu3 (D MFI = 7) dargestellt werden. Für alle weiteren Mamu-A-KIR-Kombinationen konnten keine Zunahmen der D MFI-Werte beobachtet werden.

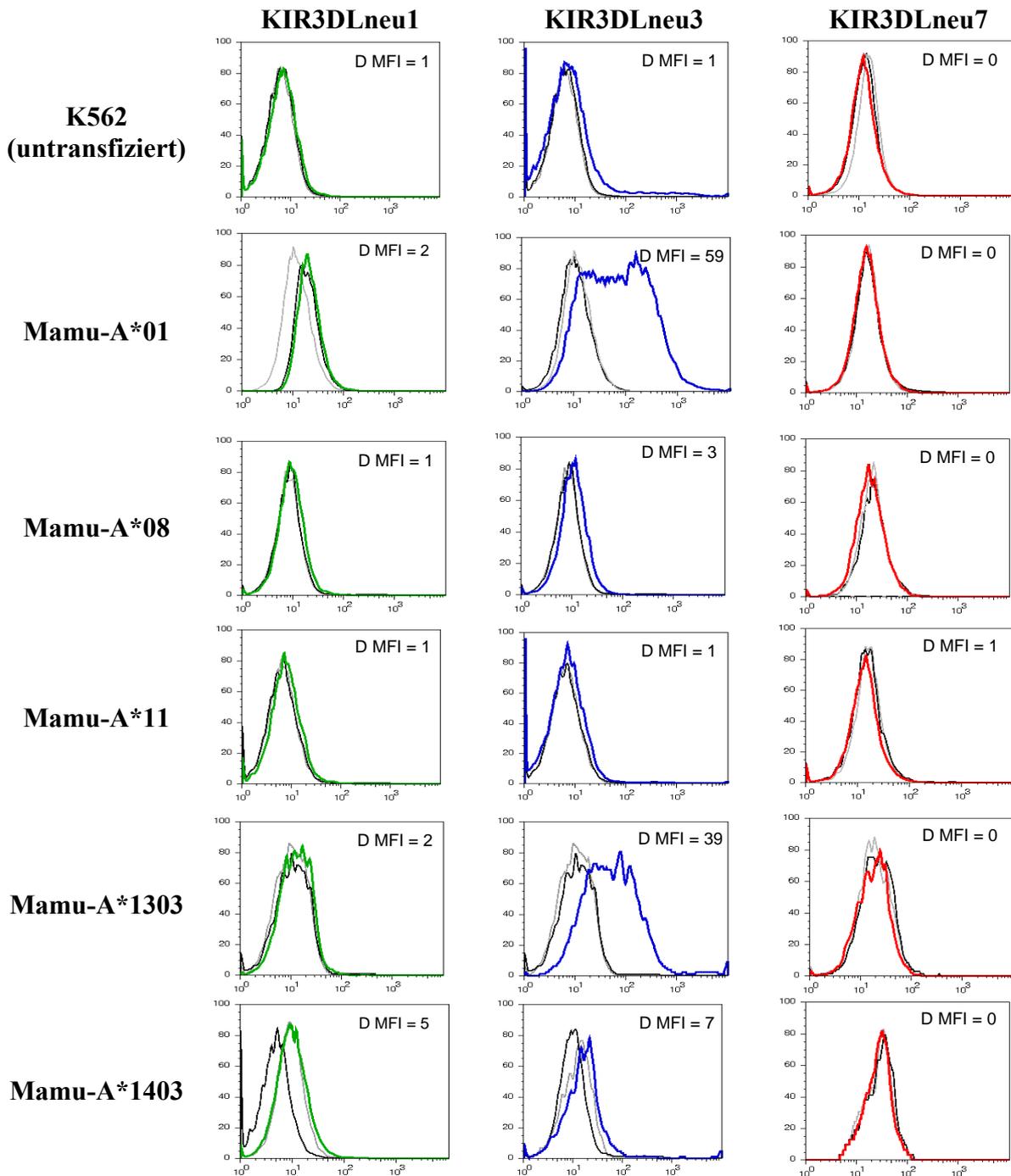


Abb. 4.27: Analyse der spezifischen Bindung rekombinanter Rhesusaffen KIR-Ig-Fusionsproteine an verschiedene Mamu-A-Moleküle.

In Interaktionsversuchen wurden je 5×10^5 Zellen der Transfektanten Mamu-A*01, -A*08, -A*11, -A*1303 und -A*1403 sowie untransfizierte K562-Zellen mit $10 \mu\text{g}$ KIR-Ig-Multimer parallel zu einer ebenfalls multimerisierten KIR-negativen Kontrolle (schwarze Linie) und einer Kontrolle auf unspezifische Bindung (PE-Cy5.5-markiertes Biotin-gekoppeltes Protein-A alleine; graue Linie) inkubiert. Je Messung wurden 3×10^4 Ereignisse aufgenommen und in Auswertungen alle lebenden, AcGFP-positiven Zellen einbezogen. Die histogrammischen Abbildungen zeigen die mittleren PE-Cy5.5-Fluoreszenzintensitäten (MFI) der einzelnen Mamu-A-Transfektanten im Vergleich zu den MFI der beiden Kontrollen. Eine Zunahme der MFI im Vergleich zu den Kontrollen wurde durch die Differenz der MFI-Werte angegeben (D MFI). Farbige Linien geben jeweils die MFI von Zellen inkubiert mit KIR-Ig-Multimeren an (grün: KIR3DLneu1, blau: KIR3DLneu3, rot: KIR3DLneu7). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

4.5.2 Die Stärke der KIR-Bindung ist abhängig von der Stärke der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression

Nach dem erfolgreichen Nachweis einer spezifischen KIR-Bindung an Mamu-A-Moleküle war zu klären, ob die Stärke der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression einen Einfluss auf die Stärke der KIR-Bindung hat. Daher wurden die Transfektanten Mamu-A*01 und Mamu-A*1303, inkubiert mit KIR3DLneu3, einer genaueren Analyse unterzogen. Die Abbildung 4.28 zeigt beispielhaft die Auswertung für Mamu-A*01-exprimierende K562-Zellen inkubiert mit multimerisiertem KIR3DLneu3.

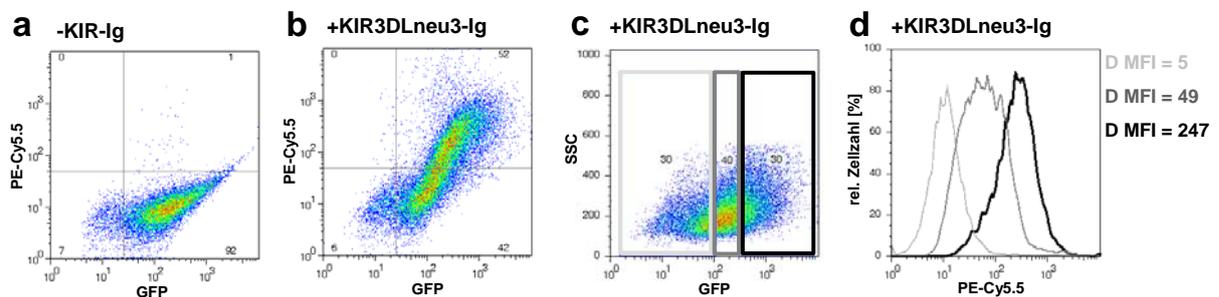


Abb. 4.28: Die Stärke der KIR-Bindung steht in Abhängigkeit zur MHC-Klasse-I-Expressionsstärke.

Auswertungen von durchflusszytometrischen Analysen der Mamu-A*01-Transfektante mit KIR3DLneu3. (a) und (b) zeigen *dotblot*-Auswertungen der AcGFP-Expressionsstärke aufgetragen gegen die PE-Cy5.5-Fluoreszenz von Mamu-A*01-AcGFP-exprimierenden Zellen inkubiert mit (a) der Kontrollmultimerisierung (aufgereinigter KIR-negativer Zellkulturüberstand) und mit (b) der KIR3DLneu3-Multimerisierung. In (c) ist die AcGFP-Expressionsstärke gegen den SSC aufgetragen und es wurden drei Zellpopulationen mit zunehmender AcGFP-Expressionsstärke definiert. Diese Populationen wurden einzeln hinsichtlich ihrer PE-Cy5.5-Fluoreszenz analysiert (d). Die histogrammische Darstellung zeigt deutlich eine Abhängigkeit der PE-Cy5.5-Fluoreszenzstärke von der GFP-Expressionsstärke. Die hellgraue Linie umfasst Zellen mit niedriger AcGFP-Expression, die dunkel-graue Linie Zellen mit mittlerer GFP-Expression und die schwarze Linie Zellen mit hoher AcGFP-Expression.

Die linke Darstellung zeigt einen *dotblot*, in dem die AcGFP-Fluoreszenzstärke gegen die PE-Cy5.5-Fluoreszenzstärke von Mamu-A*01 exprimierenden Zellen, inkubiert mit der Kontrollmultimerisierung, aufgetragen ist (Abb. 4.28a). Anhand dieser Abbildung wurden vier Quadranten definiert, sodass sich 99 % der Zellen in den unteren beiden Quadranten befanden. Abbildung 4.28b zeigt die gleiche Auswertung für Mamu-A*01-exprimierende Zellen, inkubiert mit KIR3DLneu3-Multimeren. Hier fanden sich 52 % der Zellen im oberen rechten Quadranten, 42 % verblieben im unteren rechten Quadranten. Die Darstellung zeigt, dass mit zunehmender AcGFP-Fluoreszenzstärke, d. h. mit zunehmender MHC-Klasse-I-Expression, auch die PE-Cy5.5-Fluoreszenzstärke zunahm. Eine detailliertere Auswertung wurde in den Abbildungen 4.28c und 4.28d vorgenommen. In Abbildung 4.28c wurde die AcGFP-Fluoreszenzstärke gegen den *sideward scatter* im *dotblot* aufgetragen und drei

Zellpopulationen mit zunehmender AcGFP-Fluoreszenzstärke, d. h. mit zunehmender Mamu-A-Expressionsstärke, definiert (hellgrauer, dunkelgrauer und schwarzer Kasten). Betrachtete man die mittleren PE-Cy5.5-Fluoreszenzintensitäten dieser Einzelpopulationen getrennt voneinander, so zeigte sich, dass die schwach AcGFP-positive Zellpopulation auch eine schwache PE-Cy5.5-MFI aufwies (D MFI = 5). Die Zellpopulation mit mittlerer AcGFP-Fluoreszenzstärke wies eine etwas höhere PE-Cy5.5-MFI auf (D MFI = 49) und die stark AcGFP-positiven Zellen wiesen die höchste PE-Cy5.5-MFI auf (D MFI = 247). Damit konnte gezeigt werden, dass die KIR-Bindung, dargestellt durch die PE-Cy5.5-Fluoreszenzintensität, von der Stärke der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression, dargestellt durch die Stärke der Fluoreszenz des AcGFP-Anteils des Fusionsproteins, abhängt.

4.5.3 Analyse der *Mamu-A*-Sequenzen hinsichtlich der KIR-Bindung

In den Interaktionsstudien mit Mamu-A- und KIR-Molekülen konnten eindeutige spezifische Bindungen zwischen KIR3DLneu3 und Mamu-A-Molekülen Mamu-A*01 und Mamu-A*1303 nachgewiesen werden. Zudem wurden schwache Interaktionen zwischen Mamu-A*1403 und KIR3DLneu1 bzw. KIR3DLneu3 identifiziert (vergl. Abb. 4.27). Dies wirft die Frage auf, ob diese Liganden Gemeinsamkeiten haben, die sie von den anderen verwendeten Mamu-A-Molekülen unterscheiden. Daher werden in diesem Kapitel die in Frage kommenden Regionen der AS-Sequenz der verschiedenen Mamu-A-Sequenzen vergleichend betrachtet.

Von HLA-C-Interaktionen mit KIR2DL-Molekülen sind die an der Bindung beteiligten Regionen durch Analysen der Kristallstruktur bekannt (Boyington *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2001). Wie in Kapitel 1.5 erläutert, erfolgt die Bindung hauptsächlich über die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne. Eine entscheidende Rolle übernimmt dabei die AS an Position 80 des HLA-C, die über Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrückenbindungen an die D1-Domäne des KIR2DL bindet. Auch für HLA-A- und HLA-B-Moleküle, die mit den KIR3DL-Molekülen interagieren (Thananchai *et al.*, 2007), konnte gezeigt werden, dass die Position 80 bei der Interaktion eine entscheidende Rolle übernimmt (Cella *et al.*, 1994; Luque *et al.*, 1996). Tabelle 4.6 vergleicht das Vorkommen von verschiedenen AS an der Position 80 der menschlichen und der Makaken MHC-Klasse-I-Moleküle je nach der Gen- bzw. Region-Zugehörigkeit.

Die humanen HLA-Sequenzen unterscheiden sich hinsichtlich der AS an der Position 80 in Abhängigkeit von ihrer Gen-Zugehörigkeit. HLA-A-Moleküle weisen einen Dimorphismus zwischen Threonin (T) und Isoleucin (I) auf. HLA-B-Moleküle präsentieren das größte Spektrum an AS an der Position 80 auf. Sie können Threonin, Isoleucin, Asparagin (N) oder Lysin (K) an der Position 80 exprimieren. HLA-C-Moleküle, deren Gen-Locus beim Rhesusaffen nicht vorliegt (Daza-Vamenta *et al.*, 2004), zeigen einen Dimorphismus zwischen Asparagin und Lysin.

Vergleicht man diese Beobachtungen mit allen bisher verfügbaren MHC-Klasse-I-Sequenzen des Rhesusaffen, fällt auf, dass sich nur drei AS, die auch beim Menschen vorkommen, hier wiederfinden. Mamu-A-Moleküle haben ein Threonin oder ein Asparagin an der Position 80. Mamu-B-Moleküle weisen Threonin, Asparagin oder Isoleucin auf. Jedoch konnte bisher keine Sequenz mit einem für die evolutionsgeschichtlich jüngeren HLA-C-Moleküle typischen Lysin gefunden werden (Adams *et al.*, 1999).

Tab. 4.6: AS an der Position 80 der MHC-Klasse-I-Moleküle bei Mensch und Rhesusaffe.

	Kl. I-Region	Threonin (T)	Asparagin (N)	Isoleucin (I)	Lysin (K)
Mensch	HLA-A	+		+	
	HLA-B	+	+	+	+
	HLA-C		+		+
Rhesusaffe	Mamu-A	+	+		
	Mamu-B	+	+	+	

Für die Position 80 lässt sich festhalten, dass Mamu-A-Moleküle hier AS mit ungeladenen polaren Seitenketten (N oder T) aufweisen. Für Mamu-B-Moleküle konnte neben Asparagin und Threonin auch Isoleucin, das eine aliphatische unpolare Seitenkette trägt, nachgewiesen werden. Das für HLA-C2- und einige HLA-B-Typen charakteristische Lysin zeigt als einzige der vier AS eine positiv geladene, polare Seitenkette und konnte in keiner Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Sequenz nachgewiesen werden.

Die in den Interaktionsstudien eingesetzten *Mamu-A*-Sequenzen präsentieren an Position 80 unterschiedliche AS. Mamu-A*01 und -A*11 weisen ein Threonin auf, wohingegen Mamu-A*08, -A*1303 und -A*1403 ein Asparagin aufweisen. Somit demonstrieren auch die KIR3DLneu3-Liganden Mamu-A*01 und Mamu-A*1303 unterschiedliche AS an der Position 80.

Eine detailliertere Betrachtung der gesamten KIR-bindenden Sequenz ist in Abbildung 4.29 dargestellt. Die Analyse erfolgte in Anlehnung an die in Kristallstrukturanalysen von HLA-C-KIR-Komplexen identifizierten, an der Bindung beteiligten, AS-Reste (Boyington *et al.*,

2000; Fan *et al.*, 2001). Von allen etablierten Mamu-A-Transfektanten und von einigen HLA-Molekülen, die unterschiedliche Epitope in diesen Sequenzbereichen exprimieren, wurden diese AS-Regionen in der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne verglichen. Die Position 80 wurden rot hervorgehoben und serologische Epitope, die bei der Bindung von HLA-A- und HLA-B-Molekülen an KIR3DL eine entscheidende Rolle spielen (Gumperz *et al.*, 1995), wurden blau (Bw6⁺) bzw. gelb (Bw4⁺) hinterlegt. Soweit bekannt wurden für die humanen Sequenzen die spezifischen NK-Zellrezeptoren angegeben.

Unter den hier etablierten Mamu-A-Transfektanten tragen Mamu-A*01 und -A*11 das Bw4⁺-Epitop. Mamu-A*1303 exprimiert das Bw6⁺-Epitop, während Mamu-A*08 und -A*1403 an den AS-Positionen 79 bis 83 keines der beiden Epitope aufweisen.

Allel	$\alpha 1$ -Domäne	$\alpha 2$ -Domäne	NK-Rezeptor
AS-Position	67 86	142 153	
HLA-Cw*0303 (C1)	YKRQAQTD ^{gr} RVSLRN ^{gr} LRGYYN	ITQRKWEAAREA	KIR2DL2/2DL3
HLA-B*1502(D50293) A*1303	S.TNT..Y.E.....	
HLA-B*27(AM689935)	M.TET.NAP.A.....	N.....DV.	
HLA-B*44(AJ535113)	C.AK.....ED..T.LR...V.	
HLA-A*2403(AF030913)	S.TNT..Y.EN..TALR...V.	KIR3DL1
Mamu-A*01	V.AHS.....EN..IALR...	I.K.....HV.	
A*11	M.TET.NAP.N..T.LR...	N.....DV.	
HLA-Cw*0401 (C2)	S.ANT..Y.EN..TALR...	N.....GV.	
HLA-A*03(EU305401)A...N..K.....	KIR2DL1/2DS1
A*08	V.A.S.....D.GT.....	..K.....H..	KIR3DL1
A*1403	..AAT.NY.EG.Q.....	N.....G..	
	M.TAT.NAP.A...LR...	N.....GV.	

Abb. 4.29: Vergleich der Mamu-A- mit HLA-Sequenzen im Bereich der HLA-C-Interaktion mit KIR2DL. Der AS-Vergleich umfasst Sequenzregionen der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen von MHC-Klasse-I-Molekülen und wurde mit Hilfe des Computerprogramms *ClustalX 1.81* erstellt. Die bei HLA-Cw*3 (C1-Typ) und HLA-Cw*4 (C2-Typ) als Kontaktregionen identifizierten AS-Reste wurden grau hinterlegt (nach Boyington *et al.*, 2000; und nach Fan *et al.*, 2001). Neben den Sequenzen der Mamu-A-Transfektanten wurden HLA-Sequenzen mit unterschiedlichen Epitopen im Bereich der KIR-Bindung in die Abbildung miteinbezogen. HLA-Cw*0303 zeigt den C1-Typ, der mit KIR2DL2 und KIR2DL3 interagiert. HLA-Cw*0401 ist ein Beispiel für einen C2-Typ, der mit KIR2DL1 und KIR2DS1 interagiert. HLA-B*1502 trägt das Bw6⁺-Epitop (blau hinterlegt), HLA-B*44, -B*27, -Bw*53 und -A*2403 tragen das Bw4⁺-Epitop (gelb hinterlegt). Die Sequenz von Mamu-A*1303 zeigt als einzige der Transfektanten das Bw6⁺-Epitop. Dagegen weisen Mamu-A*01 und -A*11 das Bw4⁺-Epitop auf. Mamu-A*08 und -A*1403 besitzen weder das Bw4⁺- noch das Bw6⁺-Epitop.

Obwohl Mamu-A*01 und -A*1303 als Liganden des gleichen NK-Zellrezeptors identifiziert wurden, weisen ihre Sequenzen in den in Abbildung 4.29 dargestellten untersuchten Bereichen keine auffälligen Ähnlichkeiten auf. Weder exprimieren sie das gleiche Epitop, noch haben sie die gleiche AS an der Position 80. Somit scheint diese Region, die für die HLA-C-Interaktion mit KIR2DL-Molekülen entscheiden ist, bei der Interaktion von Mamu-A- und Rhesusaffen KIR3DL-Molekülen keine entscheidende Rolle zu spielen. Daher wurde im Folgenden ein Vergleich der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne der verwendeten Mamu-A-Sequenzen

direkter Sequenzvergleich der α 1- und α 2-Domänen konnte jedoch einige gemeinsame AS-Reste identifizieren, die für die spezifische Bindung des gemeinsamen Rezeptors KIR3DLneu3 verantwortlich sein könnten (z. B. Position 70).

DISKUSSION

In der folgenden Diskussion wird zunächst auf die methodisch bedingten Limitierungen bei der Gewinnung von Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Sequenzen und die genomische Einordnung dieser Sequenzen eingegangen. In einem zweiten Abschnitt werden die Ergebnisse zur subzellulären Lokalisation der etablierten Transfektanten in Zusammenhang mit den aus den Sequenzanalysen gewonnenen Erkenntnissen diskutiert. Abschließend werden die Ergebnisse zur Interaktion von MHC-Klasse-I-Molekülen mit Rezeptoren auf NK-Zellen diskutiert und die spezifischen Interaktionen mit KIR kritisch analysiert.

5.1 Gewinnung von MHC-Klasse-I-Sequenzen des Rhesusaffen und deren genomische Einordnung

Zur Gewinnung von MHC-Klasse-I-Genen aus cDNA von Rhesusaffen wurden Oligonukleotide basierend auf Konsensus-Sequenzen verwendet. Aus dieser Methode ergeben sich verschiedene Einschränkungen für die daraus hervorgehenden Ergebnisse. Zum einen führt die Amplifikation von ganzen Gengruppen aus cDNA zu einem Pool an PCR-Produkten. Die unterschiedlichen Transkriptionsraten der einzelnen Gene spiegeln sich auch in der Häufigkeit der jeweiligen Sequenz in dem generierten PCR-Pool wieder. Eine hohe Transkriptionsrate führt zu einer hohen Anzahl der entsprechenden mRNA, die in Folge der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben wird. Die Verhältnisse der Kopienanzahl der einzelnen Gene in der cDNA spiegeln daher weitestgehend die Verhältnisse der mRNA-Mengen dieser Gene wieder. Da die Methode der PCR jede, für die Oligonukleotide passende, cDNA-Sequenz (hier die einzelnen Sequenzen der MHC-Klasse-I-Gengruppe) als *template* verwendet, wird der quantitative Unterschied in der Transkriptionsanzahl von verschiedenen Genen der Gengruppe durch die exponentielle Vermehrung der PCR-Produkte zusätzlich verstärkt. Die Wahrscheinlichkeit eine Gensequenz zu entdecken, sinkt daher mit abnehmender Transkriptmenge sowie mit zunehmender Zyklenzahl. Zur Amplifikation von MHC-Klasse-I-Sequenzen wurden maximal 30 Zyklen verwendet, da mit zunehmender Zyklenzahl auch die Gefahr von Fehlern beim Nukleotideinbau durch die Taq-DNA-Polymerase zunimmt. Transkriptionelle Unterschiede der vielen MHC-Klasse-I-Gene des Rhesusaffen wurden oft diskutiert und Anhalte dafür finden sich zum Teil in der Literatur

(Daza-Vamenta *et al.*, 2004; Urvater *et al.*, 2000b). Ein tatsächlicher Vergleich der Transkriptionsraten, z. B. über *real-time*-PCR, liegt jedoch noch nicht vor.

Zum anderen stellen die verwendeten Oligonukleotide ein weiteres Ausschlusskriterium dar. Sie basieren auf Konsensus-Sequenzen, gebildet aus allen bisher bekannten Sequenzen der einzelnen MHC-Klasse-I-Regionen (s. Kap. 4.1.1). Nicht alle Gensequenzen entsprechen in allen Basenpaarpositionen den Sequenzen der Oligonukleotide, sodass die Amplifikation solcher Sequenzen sehr problematisch bzw. oft unmöglich ist. Vor allem die Amplifikation neuer, noch unbekannter MHC-Klasse-I-Sequenzen kann durch eine solche Vorgehensweise erschwert werden. Wurde eine Sequenz mit offenem Leserahmen amplifiziert, bleibt zu berücksichtigen, dass der artifizielle Einbau der Primersequenz in die MHC-Klasse-I-Sequenz die Originalsequenz geringfügig verändert haben könnte. Die ersten und letzten 13 bis 19 Basenpaare des Amplifikats wurden durch die konstruierten Primer vorgegeben und müssen daher nicht zwangsläufig den einzelnen Originalsequenzen entsprechen. Dies konnte nur dann verifiziert werden, wenn eine vollständige Version des jeweiligen Gens bereits veröffentlicht und zugänglich war.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach der Isolation die gewonnenen MHC-Klasse-I-Sequenzen zunächst mit allen bereits veröffentlichten Sequenzen verglichen. Bis auf zwei Sequenzen konnten alle einer bereits zugänglichen Sequenz zugeordnet werden. Des Weiteren zeigte sich, dass die zwei Sequenzen mit der Bezeichnung Mamu-B*7402 und Mamu-80-6 in der Literatur als Pseudogene beschrieben wurden (Kulski *et al.*, 2004; Sauer mann *et al.*, 2008). Bei diesen beiden Sequenzen konnte nach einer detaillierteren Analyse der in dieser Arbeit gewonnenen Transkripte ebenfalls kein vollständiger Leserahmen identifiziert werden und die Sequenzen wurden daher von allen weiteren Analysen ausgeschlossen.

Alle Transkripte mit offenem Leserahmen wurden im Folgenden mit genomischen Sequenzen verglichen werden, um eine lokale Zuordnung in der MHC-Klasse-I-Region zu ermöglichen. Dies sollte Auskünfte über die Bandbreite der hier untersuchten Gene liefern. Die Nomenklatur der MHC-Klasse-I-Gene des Rhesusaffen ist wenig einheitlich und lässt bisher meist keine Rückschlüsse auf Gen- bzw. Locus-Zugehörigkeiten zu. Erst durch die Sequenzierung vollständiger genomischer Regionen gelingt auch die genomische Einordnung von cDNA-Sequenzen. Für Rhesusaffen wurde bereits ein vollständiger Haplotyp der MHC-Region sequenziert (Daza-Vamenta *et al.*, 2004; Kulski *et al.*, 2004), jedoch zeigen Rhesusaffen in der Klasse-I-Region einen so genannten An- und Abwesenheitspolymorphismus (Otting *et al.*, 2005). Dieses Phänomen ist auch für andere Regionen, wie z. B. die KIR-Region (Parham, 2005), und auch von anderen Spezies bekannt (Roos und

Walter, 2005; Trowsdale, 2001). Im Fall des Rhesusaffen MHC weisen einzelne Haplotypen dabei eine unterschiedliche Zahl an Genen in den beiden MHC-Klasse-I-Regionen auf. Für die *Mamu-A*-Region wurden im Jahr 2005 vier Gen-Loci definiert, die in unterschiedlichen Kombinationen auftreten können (Otting *et al.*, 2005). Für die komplexere *Mamu-B*-Region ist dies noch nicht gelungen. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass Haplotypen vielfältige Gen-Kombinationen aufweisen können und, dass die einzelnen *Mamu-B*-Gene, wie auch die *Mamu-A*-Gene, unterschiedlich polymorph sind und unterschiedlich stark exprimiert werden (Otting *et al.*, 2005; Urvater *et al.*, 2000b).

In dieser Arbeit gelang mit Hilfe des sequenzierten Haplotyps die eindeutige Zuordnung von zwei isolierten *Mamu-A*-Sequenzen. Die Sequenz von *Mamu-A*01* entspricht dem *A1*-Gen des Haplotyps und *Mamu-A*0504* ist identisch mit dem *A2*-Gen (vergl. Abb. 4.4b). Durch serologische Untersuchungen in Kombination mit cDNA-Analysen konnten Otting und Mitarbeiter (2005) vier verschiedene Gen-Loci in der *Mamu-A*-Region von Rhesusaffen definieren. Diese Entdeckung ermöglichte die Zuordnung aller weiteren in dieser Arbeit isolierten *Mamu-A*-Sequenzen zu den verschiedenen Gen-Loci. *Mamu-A*04*, *-A*08* und *-A*11* sind danach wie *Mamu-A*01* Allele des *A1*-Gens. Das *Mamu-A1*-Gen wird von Otting und Mitarbeitern (2005) als sehr polymorph beschrieben und die Sequenzen der einzelnen Allele unterscheiden sich stark auf Nukleotidebene. Dies spiegelt sich auch in der großen Variabilität der Sequenzen *Mamu-A*01*, *-A*04*, *-A*08* und *-A*11* wieder (vergl. Abb. 4.4b). Das in der genomischen Sequenz als *A2* bezeichnete Gen wurde von Otting und Mitarbeitern mit einem mäßigen Grad an Polymorphismus beschrieben. Für dieses Gen wurden neben *Mamu-A*0504* keine weiteren Sequenzen isoliert. Die bei Otting und Mitarbeitern beschriebenen Gene *A3* und *A4* lagen in der haplotypischen Sequenz nicht vor (vergl. Abb. 4.4a). Das *A3*-Gen wird als wenig polymorph charakterisiert. Diesem Gen konnte die isolierte Sequenz *Mamu-A*1303* zugeordnet werden. Das *Mamu-A4*-Gen wird als einziges *Mamu-A*-Gen als nicht-polymorph beschrieben und konnte mit der Sequenz *Mamu-A*1403* in dieser Arbeit isoliert werden.

Von den vier beschriebenen *Mamu-A*-Genen war allein das *A1*-Gen in allen bisher definierten Haplotypen vorhanden (Otting *et al.*, 2007; Otting *et al.*, 2005). Diese Konservierung des *A1*-Gens im Genom des Rhesusaffen konnte auch im Rahmen dieser Arbeit durch die *Mamu-A*-Genotypisierung von zwei Rhesusaffen bestätigt werden (s. Kap. 4.4). Beide Tiere konnten für das *A1*-Gen als heterozygot genotypisiert werden, wobei sie keines der *Mamu-A1*-Allele gemeinsam hatten. Einer der beiden Rhesusaffen wurde für die Genkombination *A1/A4* typisiert. Das andere Tier wies eine Kombination aus den Genen *A1*, *A2* und *A3* auf

(vergl. Abb. 4.25). Durch diese großen genotypischen Unterschiede in der *Mamu-A*-Region war die vergleichende Verwendung von Lymphozyten der beiden Rhesusaffen in immunologischen Tests mit *Mamu-A*-Transfektanten von besonderem Interesse (s. Kap. 4.3.2).

Allelspezifische Typisierungen wurden nur für Sequenzen der etablierten *Mamu-A*-Transfektanten *Mamu-A*01*, *-A*08*, *-A*11*, *-A*1303* und *-A*1403* durchgeführt. Durch die Isolierungen von MHC-Klasse-I-Sequenzen aus cDNA war bereits im Vorfeld bekannt, dass der Rhesusaffe 2146 die Allele *Mamu-A*01* und *Mamu-A*08* und der Rhesusaffe 2136 die Allele *Mamu-A*11* und *Mamu-A*04* exprimiert. Betrachtet man die relativen Anteile der einzelnen *Mamu-A*-Gene an der Gesamtmenge der klonierten *Mamu-A*-Sequenzen, fällt auf, dass in 90 % der Fälle Sequenzen des *A1*-Gens isoliert wurden. Dies kann zum einen auf die hohe Transkriptionsrate des *A1*-Gens, zum anderen auf die große Verbreitung dieser drei Allele in der verwendeten Rhesusaffenkohorte zurückzuführen sein. Für das *Mamu-A2*-Gen konnten beide Tiere als positiv typisiert werden. Eine nähere Charakterisierung wurde nicht vorgenommen, da Allele des *A2*-Gens nicht in immunologische Tests miteinbezogen wurden. Der Rhesusaffe 2136 weist zusätzlich das *Mamu-A4*-Gen mit der Sequenz *Mamu-A*1403* auf. Dagegen besitzt das Tier 2146 mit der Sequenz *Mamu-A*1303* das *Mamu-A3*-Gen. Die Gene *Mamu-A2*, *Mamu-A3* und *Mamu-A4* wurden nur mit jeweils einer Sequenz in insgesamt 10 % der Klone identifiziert. Eine gegenüber dem *A1*-Gen geringere Transkriptionsrate wurde bereits von Otting und Mitarbeitern (2005) beschrieben. Ebenso finden sich Belege für eine geringere Transkriptionsrate des *A2*-Gens. So konnten Lafont und Mitarbeitern für das dem Rhesusaffen *A2*-Gen orthologe Gen der Schweinsaffen (*Macaca nemestrina* (*Mane*), eine der 21 Makakenarten) eine sehr schwache Expressionsrate, im Vergleich zu anderen *Mane-A*-Genen nachweisen (Lafont *et al.*, 2007). Für Rhesusaffen liegen bisher noch keine vergleichenden Transkriptionsanalysen der MHC-Klasse-I-Gene vor. Für eine geringe Transkriptions- und Expressionsrate des *A2*-Gens spricht unter anderem auch die Tatsache, dass bisher, obwohl der Locus sehr häufig genotypisch detektiert wurde, noch keine Assoziation eines *A2*-Allels mit Krankheitsverläufen gezeigt werden konnte (Urvater *et al.*, 2000a). Eine besondere Rolle scheint auch dem *A4*-Gen zuzukommen. Als einziges *Mamu-A*-Gen wurde es als nicht-polymorph beschrieben (Otting *et al.*, 2005). Demnach weist dieses Gen einen eher nicht-klassischen Charakter auf und könnte unter den *Mamu-A*-Genen eine gesonderte Funktion übernehmen.

Neben den typisierten *Mamu-A*-Allelen bzw. -Genen könnten in beiden Rhesusaffen zusätzliche *Mamu-A*-Allele sowie -Gene vorhanden sein. So wurden z. B. für eine Gruppe

von Rhesusaffen chinesischen Ursprungs, diverse bei indischen Rhesusaffen zuvor nicht identifizierte, *Mamu-A*-Sequenzen isoliert und diese drei weiteren *Mamu-A*-Genen zugeordnet (Karl *et al.*, 2008; Otting *et al.*, 2007). Smith und Mitarbeiter (2005) konnten jedoch aufzeigen, dass sich chinesische und indische Rhesusaffen nicht nur in ihrer Morphologie sondern auch genetisch unterscheiden. Daher könnten sich diese beiden Untergruppen der Rhesusaffen auch in der Konfiguration der *Mamu-A*-Region unterscheiden. Um solche großen genetischen Variationen zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit nur indische Rhesusaffen verwendet. Für diese Tiere konnten in dieser Arbeit keine *Mamu-A*-Allele mit bisher unbekannter Sequenz nachgewiesen werden. Damit deuten auch die hier erhaltenen Ergebnisse daraufhin, dass die *Mamu-A*-Region indischer Rhesusaffen ein limitiertes Spektrum von Allelen in vier Genen aufweist. Dadurch unterscheidet sich die *Mamu-A*-Region deutlich von der *Mamu-B*-Region, deren Konfiguration bisher völlig ungeklärt ist.

Das *Mamu-A1*-Gen ist als einziges *Mamu-A*-Gen in allen bisher identifizierten Haplotypen vorhanden. Zusammen mit der hohen Expressionsrate und der großen sequenziellen Variabilität der verschiedenen Allele, legt dies die Vermutung nahe, dass MHC-Klasse-I-Moleküle, die von dem *Mamu-A1*-Gen kodiert werden, eine eher klassische Rolle bei der Antigenpräsentation und Interaktion mit T- und NK-Zellen zukommt (Evans *et al.*, 1999; Sette *et al.*, 2005; Sidney *et al.*, 2000). Im Hinblick auf die in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Untersuchungen mit *Mamu-A*-Molekülen lässt sich festhalten, dass in diese Analysen sowohl eher klassische MHC-Klasse-I-Moleküle (*Mamu-A*01*) des Rhesusaffen als auch vermutlich nicht-klassische (*Mamu-A*1403*) miteinbezogen wurden.

Für die in dieser Arbeit isolierten *Mamu-B*-Sequenzen war eine genomische Zuordnung deutlich schwerer. Dennoch konnten durch den phylogenetischen Vergleich mit den genomischen Sequenzen des sequenzierten Haplotyps Hinweise auf allelische Beziehungen einiger der isolierten Sequenzen zu einem Gen gewonnen werden (vergl. Abb. 4.4c). Die Sequenz *Mamu-B*12* ist nahezu identisch mit dem *B12*-Gen. Daher handelt es sich bei dieser Sequenz vermutlich um ein Allel des *B12*-Gens. *Mamu-B*30* und *-B*3002* sind wahrscheinlich Allele des *B15*-Gens. Bei allen anderen isolierten *Mamu-B*-Sequenzen gelang keine Genzuordnung. Bei diesen Sequenzen handelt es sich entweder um sehr diverse Allele eines Gens des beschriebenen Haplotyps, oder sie gehören einem in dem sequenzierten Haplotyp abwesenden Gen-Locus an. Des Weiteren konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Sequenzen mit größerer Ähnlichkeit zu den Genen *B3*, *B4*, *B5* und *B8* des Haplotyps isoliert werden. Diese genomischen Sequenzen bilden bei der phylogenetischen Auswertung eine eigene Gruppe, die sich deutlich von allen hier isolierten Sequenzen abgrenzt. Dennoch

könnten diese Gene auch bei einigen in dieser Arbeit verwendeten Tieren vorliegen und deren Transkription nur sehr schwach sein.

Die schwere genomische Einordnung der *Mamu-B*-Sequenzen unterstützt die Annahme von einem An- und Abwesenheitspolymorphismus in der Klasse-I-Region des Rhesusaffen MHC (Daza-Vamenta *et al.*, 2004) und deutet eine hohe Diversität der Kombinationen von Gen-Loci in der Klasse-I-B-Region an (Tanaka-Takahashi *et al.*, 2007).

Neben Sequenzen mit der typischen Exonstruktur der MHC-Klasse-I-Gene wurden zwei Transkripte ungewöhnlicher Struktur identifiziert, *Mamu-B*28-L* und *Mamu-B-NEU-TM* (s. Kap. 4.1.2.2). Beiden Transkripten fehlte jeweils ein Sequenzabschnitt, der eine komplette Domäne umfasst. Überraschenderweise konnten sowohl für *Mamu-B*28-L* als auch für *Mamu-B-NEU-TM* nahezu identische Sequenzen, die die gesamte Exonstruktur aufwiesen, isoliert werden (*Mamu-B*28+L* und *Mamu-B-NEU+TM*). Daher stellt sich die Frage nach der Entstehung solcher verkürzter Transkripte. Für das *Mamu-B*28*-ähnliche Transkript ohne *leader*-Sequenz (vergl. Abb. 4.14) kommen mehrere Möglichkeiten in Frage.

Aus methodischer Sicht kann ein Misspriming der verwendeten Oligonukleotide zu dieser Verkürzung geführt haben. Bei der PCR könnten die Oligonukleotide im Bereich von Intron 1 zwischen Exon 1 (kodiert für die *leader*-Sequenz) und Exon 2 (kodiert für die $\alpha 1$ -Domäne) in einem Transkript gebunden haben, in dem das Intron 1 nicht oder noch nicht herausgespleißt wurde. Ein Vergleich der Oligonukleotidsequenz mit der Sequenz von Intron 1 zeigt jedoch keine signifikanten Ähnlichkeiten, wodurch ein Misspriming in diesem Bereich eher ausgeschlossen werden kann. Auch Fehler während der Amplifikation könnten in der PCR zur Generierung einer solchen Sequenz geführt haben. Da die Sequenz jedoch mehrere Male identisch isoliert wurde, scheint auch dies eher unwahrscheinlich.

Alternatives Spleißen, ein Prozess, bei dem aus einem Transkript durch die differentielle Auswahl von Spleißstellen verschiedene reife mRNA-Produkte entstehen (Reed, 1996), kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da die beiden isolierten Sequenzen nicht vollständig identisch sind (vergl. Abb. 4.14). Bei den beiden Sequenzen könnte es sich jedoch um Allele eines Gens handeln. Dann wäre die Entstehung des verkürzten Transkripts durch alternatives Spleißen wiederum denkbar.

Des Weiteren beschrieben Daza-Vamenta und Mitarbeiter (2004) eine Gen-Sequenz innerhalb des von ihnen sequenzierten MHC-Haplotyps von Rhesusaffen, der das Exon 1 in der genomischen Sequenz fehlt. Eine solche Sequenz würde, wie die in dieser Arbeit isolierte Sequenz *Mamu-B*28-L*, nach Translation in einem Protein ohne *leader* resultieren.

Welche der hier beschriebenen Möglichkeiten letztendlich zur Isolation des *Mamu-B*28*-ähnlichen Transkripts ohne *leader* führte, bleibt ungewiss. Festzuhalten bleibt jedoch, dass neben einer eher unwahrscheinlichen methodischen Möglichkeit auch physiologische Entstehungswege in Betracht kommen.

Für das als *Mamu-B-NEU-TM* beschriebene Transkript (vergl. Abb. 4.16) kommen ebenfalls die Möglichkeiten des alternativen Spleißens von allelischen Gensequenzen und einer genomischen Sequenz ohne Transmembranregion in Frage. Fehler bei der Amplifikation können aufgrund der Lage des fehlenden Sequenzabschnittes ausgeschlossen werden. Die Sequenz *Mamu-B-NEU-TM* kodiert für ein Molekül ohne Transmembranregion, dem daher die Möglichkeit der Verankerung in der Zellmembran fehlt. Ein solches MHC-Klasse-I-Molekül könnte sowohl intrazelluläre wie auch extrazelluläre Funktionen nach Sezernierung übernehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese MHC-Klasse-I-Sequenz ohne Transmembrananteil als interne Kontrolle der intrazellulären Expression bei Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation verwendet.

Zur funktionellen Einordnung wurde in der Literatur für die in dieser Arbeit isolierten *Mamu-A*- und *Mamu-B*-Sequenzen nach Assoziationen mit Krankheitsverläufen gesucht. Für die Allele *Mamu-A*01*, *-A*11* und *-B*17* konnten verschiedene Arbeitsgruppen einen Zusammenhang mit einem langsamen Krankheitsverlauf bei SIV-Infektionen nachweisen (Mothe *et al.*, 2003; Sette *et al.*, 2005; Yant *et al.*, 2006). *Mamu-A*12* ist zudem mit einer Resistenz gegen Spondyloarthropathie assoziiert (Wirbelsäulengelenkleiden, Urvater *et al.*, 2000a). In funktionellen Studien der vorliegenden Arbeit wurden demzufolge sowohl bereits bekannte und zum Teil funktionell charakterisierte Gene (*Mamu-A*01*, *-A*11*, *-B*17*), wie auch komplett neue Gene (*Mamu-B-NEU*) in die Analysen miteinbezogen.

In weiterführenden Sequenzanalysen wurden die isolierten MHC-Klasse-I-Transkripte hinsichtlich verschiedener Charakteristika untersucht. Analysen der Gesamtsequenzen gaben die evolutiven Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den *Mamu-A*- und *HLA-A*-Sequenzen sowie den *Mamu-B*- und *HLA-B*- bzw. *HLA-C*-Sequenzen wieder (vergl. Abb. 4.6a). Nach Analysen der Gesamtsequenzen und deren Einordnung wurde die Antigenbinderegion einer genaueren Analyse unterzogen (vergl. Abb. 4.6b). Die Kodonsequenzen, die für die Aminosäuren der Antigenbinderegion kodieren, weisen eine höhere Rate an nichtsynonymen gegenüber synonymen Austauschen auf. Kodons, die Aminosäuren verschlüsseln, die nicht an der Peptidbindung beteiligt sind, werden durch eine höhere Rate an synonymen gegenüber nichtsynonymen Austauschen charakterisiert. Dies wird im Normalfall bei fast allen Genen beobachtet. Das heißt, dass unter den AS-Resten der Antigenbindung häufiger

Aminosäureänderungen zu beobachten sind, als in der restlichen Sequenz (Hughes und Nei, 1988). Diese erhöhte nichtsynonyme Austauschrate wird auf positiven Selektionsdruck zurückgeführt und ist der Grund für den hohen Polymorphismusgrad der MHC-Klasse-I-Gene (Hughes und Hughes, 1995). Die Struktur der Antigenbindegrube kann unter anderem einen Einfluss auf die Bildung von stabilen MHC-Klasse-I-Komplexen haben (s. Kap 1.2.2.3). Ohne gebundenes Peptid, werden MHC-Klasse-I-Komplexe im ER zurückgehalten (Townsend *et al.*, 1989). MHC-Klasse-I-Moleküle, die eine Antigenbindegrube aufweisen, die nur wenigen oder seltenen Peptiden die Bindung erlaubt, könnten erst durch das Vorhandensein dieser speziellen Peptide auf die Zelloberfläche gelangen. Dies könnte beispielsweise nach einer Virusinfektion der Fall sein. Auch grundlegende Unterschiede in den AS-Resten, der Antigenbinderegion können Hinweise auf verschiedene Funktionen der MHC-Klasse-I-Moleküle liefern. Durch die phylogenetischen Untersuchungen in Kapitel 4.2.1 konnte gezeigt werden, dass MHC-Klasse-I-Moleküle des Rhesusaffen im Bereich der Antigenbinderegion große Unterschiede aufweisen und daher vermutlich auch unterschiedliche Spektren an Peptiden binden können. Die Mamu-A-Moleküle ähneln in diesem Fall den humanen HLA-Molekülen stärker als allen Mamu-B- bzw. Mamu-I-Molekülen (vergl. Abb. 4.6b) und rücken die Mamu-A-Moleküle von den Mamu-B-Molekülen ab und den klassischen HLA-Molekülen näher.

5.2 Unterschiede in der subzellulären Lokalisation unterstreichen die Sequenz-Variationen der MHC-Klasse-I-Gene des Rhesusaffen

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Etablierung von 21 verschiedenen stabilen Transfektanten in K562-Zellen. Darunter befanden sich 20 Rhesusaffen MHC-Klasse-I-AcGFP-Transfektanten und eine HLA-C-AcGFP-Transfektante (vergl. Tab. 4.3). Die Konstruktion von GFP-Fusionsproteinen ist eine etablierte Methode um die Expression und Lokalisation des Zielproteins zu untersuchen. Auch für HLA-Moleküle wurde diese Methode bereits häufig verwendet (Davis *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2006). Fehllokalisationen solcher GFP-Fusionsproteine sind zudem nicht bekannt.

Wie in Kapitel 5.1 dargelegt, weisen die im Rahmen dieser Arbeit isolierten MHC-Klasse-I-Sequenzen einige Unterschiede auf, die möglicherweise Einfluss auf die Funktion der durch sie verschlüsselten Moleküle haben könnten. Weitere Hinweise lieferten Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der etablierten Transfektanten (s. Kap. 4.2.3). Mit Hilfe von LSM-

Aufnahmen einzelner MHC-Klasse-I-AcGFP-exprimierender Zellen konnten Informationen über die subzelluläre Verteilung der Expression von Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Molekülen gewonnen werden. Durchflusszytometrische Analysen der MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche lieferten zusätzlich Daten über die Stärke der Oberflächenexpression. Wie schon die Analysen der Antigenbinderegion, zeigten auch die Ergebnisse zur subzellulären Lokalisation deutliche Unterschiede zwischen Mamu-A- und Mamu-B-Molekülen (vergl. Abb. 4.10 bis 4.12).

Als eine Referenz-Transfektante mit starker MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression diente die HLA-Cw*0303-Transfektante. Unter den Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Transfektanten wiesen die Mamu-A-Transfektanten ähnlich starke Oberflächenexpressionen auf. Einzig Mamu-A*1403 zeigte eine deutlich geringere Oberflächenexpression. *Mamu-A*1403* wurde dem *Mamu-A4*-Gen zugeordnet, welches von Otting *et al.* (2007) als wenig polymorph und auch schwach exprimiert beschrieben wurde. Damit korreliert die hier gefundene, gegenüber den anderen vier Mamu-A-Transfektanten, schwächere MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche mit diesen in der Literatur beschriebenen Charakterisierungen des *Mamu-A4*-Gens. Des Weiteren zeigten die subzellulären Lokalisationen der Mamu-A-AcGFP-Proteine in den Einzelaufnahmen von transfizierten Zellen kaum intrazelluläre Expression. Dem gegenüber lassen die Aufnahmen einer HLA-Cw*0303-transfizierten Zelle deutlich intrazelluläre Ansammlungen erkennen. Intrazelluläre Akkumulation von HLA-C-Molekülen wurde bereits beschrieben (Sibilio *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu HLA-A- und HLA-B-Molekülen kann es, aufgrund einer sehr selektiven Peptidbinding, die durch verlängerte TAP-Assoziation der schweren Ketten den intrazellulären Transport negativ beeinflussen kann, und einer erhöhten Dissoziation des HLA-C- β 2M-Komplexes intrazellulär zu HLA-C-Akkumulationen kommen. Gründe für diese expressionellen Variationen der HLA-Gene werden in sequenz-basierten strukturellen Unterschieden vermutet (Sibilio *et al.*, 2008). Die Mamu-A-Moleküle zeigen demzufolge eher den HLA-A- und HLA-B-Molekülen ähnliche subzelluläre Verteilungen.

Die subzelluläre Verteilung der Mamu-B-AcGFP-Proteine war dagegen nach Transfektion in K562-Zellen sehr divergent (vergl. Abb. 4.11). Die Transfektanten Mamu-B*28+L, -B*6002 und -B-NEU+TM wiesen eine relativ starke MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche auf. Für Mamu-B*6002- und Mamu-B-NEU+TM-transfizierte Zellen konnten zudem in LSM-Aufnahmen kaum intrazelluläre Ansammlungen des MHC-Klasse-I-AcGFP-Proteins dargestellt werden. Die restlichen Mamu-B-Transfektanten wiesen dagegen alle intrazelluläre Expression auf und zeigten bei FACS-Analysen eine schwache (Mamu-B*09, -B*17,

-B*3002, -B*47 und -B*64) oder keine (Mamu-B*12, -B*28-L, -B*45 und -B-NEU-TM) MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression. Dieser Gruppe lässt sich auch das Mamu-B-ähnliche Mamu-I*01011 zuordnen (vergl. Abb. 4.12). Zusammenfassend wiesen alle Mamu-B-Transfektanten eine deutlich geringere MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche auf als die Mamu-A-Transfektanten. Eine geringe Oberflächenexpression korrelierte dabei mit stärkerer intrazellulärer Expression.

Als Vertreter eines nicht-klassischen MHC-Klasse-I-Moleküls zeichnete sich Mamu-E*0110 erwartungsgemäß ebenfalls durch intrazelluläre Expression des Mamu-E-AcGFP-Proteins aus und wies in FACS-Analysen keine nachweisbare Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf (vergl. Abb. 4.12). Von *HLA-E*, dem zu *Mamu-E* orthologen humanen Gen, ist bekannt, dass es nur bei gleichzeitiger Expression von anderen HLA-Molekülen auf die Zelloberfläche gelangt. Erst die Bindung eines HLA-*leader*-Peptids in der HLA-E-Peptidbindegrube ermöglicht die Oberflächenexpression (Lee *et al.*, 1998). Der NK-Zellrezeptor CD94/NKG2A erkennt die HLA-E-Peptid-Komplexe (Brooks *et al.*, 1999) und vermittelt ein inhibitorisches Signal an die NK-Zelle (Masilamani *et al.*, 2006). Damit stellt die *leader*-Peptid-abhängige HLA-E-Expression auf Körperzellen eine Kontrollmöglichkeit für NK-Zellen dar, durch die allein über den CD94/NKG2A-Rezeptor erkannt wird, ob eine Zelle klassische MHC-Klasse-I-Moleküle exprimiert oder deren Expression, z. B. als Folge einer Virusinfektion, herunterreguliert wurde. Für die hier vorliegende Arbeit wurde das Mamu-E*0110-AcGFP-Konstrukt als ein Beispiel für ein rein intrazellulär exprimiertes MHC-Klasse-I-Molekül parallel zu den Mamu-A- und Mamu-B- bzw. Mamu-I-AcGFP-Konstrukten in K562-Zellen transfiziert.

Die den HLA-Molekülen ähnliche starke MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression der Mamu-A-Transfektanten korreliert mit den Schlussfolgerungen zur Analyse der Peptidbinderegion, in denen *Mamu-A*-Sequenzen mehr den humanen *HLA*-Sequenzen gleichen als anderen Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Sequenzen. Obwohl phylogenetische Analysen der Gesamtsequenzen die *Mamu-A*-Sequenzen eindeutig als Homologe der *HLA-A*-Sequenzen belegen (Boyson *et al.*, 1996b), zeigen die AS-Reste, die an der Peptidbindung beteiligt sind, mehr Ähnlichkeiten zu allen klassischen *HLA*-Sequenzen als alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Sequenzen (vergl. Abb. 4.6b). Zusätzlich bilden die Sequenzen von *Mamu-B*28* und *Mamu-B-NEU-TM* zusammen mit den *Mamu-A*- und *HLA*-Sequenzen eine von den restlichen Sequenzen separierte Gruppe und weisen in den Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation eine starke MHC-Klasse-I-Expression auf (vergl. Abb. 4.13). Die Sequenzen der mehr intrazellulär exprimierten Mamu-B-Moleküle

bilden hinsichtlich der Peptidbinderegion zusammen mit der *Mamu-E*0110*-Sequenz die zweite Gruppe. Die einzige Ausnahme dieser Gruppierung bildet die Sequenz von dem stark auf der Zelloberfläche exprimierten Mamu-B*6002-Molekül. Dessen Gesamtsequenz unterscheidet sich zudem am stärksten von allen anderen *Mamu-B*-Sequenzen (vergl. Abb. 4.6a). Diese großen Unterschiede in der Sequenz gegenüber allen weiteren Sequenzen könnten auch in funktionellen Unterschieden resultieren.

Im Rahmen der subzellulären Expressionsanalysen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Mamu-A-Moleküle sowie einige der Mamu-B-Moleküle, Eigenschaften vereinen, die sie als klassische MHC-Klasse-I-Moleküle charakterisieren (starke Oberflächenexpression sowie eine Peptidbinderegion mit hohen Ähnlichkeiten zu klassischen HLA-Molekülen). Dem gegenüber konnten einer zweiten Gruppe an Mamu-B-Molekülen eher nicht-klassische Eigenschaften zugeschrieben werden. Humane Zellen, die mit diesen Mamu-B-Konstrukten transfiziert wurden, wiesen eine schwache MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche auf und ihre Peptidbinderegion ähnelt eher der des nicht-klassischen Mamu-E*0110-Moleküls als HLA-Molekülen.

Die beobachteten Unterschiede in der Antigenbinderegion und die variierenden subzellulären Lokalisationen der MHC-Klasse-I-Moleküle können auf verschiedene Weise interpretiert werden. Unterschiede in der Sequenz der AS-Reste, die die Antigenbindegrube bilden, legen zunächst einmal nahe, dass die, durch diese Sequenzen kodierten, Moleküle unterschiedliche Peptide binden können. Eine vergleichende Analyse der Motive der Peptidbindung von HLA- und Mamu-A- bzw. Mamu-B-Molekülen zeigte neben konservierten auch originäre Peptidbindungsmotive beim Rhesusaffen auf (Dzuris *et al.*, 2000). Diese Beobachtung deckt sich mit den hier durchgeführten Analysen zur Antigenbinderegion. Die Gruppe der mehr intrazellulär exprimierten Mamu-B-Moleküle weist im Bereich der Sequenz, die für die Antigenbinderegion kodiert, mehr Ähnlichkeiten mit der Sequenz des nicht-klassischen *Mamu-E* auf als mit den humanen *HLA*-Sequenzen. Eventuell haben auch einige der hier untersuchten Mamu-B-Moleküle einen eher nicht-klassischen Charakter. Nicht-klassische HLA-Moleküle sind wenig polymorph, werden nicht ubiquitär und z. T. oder auch vollständig intrazellulär exprimiert (Braud *et al.*, 1999; O'Callaghan und Bell, 1998; Wainwright *et al.*, 2000). Weitere Hinweise auf nicht-klassische Eigenschaften einiger *Mamu-B*-Gene liefert die Literatur. Für die als *Mamu-I* beschriebenen MHC-Klasse-I-Sequenzen des Rhesusaffen, die phylogenetisch mit den *Mamu-B*-Sequenzen verwandt sind, konnte gezeigt werden, dass sie Eigenschaften von klassischen und nicht-klassischen MHC-Klasse-I-Genen vereinen (Urvater *et al.*, 2000b). Ihre mRNA Transkripte konnten in vielen Geweben detektiert werden. Zudem

konnte ihre Expression in einer Rhesusaffenzelllinie gezeigt werden und Mamu-I-Proteine nach Transfektion in eine humane MHC-Klasse-I-defiziente Zelllinie durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Dem gegenüber zeigten die *Mamu-I*-Sequenzen eine geringe Variabilität und ihre Peptidbinderegion wies keine Anzeichen für eine positive Selektion auf. Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde eine der *Mamu-I*-Sequenzen in die Untersuchungen miteinbezogen. *Mamu-I*01011* lässt sich der Gruppe der *Mamu-B*-Gene mit mehr intrazellulärer Expression (vergl. Abb. 4.12) und mit einer Peptidebinderegion, die sich deutlich von *HLA*-Sequenzen unterscheidet, zuordnen. Somit geben auch die Untersuchungen zu *Mamu-I*-Sequenzen Anlass zu der Spekulation, dass neben diesen von Urvater und Mitarbeitern beschriebenen *Mamu-I*-Genen auch einige der *Mamu-B*-Gene Eigenschaften von nicht-klassischen MHC-Klasse-I-Genen aufweisen. Diese vermehrt intrazellulär exprimierten Mamu-B-Moleküle könnten im Zellinneren eine funktionelle Aufgabe erfüllen.

Weitere Indizien auf intrazelluläre Funktionen eines Teils der Mamu-B-Moleküle konnten durch die Untersuchungen von ungewöhnlichen Transkripten gewonnen werden. Die Sequenzen *Mamu-B*28-L* und *Mamu-B-NEU-TM*, deren Entstehung im vorigen Kapitel diskutiert wurde, kodieren für Proteine, welche durch das Fehlen einer kompletten Domäne nicht auf die Zelloberfläche gelangen können (vergl. Abb. 4.15 und 4.17). Wenn diesen Genprodukten eine physiologische Rolle zukommt, handelt es sich dabei nicht um die klassische Antigenpräsentation an der Zelloberfläche. Interaktionen mit ebenfalls intrazellulären Rezeptoren sind denkbar. Beispiele für lösliche HLA-Moleküle finden sich in der Literatur. Für das nicht-klassische MHC-Klasse-I-Gen *HLA-G* wurden mehrere lösliche Molekül-Varianten beschrieben, die durch alternatives Spleißen entstehen (Fujii *et al.*, 1994; Paul *et al.*, 2000). Eine Sezernierung wurde für *HLA-G5* beschrieben, das in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden konnte (Hamai *et al.*, 1999; Puppò *et al.*, 1999; Rebmann *et al.*, 1999). Intrazelluläre Interaktionen zwischen *HLA-G* und dessen NK-Zellrezeptor KIR2DL4 konnten ebenfalls gezeigt werden (Rajagopalan *et al.*, 2006). Auch für *HLA-A*- und *HLA-B*-Allele wurden lösliche Spleißvarianten beschrieben (Dubois *et al.*, 2004; Krangel, 1985). Des Weiteren finden sich in der Literatur weitere Beschreibungen von intrazellulären Rezeptoren, die mit MHC-Klasse-I-Molekülen interagieren können. Unter anderem konnte für KIR3DL1 gezeigt werden, dass das Allel *KIR3DL1*004* hauptsächlich intrazellulär exprimiert wird (Pando *et al.*, 2003). Untersuchungen von HIV-Infizierten zeigten, dass gerade dieses Allel, in Abhängigkeit von einer *HLA-Bw4⁺*-Expression, die stärkste Assoziation mit einem langsamen Voranschreiten der Krankheit demonstrierte (Martin *et al.*, 2007). Neben der Beschreibung von intrazellulären NK-Zellrezeptoren und

ihren MHC-Klasse-I-Liganden finden sich in der Literatur auch Arbeiten, die einen möglichen Übertragungsweg der MHC-Liganden von einer Zelle auf eine andere aufzeigen. Onfelt und Mitarbeiter (2004) konnten demonstrieren, dass Zellen über sog. *nanotubes* HLA-C-GFP-Moleküle auf NK-Zellen übertragen konnten.

Diese Arbeiten legen dar, dass eine intrazelluläre Interaktion zwischen NK-Zellrezeptoren und MHC-Klasse-I-Molekülen sowohl für klassische als auch nicht-klassische HLA-Moleküle möglich ist. Daher besteht die Möglichkeit, dass auch einige der in dieser Arbeit untersuchten, mehr intrazellulär exprimierten Mamu-B-Moleküle, eine solche Funktion übernehmen könnten. Die extremsten Formen stellen dabei die Genprodukte ohne *leader* bzw. Transmembranregion dar, denen eine Expression auf der Zelloberfläche rein formal nicht möglich ist.

Neben physiologischen Erklärungen für die dokumentierten Phänomene sollten auch methodische Schwierigkeiten des verwendeten Nachweisverfahrens berücksichtigt werden. So liegt beispielsweise bis dato keine für die hier durchgeführten Versuche geeignete Zelllinie aus Makaken vor. Daher wurde für die Etablierung von Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Transfektanten auf eine humane Zelllinie zurückgegriffen. Die verwendete Zelllinie K562 entstammt menschlichen myeloischen Leukämiezellen, die gegenüber der Zytotoxizität von NK-Zellen in hohem Masse empfindlich sind (Klein *et al.*, 1976). Diese myoblaste Zelllinie weist einige T-Zelleigenschaften auf und bei ihr konnte keine klassische HLA-Expression nachgewiesen werden (Lozzio und Lozzio, 1979). Aufgrund der stark verringerten Klasse-I-Expression eignen sich diese Zellen hervorragend für Transfektionsexperimente mit einzelnen MHC-Klasse-I-Sequenzen. Anwendung findet diese Zelllinie vor allem in immunologischen Tests, da sie suszeptibel gegenüber einer NK-Zelllyse ist (Toth und Kubes, 1993).

Aber auch in Expressionsstudien mit einzelnen humanen MHC-Klasse-I-Molekülen fand die Zelllinie bereits Einsatz (Schleypen *et al.*, 2003; Wehler *et al.*, 2007). Dennoch bleibt zu berücksichtigen, dass die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente in einem zwei Spezies überlappenden System stattfanden. Daher sind Probleme durch spezies-spezifische Interferenzen nicht auszuschließen. Eine besondere Betrachtung sollte dabei dem β 2M zukommen (s. Kap. 1.2.3). Für die hier gezeigten Expressionsstudien wurde allein die schwere Kette der MHC-Klasse-I-Moleküle des Rhesusaffen transfiziert. Um eine stabile Oberflächenexpression zu erlangen, mussten die transfizierten Moleküle eine kovalente Bindung mit dem humanen (von der Zelllinie hergestellten) β 2M eingehen. Ein Vergleich der humanen und der Rhesusaffen Sequenz des β 2M zeigt einige AS-Austausche, die jedoch alle nicht in den MHC-Klasse-I-bindenden Bereichen liegen (Su *et al.*, 2004). Dies sollte eine

Bindung des humanen $\beta 2M$ an die schwere Kette von Rhesusaffen MHC-Klasse-I begünstigen. Die hier durchgeführten Expressionsergebnisse konnten zeigen, dass einige der Mamu-A- und Mamu-B-Moleküle durchaus in der Lage sind, auf die Zelloberfläche zu gelangen (s. Kap. 4.2.3) und dort auch funktionelle Aufgaben, wie Interaktionen mit Rezeptoren auf NK-Zellen, übernehmen können (s. Kap. 4.3 und 4.5). Andere Arbeitsgruppen konnten bereits demonstrieren, dass nach Transfektion der schweren Kette des Rhesusaffen MHC-Klasse-I in eine humane Zelllinie gute Oberflächenexpressionen erreicht werden können (Urvater *et al.*, 2000b). Dennoch bleibt nicht ausgeschlossen, dass einige der transfizierten schweren MHC-Klasse-I-Ketten des Rhesusaffen mehr Probleme bei der Zusammenlagerung mit dem artfremden, humanen $\beta 2M$ haben als andere. Einige der MHC-Klasse-I- $\beta 2M$ -Komplexe könnten durch eine verringerte Bindungsstärke instabil werden und daher vermehrt im Zellinneren anzutreffen sein.

Eine weitere zentrale Rolle in der Bildung eines stabilen MHC-Komplexes spielt das, in der MHC-Antigenbindegrube, gebundene Peptid. Ein Fehlen von passenden Peptiden in der verwendeten humanen Zelllinie K562 könnte dazu führen, dass einige der Mamu-B-Moleküle eher instabile Komplexe bilden und kaum auf die Zelloberfläche gelangen. Alle MHC-Klasse-I-Moleküle, die in ihrer Peptidbinderegion den humanen MHC-Klasse-I-Molekülen ähneln, konnten nach Transfektion auch auf der Zelloberfläche der humanen Zelllinie K562 nachgewiesen werden (vergl. Abb. 4.13). Die Mamu-B-Moleküle mit einer stärker abweichenden Peptidbinderegion zeigten dementsprechend nach Transfektion eine schwache bis keine MHC-Klasse-I-Expression auf der Oberfläche von K562-Zellen. Die einzige Ausnahme bildete *Mamu-B*6002*. Obwohl das *Mamu-B*6002*-AcGFP-Konstrukt nach Transfektion eine starke MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression auslöste, zeigt die AS-Sequenzregion der Antigenbindung wenig Ähnlichkeit mit *HLA*-Sequenzen.

Auch die Verwendung des monoklonalen Antikörpers W6/32 zur Markierung von MHC-Klasse-I-Molekülen sollte einer kritischen Diskussion unterzogen werden. Dieser Antikörper wurde als Maus anti-MHC-Klasse-I Antikörper, der schwere humane MHC-Klasse-I-Ketten in Assoziation mit $\beta 2M$ erkennt, entwickelt (Barnstable *et al.*, 1978; Parham *et al.*, 1979). Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Antikörper mit nativen MHC-Klasse-I-Molekülen anderer Spezies interagiert (Parham und Ploegh, 1980) und er wurde schon in Arbeiten zur Erkennung von *HLA*-Oberflächenexpressionen eingesetzt (Ennis *et al.*, 1988; Urvater *et al.*, 2000b). In dieser Arbeit wurde er für die Oberflächenmarkierung von Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Molekülen nach Transfektion in humane Zellen verwendet. Dennoch bleibt

ungeklärt, ob alle MHC-Klasse-I-Moleküle des Rhesusaffen gleich gut von diesem Antikörper erkannt werden.

5.3 Mamu-A-Moleküle als Zielstrukturen für NK-Zellrezeptoren

Mit Hilfe von immunologischen Tests wurde der Frage nachgegangen, ob einzelne MHC-Klasse-I-Moleküle des Rhesusaffen in der Lage sind, mit NK-Zellen zu interagieren. Um Interaktionen zwischen NK-Zellen und MHC-Klasse-I-exprimierenden Zielzellen nachzuweisen, kann man zum einen die Effekte der Interaktion auf die Zielzellen charakterisieren und zum anderen die Effekte auf die NK-Zellen selber analysieren. Der Chromfreisetzungstest ermöglicht die Veranschaulichung von Unterschieden in der Zielzelllyse durch die zytolytische Aktivität von Effektorzellen (s. Kap. 3.2.7). Er gilt noch immer als eine Standardmethode zur Ermittlung der antigenspezifischen Lyse von MHC-Klasse-I defizienten Zellen. Das Testverfahren ist jedoch wenig sensitiv und liefert nur semi-quantitative Ergebnisse. Da jedoch zu Beginn der Arbeit keine andere Methode zur Analyse der Interaktion zwischen NK-Zellen und MHC-Klasse-I-Molekülen zu Verfügung stand, wurden Chromfreisetzungstests mit Rhesusaffenaffen-PBMC und MHC-Klasse-I-exprimierenden K562-Zellen etabliert.

Das maximale Blutvolumen pro Abnahme und Tier lag bei ca. 15 ml. Daher musste für eine ausreichende Menge an PBMC für einen Test Blut mehrerer Rhesusaffen aufgereinigt werden und die isolierten Lymphozyten vereint werden. Dies erhöhte zwar die Wahrscheinlichkeit, dass sich unter den isolierten PBMC auch NK-Zellen mit Rezeptoren für die verwendeten MHC-Klasse-I-Moleküle befanden, verringerte jedoch gleichzeitig den prozentualen Anteil von NK-Zellen mit eventuell passendem Rezeptor. Reine NK-Zellen als Effektorzellen konnten nicht verwendet werden, da für Rhesusaffen zum Zeitpunkt der Arbeit weder NK-Zellklone zur Verfügung standen, noch die Möglichkeit einer so genannte „negativen NK-Zellisolation“ bestand. Für das humane System ist dies aufgrund der guten Charakterisierung der Blutzellen eine etablierte Methode. Bei diesem Verfahren werden durch geeignete Antikörper, die an Kügelchen gekoppelt sind, alle PBMC außer den NK-Zellen markiert und lassen sich dadurch von den unmarkierten NK-Zellen abtrennen. Auch von einer direkten Isolation der NK-Zellen durch Antikörpermarkierung wurde abgesehen, da Antikörper *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) auslösen können. Bei der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität erkennen NK-Zellen über ihre Fc-Rezeptoren

andere Zellen, die mit Antikörpern beladen sind. Dies führt zur Aktivierung der NK-Zellen und zur Ausschüttung von zytotoxischem Granula, wodurch die Antikörper-markierten Zellen abgetötet werden. Da also weder die direkte noch die indirekte NK-Zellisolation für Rhesusaffen-PBMC zur Verfügung stand, musste wie beschrieben mit der gesamten Lymphozyten-Population gearbeitet werden.

NK-Zellen machen dabei ca. 10 % der Gesamt-Zellen aus (Robertson und Ritz, 1990), wobei allerdings 20 - 30 % der Lymphozyten verschiedenen Gruppen an T-Zellen zuzuordnen sind. Diese könnten ebenfalls über ihren T-Zellrezeptor mit MHC-Klasse-I-Molekülen interagieren. Jedoch sollten die auf den K562-Zellen exprimierten Rhesusaffen MHC-Klasse-I-Moleküle nur Peptide intrazellulärer Proteine präsentieren und daher keine T-Zell-vermittelte Zellyse auslösen.

Wie bereits in Kapitel 3.1.16 beschrieben hat Rhesusaffenblut eine etwas andere Zusammensetzung als humanes Blut und die Blutzellen haben z. T. eine abweichende Form und Struktur (Ahmed-Ansari *et al.*, 1989; Powell *et al.*, 1989). Aus diesem Grund wurden die Protokolle zur Lymphozytenaufreinigung aus humanem Blut für die Aufreinigung von Rhesusaffenblut zunächst einer Optimierung unterzogen. Dennoch konnte nicht der gleiche Reinheitsgrad der Lymphozytenpopulation, wie bei humanen Blutaufreinigungen, erreicht werden, was zu den großen Schwankungen der Testergebnisse beigetragen haben könnte.

Zusammengenommen war nur eine sehr geringe Anzahl der Effektorzellen in jedem Test in der Lage, Veränderungen in der Zielzellyse durch eine MHC-Klasse-I-vermittelte Interaktion auszulösen. Des Weiteren bleibt zu berücksichtigen, dass Rhesusaffen-PBMC gegenüber humanen PBMC eine schwächere spezifische Lyse der K562-Zielzellen auslösten (vergl. Abb. 4.19), wodurch schwache Effekte auf die Zellyse leichter übersehen werden können. Diese reduzierte K562-Lyse durch Rhesusaffen-PBMC wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben (Andersen *et al.*, 2004).

Die Anzahl an verschiedenen Zielzellen wurde aufgrund der großen Menge an MHC-Klasse-I-Genen des Rhesusaffen auf die Mamu-A-Transfektanten beschränkt. Unter diesen Transfektanten zeigten vor allem die stabilen K562-Transfektanten Mamu-A*01, -A*08 und -A*11 starke MHC-Klasse-Oberflächenexpression (s. Kap. 4.2.3) und wurden daher in die Chromtests eingesetzt. Damit wurden ausschließlich Transfektanten des *Mamu-A1*-Gens verwendet. Trotz der beschriebenen Einschränkungen des Analyseverfahrens für die Anwendung in dieser Arbeit konnten leichte Tendenzen einer Mamu-A-vermittelten Reduktion der Zielzellyse ermittelt werden (vergl. Abb. 4.20). Jedoch lassen die hohen Standardabweichungen der Mittelwerte der spezifischen Lysen kaum signifikante Aussagen

zu. Diese hohen Variationen in der spezifischen Lyse lassen sich zum einen auf die geringe Maximallyse und zum anderen auf die hohe Variabilität der Effektorzellen zurückführen (s. oben). Zwei Beispiele für einzelne Zytotoxizitätstests sind im Anhang abgebildet (vergl. Abb. 10.6). Dabei zeigt die erste Abbildung ein Beispiel für einen Test bei dem eine Reduktion der spezifischen Lyse für Mamu-A-Transfektanten deutlich zu sehen ist. Die zweite Abbildung zeigt ein Beispiel für einen Test, bei dem nur eine geringe Mamu-A-vermittelte Reduktion der Zielzellyse zu beobachten war.

Aufgrund der geringen Signifikanz der Ergebnisse aus den Zytotoxizitätstests kam im Verlauf der Arbeit eine zweite Methode zur Analyse der MHC-Klasse-I-vermittelten NK-Zellaktivierung und -inhibition zur Anwendung. Der Degranulierungsassay ermöglicht mit Hilfe von Oberflächenmarkern die direkte Analyse von NK-Zellen. In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus drei Markern verwendet. CD3 wird auf T-Zellen und CD16 wird auf NK-Zellen, aber auch auf Neutrophilen und Makrophagen, exprimiert. Durch eine AK-Markierung gegen CD3 und CD16 konnte die CD3-negative und CD16-positve Population zur weiteren Analyse im Rahmen einer FACS-Auswertung ausgewählt werden (vergl. Abb. 4.21). Die Verwendung dieser beiden Zellmarker basiert auf Charakterisierungen von NK-Zellen des Rhesusaffen (Choi *et al.*, 2008; Webster und Johnson, 2005). Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass Oberflächenmarker auf Blutzellen des Rhesusaffen noch nicht so detailliert definiert wurden wie bei humanen Blutzellen und daher die untersuchte Lymphozytenpopulation eventuell nicht nur NK-Zellen enthielt.

Gegenüber dem Chromfreisetzungstest erfolgte die Messung des Degranulierungstests auf Einzelzellebene am Durchflusszytometer (s. Kap. 3.2.9). Ein weiterer Vorteil dieser Methode bestand darin, dass pro Testansatz 10 bis 15 ml Blut ausreichend waren. Dadurch konnte eine Verwendung von Blutgemischen mehrerer Rhesusaffen vermieden werden. Für die Zeit der Degranulierungsassays standen außerdem kontinuierlich zwei Rhesusaffen zur Blutabnahme zur Verfügung. Allerdings konnte durch die Beschränkung auf zwei Tiere nur ein Test pro Woche durchgeführt werden, da häufigere Blutabnahmen nicht zumutbar waren. Daher erfolgte auch bei diesem Testverfahren eine Fokussierung auf die etablierten Mamu-A-Transfektanten. Die vergleichsweise gute Charakterisierung der *Mamu-A*-Region ermöglichte zudem eine PCR-basierte Typisierung der beiden Rhesusaffen für die Gene der zur Verfügung stehenden Mamu-A-Transfektanten (s. Kap. 4.4). Nach einer Etablierungsphase, in der das optimale Zielzell-Effektorzell-Verhältnis und die optimale Inkubationsdauer ermittelt wurden (nicht gezeigt), wurden Tests mit allen fünf etablierten Mamu-A-Transfektanten durchgeführt. Die Ergebnisse der Auswertungen mit NK-Zellen beider Tiere spiegeln die in den

Chromfreisetzungstests ermittelten Tendenzen einer Mamu-A-vermittelten NK-Zellinhibition wieder. Auch bei diesem Testverfahren waren alle Mamu-A-Transfektanten in der Lage, mit NK-Zellen zu interagieren. Die Interaktion konnte durch eine verminderte NK-Zelldegranulierung sichtbar gemacht werden. Ein Vergleich der Ergebnisse der Degranulierungsassays mit NK-Zellen der beiden typisierten Tiere war vor allem aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen *Mamu-A*-Konfiguration von Interesse (vergl. Abb. 4.25). Eine Einzelbetrachtung zeigte unter anderem, dass die Mamu-A*01-Transfektante in allen Tests stets die stärkste NK-Zellinhibition vermittelte. Die Inhibition war bei dem *Mamu-A**01-positiven Rhesusaffen zudem stärker als in dem *Mamu-A**01-negativen Tier. Auch für Mamu-A*11 konnte eine stärkere Verringerung der Degranulierung in Tests mit PBMC von dem *Mamu-A**11-positiven Tier ermittelt werden (vergl. Abb. 4.22). Für die anderen Allele konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden. Jedoch war auch die Transfektante Mamu-A*08 in der Lage, die Degranulierung zu mehr als 20 % zu reduzieren. Mamu-A*1303 und Mamu-A*1403 lösten jeweils nur eine schwache Verringerung der Degranulierung aus. Damit zeigte sich, dass die Moleküle der *Mamu-AI*-Gene (*Mamu-A**01, -A*08 und -A*11) eine stärkere NK-Zellinhibition vermittelten als die Moleküle der *Mamu-A3*- und *Mamu-A4*-Gene Mamu-A*1303 und -A*1403. Eine Erklärung für die unterschiedlich starken Reduktionen der NK-Zellinhibition durch die verschiedenen Transfektanten und die verstärkte Reduktion bei Anwesenheit des jeweiligen Allels im Fall von *Mamu-A**01 und *Mamu-A**11 kann in der freien Kombinierbarkeit der MHC-Klasse-I- und KIR-Gene in der Vererbung gesucht werden (Parham, 2005). Dem zu Folge kann jedes Individuum Rezeptoren für nicht vorhandene Liganden exprimieren und umgekehrt auch Liganden ohne den entsprechenden NK-Zellrezeptor exprimieren. Allerdings sollten, gemäß den Theorien zur NK-Zelltoleranz (s. Kap. 1.7), nur solche NK-Zellen ihre volle Funktionalität erlangen, die auch einen Rezeptor für einen körpereigenen Liganden exprimieren (Gasser und Raullet, 2006; Yokoyama und Kim, 2006). Des Weiteren ist von Studien der Interaktionen zwischen humanen MHC-Klasse-I-Moleküle und den NK-Zellrezeptoren KIR bekannt, dass ein MHC-Klasse-I-Molekül mehrere KIR binden kann sowie ein KIR auch unterschiedliche MHC-Klasse-I-Moleküle binden kann (Boyington *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2001; Gumperz *et al.*, 1997; Gumperz *et al.*, 1995). Die unterschiedlichen NK-Zellinhibitionen können dahingehend interpretiert werden, dass Moleküle, die durch das *Mamu-AI*-Gen verschlüsselt werden, mit einer mehrere Gene oder Allele umfassenden Gruppe von KIR interagieren können. Dadurch könnten sie auch dann eine Inhibition der NK-Zellaktivität auslösen, wenn sie genomisch in dem Rhesusaffen, aus dem die NK-Zellen stammen, nicht vorhanden sind.

Sind sie genomisch vorhanden, kann eine MHC-Klasse-I-vermittelte „NK-Zellerziehung“ die Reaktivität der NK-Zellen mit einem passenden Rezeptor zusätzlich erhöhen.

Aufgrund der hohen Variabilität der NK-Zellmenge und deren Rezeptorausstattung in den isolierten PBMC war eine zusammenfassende statistische Auswertung der Ergebnisse nicht sinnvoll. Dennoch wurden für die ermittelten Werte der Reduktion der Degranulierung von fünf unabhängigen Tests Mittelwerte gebildet und graphisch in Abbildung 10.7 dargestellt. Diese Auswertung zeigt den konstanten Trend für eine Mamu-A-vermittelte NK-Zellinhibition in den unabhängigen Tests.

Eine vergleichende Betrachtung der Ergebnisse der beiden immunologischen Testverfahren zeigt einheitlich, dass Mamu-A-Moleküle eine Zielstruktur für NK-Zellen präsentieren. Vor allem Moleküle, die durch das *Mamu-A1*-Gen kodiert werden, scheinen eine klassische Aufgabe bei der NK-Zellinteraktion zu übernehmen. Auch die Moleküle, die durch die Gene *A3* und *A4* kodiert werden, sind im Degranulierungsassay in der Lage, eine NK-Zellinhibition auszulösen. Jedoch ist der inhibitorische Effekt auf NK-Zellen deutlich geringer als bei den Mamu-A1-Molekülen. Damit bestätigten sich die, in den Sequenzauswertungen (s. Kap. 4.1) und den Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation (s. Kap. 4.2) gewonnenen, Hinweise für eine Mamu-A-vermittelte NK-Zellinteraktion. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse der Degranulierungsassays, dass die stärkste Inhibition der NK-Zellaktivierung stets durch Allele des polymorphen und stark exprimierten *Mamu-A1*-Gens ausgeübt wird. Dabei ist eine besonders starke Mamu-A*01-vermittelte Inhibition zu beobachten.

Ein experimenteller Nachweis von spezifischen Interaktionen zwischen Mamu-A- und NK-Zellrezeptoren erfolgte mit Hilfe von direkten Interaktionsstudien (s. Kap. 4.5). Als inhibitorische Rezeptoren kommen vor allem die KIR in Frage (s. Kap. 1.4). Für den Mensch konnten einige spezifische Interaktionen zwischen KIR- und MHC-Klasse-I-Molekülen nachgewiesen werden (Fan *et al.*, 1996; Litwin *et al.*, 1994; Rajagopalan und Long, 1997; Wagtman *et al.*, 1995). Im Rahmen der Doktorarbeit von Philip Kruse und der Diplomarbeit von Meikes Hermes wurden KIR-Ig-Fusionsproteine hergestellt, die die extrazellulären KIR-Domänen mit dem Fc-Anteil eines humanen IgG verbinden. Solche Fusionsproteine wurden in humanen Systemen schon häufig angewandt (Fan *et al.*, 1996; Wagtman *et al.*, 1995) und stellen eine gute Möglichkeit zur Identifikation von Bindungen dar. Des Weiteren wurde zur Erhöhung der Nachweisgrenze in FACS-Analysen eine Multimerisierung der KIR-Ig-Fusionsproteine vorgenommen (vergl. Abb. 4.26 und Hansasuta *et al.*, 2004). Die Multimere wurden vor der Zugabe zu den Mamu-A-exprimierenden Zellen mit Streptavidin-PE-Cy5.5

markiert, wodurch weitere Antikörpermarkierungen vermieden wurden, bei denen zusätzliche Waschschrte anfallen würden. Diese vereinfachte Vorgehensweise sollte ebenfalls zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit des Nachweises beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit standen drei verschiedene KIR-Ig-Fusionsproteine zur Verfügung (KIR3DLneu1, KIR3DLneu3 und KIR3DLneu7), die jeweils aus drei Ig-Domänen aufgebaut sind und damit dem am häufigsten auftretenden Rhesusaffen KIR-Typus entsprechen (s. Kap. 1.4.2.1). Zudem tragen die cDNA-Sequenzen der drei verwendeten KIR in ihren zytoplasmatischen Domänen jeweils zwei ITIM und zählen daher zu den inhibitorischen Rezeptoren. Unterschiede finden sich im Wesentlichen in der Sequenz der Ig-Domänen. Zum Teil aufgrund der im Rahmen dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse sind detaillierte Betrachtungen dieser Rezeptoren Gegenstand weiterführender Arbeiten am Primatenzentrum.

Mit dem, im vorangegangenen Absatz beschriebenen, experimentellen Ansatz gelang am Durchflusszytometer der Nachweis von spezifischen Interaktionen zwischen dem KIR3DLneu3-Ig-Multimer und Mamu-A*01- bzw. Mamu-A*1303-Molekülen exprimiert auf K562-Zellen (vergl. Abb. 4.27). Für Mamu-A*1403-Transfektanten konnten des Weiteren schwache Zunahmen der MFI-Werte nach Inkubation mit KIR3DLneu1- und KIR3DLneu3-Ig-Multimeren dargestellt werden, die eventuell eine schwache Interaktion dieses Liganden mit den beiden KIR-Molekülen repräsentieren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die KIR-Bindungsstärke mit der Stärke der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression zunimmt (vergl. Abb. 4.28). Dieser Zusammenhang liegt in den heterogenen Zellpopulationen der stabilen Transfektanten begründet. Auf eine Klonierung der einzelnen MHC-Klasse-I-Transfektanten hinsichtlich einer einheitlichen MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche wurde verzichtet, da dabei leicht artifizielle Effekte auftreten können. Auch sollten die in den Interaktionsstudien dieser Arbeit gemessenen Zunahmen der mittleren Fluoreszenzstärken der einzelnen Mamu-A-Transfektanten nach Zugabe der PE-Cy-5.5-gekoppelten KIR-Ig-Multimere nicht mit den Zunahmen der MFI-Werte aus den Analysen zur MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression verglichen werden (s. Kap. 4.2.3). In den durchflusszytometrischen Analysen zur MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche erfolgte der Nachweis über einen mit einem Reaktivfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper, wodurch die Signale, gegenüber einer direkten Markierung, exponentiell verstärkt werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse der Interaktionsstudien ist zunächst augenscheinlich, dass *Mamu-A*01*, *-A*1303* und auch *-A*1403* drei verschiedenen Genen in der Klasse-I-Region zugeordnet werden (vergl. Kap. 4.4). Dennoch konnten Sequenzvergleiche belegen,

dass sich *Mamu-A*01* und *Mamu-A*1303* stärker ähneln als den Sequenzen der anderen verwendeten *Mamu-A*-Moleküle (vergl. Abb. 4.4b). Phylogenetische Analysen der einzelnen Domänen bestätigen diese Gemeinsamkeiten. Die Einzelanalysen der Sequenzen der α 1-Domäne zeigen zudem eine separate Gruppierung von *Mamu-A*01*, *-A*1303* und *-A*1403* (vergl. Abb. 10.2). Neben den Gesamtsequenzen zeigen auch die Antigenbinderegionen dieser drei Moleküle viele Gemeinsamkeiten (vergl. Abb. 4.6b). Folglich können *Mamu-A*01*-, *Mamu-A*1303*- und *Mamu-A*1403*-Moleküle Peptide mit ähnlichen AS-Resten binden. Daher kann die gemeinsame KIR3DLneu3-Bindung auch eine Peptid-Abhängigkeit beinhalten. Peptid-abhängige Interaktionen mit KIR konnten beispielsweise für die humanen MHC-Klasse-I-Moleküle HLA-Cw*7 mit KIR2DL3 sowie für HLA-A*3 bzw. HLA-A*11 mit KIR3DL2 nachgewiesen werden (Hansasuta *et al.*, 2004; Maenaka *et al.*, 1999). Am Beispiel von HLA-A*2402 und HLA-B*5703 und vier verschiedenen *KIR3DL1*-Allelen konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die Bindung nicht nur Peptid-abhängig, sondern auch allelspezifisch sein kann (Thananchai *et al.*, 2007). Der KIR-Polymorphismus trägt demnach zu Variationen der Stärke des inhibitorischen Signals auf die NK-Zelle während der Interaktion mit einem MHC-Klasse-I-Liganden bei (Carr *et al.*, 2005). Für die hier gezeigte Interaktion von *Mamu-A*01*, *-A*1303* und *-A*1403* mit KIR3DLneu3 könnte dies bedeuten, dass verschiedene Allele des Rezeptors KIR3DLneu3 ihre Liganden mit unterschiedlicher Affinität binden und auch in unterschiedlich starken NK-Zellinhibitoren resultieren könnten.

In Anlehnung an die, bei der Interaktion zwischen HLA-C- und KIR2DL-Molekülen identifizierten AS-Reste (Boyington *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2001), wurden auch die hier verwendeten *Mamu-A*-Sequenzen in diesen Bereichen einer genaueren Analyse unterzogen (vergl. Abb. 4.29). Bei den Interaktionen zwischen HLA-C und KIR2DL-Molekülen spielt vor allem die AS an der Position 80 eine entscheidende Rolle (Boyington *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2001). Auch bei HLA-A- und HLA-B-Molekülen mit dem Bw4⁺-Epitop, die mit KIR3DL-Molekülen interagieren können, ist die AS 80 eine zentrale Position (Cella *et al.*, 1994; Luque *et al.*, 1996). *Mamu-A*01*, *-A*1303* und *-A*1403* weisen jedoch unterschiedliche AS an der Position 80 auf. Jedoch sind die Unterschiede zwischen den Seitenketten der hier vorkommenden AS Threonin und Asparagin gering. Beide Seitenketten sind ungeladen polar. Unterschiede bei der KIR3DL-Bindung durch HLA-Moleküle, die diese beiden AS aufweisen, konnten bisher nicht gezeigt werden. Für HLA-B27-Subtypen demonstrierten Luque und Mitarbeiter, dass Subtypen mit Isoleucin an der Position 80 keine Inhibition vermitteln konnten, demgegenüber sind jedoch Subtypen mit Threonin an der

Position 80 starke NK-Zellinhibitoren (Luque *et al.*, 1996). Isoleucin an Position 80 konnte jedoch bisher bei keinem der Mamu-A-Moleküle nachgewiesen werden (vergl. Tab. 4.6).

Zusätzlich wurden serologische Epitope, die bei der Interaktion von HLA-A- und HLA-B-Molekülen mit KIR3DL-Molekülen eine Rolle spielen, in die Auswertung miteinbezogen. Humane KIR3DL binden nur HLA-A- und HLA-B-Moleküle, die das Bw4⁺-Epitop in der α 1-Domäne exprimieren (Dohring *et al.*, 1996; Gumperz *et al.*, 1997; Gumperz *et al.*, 1995). Die AS-Sequenzen von Mamu-A*01, Mamu-A*1303 und Mamu-A*1403 weisen jedoch unterschiedliche Epitope auf. Mamu-A*01 exprimiert das Bw4⁺-Epitop, Mamu-A*1303 weist das Bw6⁺-Epitop auf und Mamu-A*1403 kann keiner der beiden Gruppen zugewiesen werden (vergl. Abb. 4.29).

Die hier durchgeführten Sequenzvergleiche legen nahe, dass die Region zwischen Position 77 und 83 für die Mamu-A-Interaktion mit Rhesusaffen KIR3DL-Molekülen keine entscheidende Rolle spielt. Abweichungen in den Bindungsregionen gegenüber denen, die für HLA-C und KIR2DL identifiziert wurden, sind durchaus denkbar, da der verwendete Rezeptor statt zwei drei Ig-Domänen umfasst. Für die Bindung von HLA-A- und HLA-B- an KIR3DL-Moleküle liegen bis dato noch keine Kristallstrukturanalysen vor. Daher wurde in den mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Bindung beteiligten α 1- und α 2-Domänen nach Gemeinsamkeiten der identifizierten KIR3DLneu3-Liganden gegenüber den Sequenzen der anderen verwendeten Mamu-A-Transfektanten gesucht. Einige AS-Reste weisen allein Mamu-A*01 und Mamu-A*1303 auf. In der α 1-Domäne ist das nur an Position 70 der Fall. In der α 2-Domäne weisen Mamu-A*01 und Mamu-A*1303 mehrere gemeinsame Reste zwischen den Positionen 97 - 114 und 151 - 169 auf. Auch mit der Sequenz *Mamu-A*1403* haben die beiden Sequenzen einige AS-Reste gemeinsam. Auffällig ist zudem, dass die größten Unterschiede zwischen den Allelen des *Mamu-A1*-Gens auftreten. *Mamu-A*01*, *-A*08* und *-A*11* zeigen die größten Unterschiede in den α 1- und α 2-Domänen. Somit könnten sich unter den identifizierten gemeinsamen AS-Resten der Moleküle Mamu-A*01, *-A*1303* und *-A*1403* Positionen befinden, die entscheidend an der Bindung von KIR3DLneu3 mitwirken. Unterschiedliche Bindungsregionen zwischen MHC-Klasse-I-Molekülen, die mit 2-Ig-Domänen gegenüber solchen die mit 3-Ig-Domänen KIR interagieren, sind durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Rezeptoren durchaus denkbar. Von Rojo und Mitarbeitern (1997) konnte beispielsweise gezeigt werden, dass alle drei Ig-Domänen für eine KIR3DL-Bindung an HLA-B*5101 erforderlich sind.

In den hier vorliegenden Studien wurden ausschließlich inhibierende Rhesusaffen-KIR verwendet. Wie in Kapitel 1.4.2.1 erläutert, konnten beim Rhesusaffen keine den humanen

aktivierenden KIR2DS und KIR3DS entsprechenden KIR-Sequenzen nachgewiesen werden. Jedoch belegen sowohl die genomischen Daten als auch cDNA-Analysen, dass Rhesusaffen neben den typischen inhibierenden KIR auch einen zweiten KIR-Typ exprimieren, der eventuell eine aktivierende Funktion übernehmen könnte (Hershberger *et al.*, 2001; Sambrook *et al.*, 2005). Für die humanen KIR2DS/3DS konnte gezeigt werden, dass sie über das Adaptermolekül DAP12 NK-Zellen aktivieren können (Lanier *et al.*, 1998). Da die extrazellulären Domänen der aktivierenden KIR dem jeweiligen inhibierenden KIR-Allel stark ähneln (Parham, 2005), wird vermutet, dass sie die gleichen HLA-Liganden binden können. Vergleichende Bindungsstudien von 2-Ig-Domänen KIR mit HLA-C demonstrierten sehr schwache Bindungsaffinitäten von KIR2DS- gegenüber KIR2DL-Molekülen (Katz *et al.*, 2001; Vales-Gomez *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 1998). Ein direkter Bindungsnachweis von KIR3DS-Molekülen an HLA-A- oder HLA-B-Moleküle gelang noch nicht (Carr *et al.*, 2007; Gillespie *et al.*, 2007). Die Arbeiten von Carr und Mitarbeitern sowie von Gillespie und Mitarbeitern zeigten, dass die funktionellen Aufgaben der humanen aktivierenden KIR noch ungeklärt sind und die bisher identifizierten Liganden nur mit schwacher Affinität gebunden werden. Da die potentiell aktivierenden KIR des Rhesusaffen sich stark von den humanen aktivierenden KIR unterscheiden, ist deren Funktion rein spekulativ. Damit sind die KIR3DH des Rhesusaffen ein äußerst interessantes Forschungsfeld, wurden aber aus den hier vorliegenden ersten Interaktionsstudien zwischen MHC-Klasse-I- und KIR-Molekülen des Rhesusaffen zunächst ausgeklammert.

FAZIT und AUSBLICK

In dieser Arbeit wurden durch funktionelle Studien der MHC-Klasse-I-Gene neue Erkenntnisse über das heterogene System der *Mamu-A*- und *Mamu-B*-Regionen bei Rhesusaffen und deren Funktion bei der Immunantwort gewonnen.

Die komplexe Struktur der MHC-Klasse-I-Region des Rhesusaffen bestätigte sich auch in den Studien der vorliegenden Arbeit. Die 31 in dieser Arbeit isolierten MHC-Klasse-I-Sequenzen konnten zu großen Teilen genomisch nicht zugeordnet werden. Da nur ein vollständig sequenzierter Haplotyp vorliegt und für die MHC-Klasse-I-Region des Rhesusaffen haplotypische Unterschiede in der Anzahl und Kombination der *Mamu-A*- und *Mamu-B*-Gene angenommen werden, kann vermutlich erst durch die vollständige Sequenzierung weiterer Haplotypen dieser Region eine genaue Zuordnung von cDNA-Sequenzen gelingen.

Überraschenderweise zeigten MHC-Klasse-I-Moleküle des Rhesusaffen sehr unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen. Diese Variationen ließen sich im Rahmen der Arbeit durch verschiedene Sequenzanalysen und auch durch Arbeiten anderer Gruppen untermauern. In weiterführenden Studien sollte vor allem der Funktion von intrazellulär exprimierten Mamu-B-Molekülen nachgegangen werden. Des Weiteren sollten die Ergebnisse in einer zweiten MHC-Klasse-I-defizienten Zelllinie (z. B. in der B-Lymphoblasten-Zelllinie 721.221) verifiziert werden und die subzelluläre Lokalisation der MHC-Klasse-I-Moleküle ohne Fusion an ein fluoreszierendes Protein kontrolliert werden. Co-Transfektionen des Rhesusaffen β 2M in die stabilen Transfektanten könnten zudem klären, ob Assoziationsprobleme der schweren Kette des Rhesusaffen MHC-Klasse-I mit dem humanen β 2M vorliegen.

Aufgrund der Komplexität der MHC-Klasse-I-Region des Rhesusaffen erfolgte in den immunologischen Analysen dieser Studie eine Beschränkung auf die *Mamu-A*-Gene. Weiterführende Arbeiten sollten zunächst die Untersuchungen im Bereich der *Mamu-A*-Region vervollständigen. Erst im Verlauf dieser Doktorarbeit wurden Arbeiten über die Zugehörigkeit verschiedener isolierter cDNA-Sequenzen zu vier Gen-Loci in der *Mamu-A*-Region veröffentlicht (Otting *et al.*, 2007; Otting *et al.*, 2005). Die Etablierung einer Mamu-A-Transfektante, die ein Molekül exprimiert, das durch das *Mamu-A2*-Gen kodiert wird, gelang im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr. Dies sollte zur Vervollständigung der funktionellen Analysen der *Mamu-A*-Gene Priorität haben.

Im Anschluss wäre eine Einbeziehung der etablierten Mamu-B-Transfektanten in die immunologischen Analysen sinnvoll. Dabei sollte auf die Verwendung des Chromtests

zunächst verzichtet werden, da die gegebenen Bedingungen, wie in Kapitel 5.3 diskutiert, bislang zu keinen signifikanten Ergebnissen führten. Der Degranulierungsassay erwies sich als sensitiver und erfordert zudem ein geringeres Blutvolumen, wodurch die Verwendung von Blutgemischen vermieden werden konnte. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse würde sich die Etablierung von NK-Zellklonen anbieten. Diese könnten hinsichtlich ihrer Rezeptorausstattung typisiert werden. Dies würde Identifikationen von spezifischen Bindungen erlauben. Bei Verfügbarkeit von NK-Klonen könnten auch Zytotoxizitätsanalysen aussagekräftige Ergebnisse liefern.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien konnten demonstrieren, dass Mamu-A-Moleküle Liganden für NK-Zellrezeptoren sind. Die hier nachgewiesenen Bindungen zwischen KIR3DLneu3 und dessen Liganden Mamu-A*01 und Mamu-A*1303 bilden wichtige Grundlagen für die Interpretation von Ergebnissen aus Infektionsstudien an Rhesusaffen. Nachdem in dieser Arbeit ein Rezeptor für das in der SIV-Forschung mit einem langsameren Krankheitsverlauf assoziierte Mamu-A*01 nachgewiesen wurde, könnten in Interaktionsstudien mit verschiedenen SIV-Peptiden Informationen über den Einfluss von SIV-Infektionen auf die Interaktion von Mamu-A*01- und KIR-Molekülen gewonnen werden.

Neben weiteren MHC-Klasse-I-Transfektanten sollten in zukünftige Interaktionsstudien auch zusätzliche KIR-Ig-Fusionsproteine eingesetzt werden. Neben den inhibierenden KIR sollten auch die aktivierenden KIR in die Analysen mit einbezogen werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Struktur und Funktion der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse-I-Gene des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*, *Mamu*). Es ist bekannt, dass MHC-Klasse-I-Moleküle wesentlich an der Kontrolle der zellulären Immunantwort beteiligt sind. Für die humanen MHC-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, -B, -C) ist ein ausgeprägter Polymorphismus charakteristisch. Genetische Arbeiten konnten in den letzten Jahren allerdings zeigen, dass sich Mensch und Rhesusaffe in der MHC-Klasse-I-Region stark unterscheiden. Die *Mamu-A*- und vor allem die *Mamu-B*-Regionen weisen viele Genduplikationen und einen ausgeprägten haplotypischen An- und Abwesenheitspolymorphismus der einzelnen Gen-Loci auf. Die funktionelle Bedeutung dieser Fülle an Genen war bislang ungeklärt.

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Expression und Funktion von *Mamu-A*- und *Mamu-B*-Molekülen. Im Rahmen der Arbeit gelang die Etablierung von fünf *Mamu-A*-, 13 *Mamu-B*- sowie einer *Mamu-I*- und einer *Mamu-E*-Transfektanten in der humanen Zelllinie K562 (MHC-Klasse-I-negativ). Sowohl lasermikroskopische als auch durchflusszytometrische Analysen zeigten eine starke Oberflächenexpression der verschiedenen untersuchten *Mamu-A*-Moleküle. Demgegenüber wiesen die *Mamu-B*-Moleküle divergente Expressionsmuster auf. Auch hier konnten Allele mit hoher Oberflächenexpression nachgewiesen werden. Einige der *Mamu-B*-Transfektanten zeigten jedoch eine überwiegend intrazelluläre Expression. Damit liefern die hier präsentierten Ergebnisse Hinweise auf ein heterogenes System der Funktionen der MHC-Klasse-I-Moleküle beim Rhesusaffen.

In immunologischen Testverfahren zur Natürlichen Killerzell (NK) -Zytotoxizität und zur NK-Zellaktivierung konnte gezeigt werden, dass *Mamu-A*-Moleküle Zielstrukturen für inhibitorische Rezeptoren auf NK-Zellen darstellen und damit die Aktivierung von NK-Zellen vermindern können. Zusätzlich konnten Unterschiede in der Stärke der NK-Zellinhibition durch die Moleküle der verschiedenen *Mamu-A*-Gen-Loci nachgewiesen werden. Vor allem die durch das *Mamu-AI*-Gen kodierten Moleküle konnten eine starke NK-Zellinhibition auslösen und dürften daher beim Rhesusaffen vermutlich eine zentrale Rolle in der MHC-Klasse-I-vermittelten NK-Zellregulation spielen.

Humane MHC-Klasse-I-Moleküle sind Liganden für Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR) auf NK-Zellen. Für den Rhesusaffen gelang in dieser Arbeit erstmals der experimentelle Nachweis einer spezifischen Interaktion zwischen *Mamu-A*- und KIR-Molekülen in einem *in vitro*-Modell.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit implizieren, dass die *Mamu-B*-Gene ein sehr heterogenes System bilden, bei dem einzelne Gene vermutlich verschiedene Funktionen in der Immunantwort übernehmen. Analysen zur subzellulären Lokalisation lieferten zudem Hinweise auf intrazelluläre Aufgaben einzelner Mamu-B-Moleküle.

Die in dieser Arbeit durchgeführten immunologischen Tests und Interaktionsstudien legen zudem nahe, dass MHC-A-Moleküle eine zentrale Rolle in der NK-Zellregulierung des Rhesusaffen spielen, im Gegensatz zu höheren Primaten (z. B. Mensch, Schimpanse), die dafür eher die MHC-C-Moleküle nutzen.

SUMMARY

This thesis focuses on the structure and function of rhesus macaque (*Macaca mulatta*, *Mamu*) major histocompatibility complex (MHC) class I genes. As the cellular immune response is at least partly controlled by MHC class I molecules new insights in the structure and function of this group of molecules will advance our understanding of the rhesus monkey's immune response and how results of infectious studies in macaques can be transferred to the human system.

The human MHC class I molecules (HLA-A, -B and -C) are characterized by a high degree of polymorphisms. A complete sequenced haplotyp of the rhesus macaque MHC revealed considerable differences compared to humans with regard to extensive duplications and haplotypic presence-absence polymorphisms. The functional significance of this plethora of MHC class I genes remains, however, unknown so far.

One goal of this study was the characterization of *Mamu-A* and *Mamu-B* genes by means of expression studies as well as the functional analysis. Therefore five *Mamu-A*, 13 *Mamu-B*, one *Mamu-I* and one *Mamu-E* stable transfectants were established. Furthermore, confocal microscopy and flow cytometry studies revealed high levels of MHC class I surface expression for *Mamu-A* molecules. On the other hand *Mamu-B* molecules exhibited divergent expression patterns, including surface and intracellular expression for some alleles. These results indicate a heterogeneous system of MHC class I function in rhesus macaques.

Immunological assays for natural killer (NK) cell cytotoxicity and for NK cell activation (via degranulation) identified *Mamu-A* molecules as a target site for inhibitory NK cell receptors leading to an inhibitory effect on NK cell activation. Additionally, molecules encoded by the *Mamu-A1* gene have been shown to be more potent in inhibition of NK cell activation than the molecules encoded by other *Mamu-A* genes.

Human MHC class I molecules are ligands for killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) on NK cells. In this study specific interactions between *Mamu-A* and KIR molecules were shown in an *in vitro* model system.

The presented results give rise to the assumption of MHC-A molecules in rhesus macaques playing a central role in NK cell regulation, whereas in higher primates (e. g. human and chimpanzee) MHC-C contribute as the major ligand for NK cell receptors.

LITERATURVERZEICHNIS

Adams, E. J. und Parham, P. 2001. Species-specific evolution of MHC class I genes in the higher primates. *Immunol Rev*, 183, 41-64.

Adams, E. J., Thomson, G. und Parham, P. 1999. Evidence for an HLA-C-like locus in the orangutan *Pongo pygmaeus*. *Immunogenetics*, 49, 865-871.

Ahmed-Ansari, A., Brodie, A. R., Fultz, P. N., Anderson, D. C., Sell, K. W. und McClure, H. M. 1989. Flow Microfluorometric Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells From Nonhuman Primates: Correlation of Phenotype With Immune Function. *American Journal of Primatology*, 17, 107-131.

Alcami, A. und Koszinowski, U. H. 2000. Viral mechanisms of immune evasion. *Trends Microbiol*, 8, 410-418.

Allen, H., Fraser, J., Flyer, D., Calvin, S. und Flavell, R. 1986. Beta 2-microglobulin is not required for cell surface expression of the murine class I histocompatibility antigen H-2Db or of a truncated H-2Db. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 7447-7451.

Allen, T. M., Sidney, J., del Guercio, M. F., Glickman, R. L., Lensmeyer, G. L., Wiebe, D. A., DeMars, R., Pauza, C. D., Johnson, R. P., Sette, A. und Watkins, D. I. 1998. Characterization of the peptide binding motif of a rhesus MHC class I molecule (Mamu-A*01) that binds an immunodominant CTL epitope from simian immunodeficiency virus. *J Immunol*, 160, 6062-6071.

Andersen, H., Rossio, J. L., Coalter, V., Poore, B., Martin, M. P., Carrington, M. und Lifson, J. D. 2004. Characterization of rhesus macaque natural killer activity against a rhesus-derived target cell line at the single-cell level. *Cell Immunol*, 231, 85-95.

Arce-Gomez, B., Jones, E. A., Barnstable, C. J., Solomon, E. und Bodmer, W. F. 1978. The genetic control of HLA-A and B antigens in somatic cell hybrids: requirement for beta2 microglobulin. *Tissue Antigens*, 11, 96-112.

Barakonyi, A., Rabot, M., Marie-Cardine, A., Aguerre-Girr, M., Polgar, B., Schiavon, V., Bensussan, A. und Le Bouteiller, P. 2004. Cutting edge: engagement of CD160 by its HLA-C physiological ligand triggers a unique cytokine profile secretion in the cytotoxic peripheral blood NK cell subset. *J Immunol*, 173, 5349-5354.

Barnstable, C. J., Bodmer, W. F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A. F. und Ziegler, A. 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell*, 14, 9-20.

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L. und Spies, T. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 285, 727-729.

Berggard, I. und Bearn, A. G. 1968. Isolation and properties of a low molecular weight β 2-globulin occurring in human biological fluids. *J Biol Chem*, 243, 4095-4103.

- Betts, M. R., Brenchley, J. M., Price, D. A., De Rosa, S. C., Douek, D. C., Roederer, M. und Koup, R. A.** 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods*, 281, 65-78.
- Betts, M. R. und Koup, R. A.** 2004. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods Cell Biol*, 75, 497-512.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. und Wiley, D. C.** 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329, 506-512.
- Bondarenko, G. I., Burleigh, D. W., Durning, M., Breburda, E. E., Grendell, R. L. und Golos, T. G.** 2007. Passive immunization against the MHC class I molecule Mamu-AG disrupts rhesus placental development and endometrial responses. *J Immunol*, 179, 8042-8050.
- Boyington, J. C., Brooks, A. G. und Sun, P. D.** 2001. Structure of killer cell immunoglobulin-like receptors and their recognition of the class I MHC molecules. *Immunol Rev*, 181, 66-78.
- Boyington, J. C., Motyka, S. A., Schuck, P., Brooks, A. G. und Sun, P. D.** 2000. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature*, 405, 537-543.
- Boyson, J. E., Iwanaga, K. K., Golos, T. G. und Watkins, D. I.** 1996a. Identification of the rhesus monkey HLA-G ortholog. Mamu-G is a pseudogene. *J Immunol*, 157, 5428-5437.
- Boyson, J. E., Shufflebotham, C., Cadavid, L. F., Urvater, J. A., Knapp, L. A., Hughes, A. L. und Watkins, D. I.** 1996b. The MHC class I genes of the rhesus monkey. Different evolutionary histories of MHC class I and II genes in primates. *J Immunol*, 156, 4656-4665.
- Braud, V. M., Allan, D. S. und McMichael, A. J.** 1999. Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr Opin Immunol*, 11, 100-108.
- Brooks, A. G., Borrego, F., Posch, P. E., Patamawenu, A., Scorzelli, C. J., Ulbrecht, M., Weiss, E. H. und Coligan, J. E.** 1999. Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA class I molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells. *J Immunol*, 162, 305-313.
- Carr, W. H., Pando, M. J. und Parham, P.** 2005. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol*, 175, 5222-5229.
- Carr, W. H., Rosen, D. B., Arase, H., Nixon, D. F., Michaelsson, J. und Lanier, L. L.** 2007. Cutting Edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation. *J Immunol*, 178, 647-651.
- Carrington, M., Nelson, G. W., Martin, M. P., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J. J., Kaslow, R., Buchbinder, S., Hoots, K. und O'Brien, S. J.** 1999. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science*, 283, 1748-1752.

- Cella, M., Longo, A., Ferrara, G. B., Strominger, J. L. und Colonna, M.** 1994. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med*, 180, 1235-1242.
- Chen, Z. W., McAdam, S. N., Hughes, A. L., Dogon, A. L., Letvin, N. L. und Watkins, D. I.** 1992. Molecular cloning of orangutan and gibbon MHC class I cDNA. The HLA-A and -B loci diverged over 30 million years ago. *J Immunol*, 148, 2547-2554.
- Choi, E. I., Wang, R., Peterson, L., Letvin, N. L. und Reimann, K. A.** 2008. Use of an anti-CD16 antibody for in vivo depletion of natural killer cells in rhesus macaques. *Immunology*, PMID: 18201184 (in Druck).
- Chu, F., Lou, Z., Chen, Y. W., Liu, Y., Gao, B., Zong, L., Khan, A. H., Bell, J. I., Rao, Z. und Gao, G. F.** 2007. First glimpse of the peptide presentation by rhesus macaque MHC class I: crystal structures of Mamu-A*01 complexed with two immunogenic SIV epitopes and insights into CTL escape. *J Immunol*, 178, 944-952.
- Davis, D. M., Chiu, I., Fassett, M., Cohen, G. B., Mandelboim, O. und Strominger, J. L.** 1999. The human natural killer cell immune synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 15062-15067.
- Daza-Vamenta, R., Glusman, G., Rowen, L., Guthrie, B. und Geraghty, D. E.** 2004. Genetic divergence of the rhesus macaque major histocompatibility complex. *Genome Res*, 14, 1501-1515.
- Defranco, A. L. und Locksley, R.** 2007. *Immunity: The immune response in infectious & inflammatory disease (Primers in biology series)*. New Edition, Oxford, England, Oxford University Press.
- Delves, P. J. und Roitt, I. M.** 2000a. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*, 343, 37-49.
- Delves, P. J. und Roitt, I. M.** 2000b. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*, 343, 108-117.
- Dohring, C., Scheidegger, D., Samaridis, J., Cella, M. und Colonna, M.** 1996. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol*, 156, 3098-3101.
- Dubois, V., Tiercy, J. M., Labonne, M. P., Dormoy, A. und Gebuhrer, L.** 2004. A new HLA-B44 allele (B*44020102S) with a splicing mutation leading to a complete deletion of exon 5. *Tissue Antigens*, 63, 173-180.
- Dunlop, M. B. und Blanden, R. V.** 1977. Mechanisms of suppression of cytotoxic T-cell responses in murine lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Exp Med*, 145, 1131-1143.
- Dzuris, J. L., Sidney, J., Appella, E., Chesnut, R. W., Watkins, D. I. und Sette, A.** 2000. Conserved MHC class I peptide binding motif between humans and rhesus macaques. *J Immunol*, 164, 283-291.

- Ennis, P. D., Jackson, A. P. und Parham, P.** 1988. Molecular cloning of bovine class I MHC cDNA. *J Immunol*, 141, 642-651.
- Evans, D. T., Knapp, L. A., Jing, P., Mitchen, J. L., Dykhuizen, M., Montefiori, D. C., Pauza, C. D. und Watkins, D. I.** 1999. Rapid and slow progressors differ by a single MHC class I haplotype in a family of MHC-defined rhesus macaques infected with SIV. *Immunol Lett*, 66, 53-59.
- Falk, C. S., Noessner, E., Weiss, E. H. und Schendel, D. J.** 2002. Retaliation against tumor cells showing aberrant HLA expression using lymphokine activated killer-derived T cells. *Cancer Res*, 62, 480-487.
- Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. und Rammensee, H. G.** 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351, 290-296.
- Fan, Q. R., Garboczi, D. N., Winter, C. C., Wagtmann, N., Long, E. O. und Wiley, D. C.** 1996. Direct binding of a soluble natural killer cell inhibitory receptor to a soluble human leukocyte antigen-Cw4 class I major histocompatibility complex molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 7178-7183.
- Fan, Q. R., Long, E. O. und Wiley, D. C.** 2001. Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nat Immunol*, 2, 452-460.
- Fujii, T., Ishitani, A. und Geraghty, D. E.** 1994. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol*, 153, 5516-5524.
- Gao, X., Nelson, G. W., Karacki, P., Martin, M. P., Phair, J., Kaslow, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., O'Brien, S. J. und Carrington, M.** 2001. Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N Engl J Med*, 344, 1668-1675.
- Gasser, S. und Raulat, D. H.** 2006. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev*, 214, 130-142.
- Germain, R. N. und Malissen, B.** 1986. Analysis of the expression and function of class-II major histocompatibility complex-encoded molecules by DNA-mediated gene transfer. *Annu Rev Immunol*, 4, 281-315.
- Gillespie, G. M., Bashirova, A., Dong, T., McVicar, D. W., Rowland-Jones, S. L. und Carrington, M.** 2007. Lack of KIR3DS1 binding to MHC class I Bw4 tetramers in complex with CD8+ T cell epitopes. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 23, 451-455.
- Guethlein, L. A., Flodin, L. R., Adams, E. J. und Parham, P.** 2002. NK cell receptors of the orangutan (*Pongo pygmaeus*): a pivotal species for tracking the coevolution of killer cell Ig-like receptors with MHC-C. *J Immunol*, 169, 220-229.
- Gumperz, J. E., Barber, L. D., Valiante, N. M., Percival, L., Phillips, J. H., Lanier, L. L. und Parham, P.** 1997. Conserved and variable residues within the Bw4 motif of HLA-B make separable contributions to recognition by the NKB1 killer cell-inhibitory receptor. *J Immunol*, 158, 5237-5241.

- Gumperz, J. E., Litwin, V., Phillips, J. H., Lanier, L. L. und Parham, P.** 1995. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med*, 181, 1133-1144.
- Hall, T. A.** 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41, 95 - 98.
- Hamai, Y., Fujii, T., Miki, A., Geraghty, D. E., Harada, I., Takai, Y., Kozuma, S., Tsutsumi, O. und Taketani, Y.** 1999. Quantitative assessment of human leukocyte antigen-G protein in amniotic fluid by a double-determinant enzyme-linked immunosorbent assay using anti-human leukocyte antigen-G-specific antibody '87G'. *Am J Reprod Immunol*, 41, 293-295.
- Hansasuta, P., Dong, T., Thananchai, H., Weekes, M., Willberg, C., Aldemir, H., Rowland-Jones, S. und Braud, V. M.** 2004. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol*, 34, 1673-1679.
- Hershberger, K. L., Kurian, J., Korber, B. T. und Letvin, N. L.** 2005. Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) of the African-origin rhesus monkey: evidence for recombination events in the evolution of KIR. *Eur J Immunol*, 35, 922-935.
- Hershberger, K. L., Shyam, R., Miura, A. und Letvin, N. L.** 2001. Diversity of the killer cell Ig-like receptors of rhesus monkeys. *J Immunol*, 166, 4380-4390.
- Hsu, K. C., Liu, X. R., Selvakumar, A., Mickelson, E., O'Reilly, R. J. und Dupont, B.** 2002. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol*, 169, 5118-5129.
- Huber, I., Walter, L., Wimmer, R., Pasantes, J. J., Gunther, E. und Schempp, W.** 2003. Cytogenetic mapping and orientation of the rhesus macaque MHC. *Cytogenet Genome Res*, 103, 144-149.
- Hughes, A. L. und Hughes, M. K.** 1995. Natural selection on the peptide-binding regions of major histocompatibility complex molecules. *Immunogenetics*, 42, 233-243.
- Hughes, A. L. und Nei, M.** 1988. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature*, 335, 167-170.
- Hughes, E. A., Hammond, C. und Cresswell, P.** 1997. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 1896-1901.
- Janeway, C. A., Chervonsky, A. V. und Sant'Angelo, D.** 1997. T-cell receptors: is the repertoire inherently MHC-specific? *Curr Biol*, 7, R299-300.
- Janeway, C. A., Jr. und Medzhitov, R.** 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216.

- Jin, X., Gao, X., Ramanathan, M., Jr., Deschenes, G. R., Nelson, G. W., O'Brien, S. J., Goedert, J. J., Ho, D. D., O'Brien, T. R. und Carrington, M.** 2002. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8⁺-T-cell responses for groups of HIV-1-infected individuals with different HLA-B*35 genotypes. *J Virol*, 76, 12603-12610.
- Kaizu, M., Borchardt, G. J., Glidden, C. E., Fisk, D. L., Loffredo, J. T., Watkins, D. I. und Rehrauer, W. M.** 2007. Molecular typing of major histocompatibility complex class I alleles in the Indian rhesus macaque which restrict SIV CD8⁺ T cell epitopes. *Immunogenetics*, 59, 693-703.
- Karl, J. A., Wiseman, R. W., Campbell, K. J., Blasky, A. J., Hughes, A. L., Ferguson, B., Read, D. S. und O'Connor, D. H.** 2008. Identification of MHC class I sequences in Chinese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics*, 60, 37-46.
- Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. und Kiessling, R.** 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 319, 675-678.
- Katz, G., Markel, G., Mizrahi, S., Arnon, T. I. und Mandelboim, O.** 2001. Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short tail number 4. *J Immunol*, 166, 7260-7267.
- Khakoo, S. I., Rajalingam, R., Shum, B. P., Weidenbach, K., Flodin, L., Muir, D. G., Canavez, F., Cooper, S. L., Valiante, N. M., Lanier, L. L. und Parham, P.** 2000. Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans. *Immunity*, 12, 687-698.
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S. M., Lybarger, L., Song, Y. J., Yang, L., French, A. R., Sunwoo, J. B., Lemieux, S., Hansen, T. H. und Yokoyama, W. M.** 2005. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, 436, 709-713.
- Klein, E., Ben-Bassat, H., Neumann, H., Ralph, P., Zeuthen, J., Polliack, A. und Vanky, F.** 1976. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*, 18, 421-431.
- Koller, B. H., Marrack, P., Kappler, J. W. und Smithies, O.** 1990. Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8⁺ T cells. *Science*, 248, 1227-1230.
- Kozak, M.** 1984. Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. *Nature*, 308, 241-246.
- Krangel, M. S.** 1985. Unusual RNA splicing generates a secreted form of HLA-A2 in a mutagenized B lymphoblastoid cell line. *Embo J*, 4, 1205-1210.
- Kulski, J. K., Anzai, T., Shiina, T. und Inoko, H.** 2004. Rhesus macaque class I duplicon structures, organization, and evolution within the alpha block of the major histocompatibility complex. *Mol Biol Evol*, 21, 2079-2091.

- Kumar, S., Tamura, K. und Nei, M.** 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5, 150-163.
- Lafont, B. A., McGraw, C. M., Stukes, S. A., Buckler-White, A., Plishka, R. J., Byrum, R. A., Hirsch, V. M. und Martin, M. A.** 2007. The locus encoding an oligomorphic family of MHC-A alleles (Mane-A*06/Mamu-A*05) is present at high frequency in several macaque species. *Immunogenetics*, 59, 211-223.
- Lanier, L. L.** 1998. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*, 16, 359-393.
- Lanier, L. L.** 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*, 23, 225-274.
- Lanier, L. L., Corliss, B. C., Wu, J., Leong, C. und Phillips, J. H.** 1998. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature*, 391, 703-707.
- Le Bouteiller, P. und Mallet, V.** 1997. HLA-G and pregnancy. *Rev Reprod*, 2, 7-13.
- Lee, N. und Geraghty, D. E.** 2003. HLA-F surface expression on B cell and monocyte cell lines is partially independent from tapasin and completely independent from TAP. *J Immunol*, 171, 5264-5271.
- Lee, N., Goodlett, D. R., Ishitani, A., Marquardt, H. und Geraghty, D. E.** 1998. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol*, 160, 4951-4960.
- Litwin, V., Gumperz, J., Parham, P., Phillips, J. H. und Lanier, L. L.** 1994. NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med*, 180, 537-543.
- Ljunggren, H. G. und Kärre, K.** 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 11, 237-244.
- Loffredo, J. T., Maxwell, J., Qi, Y., Glidden, C. E., Borchardt, G. J., Soma, T., Bean, A. T., Beal, D. R., Wilson, N. A., Rehrauer, W. M., Lifson, J. D., Carrington, M. und Watkins, D. I.** 2007. Mamu-B*08-positive macaques control simian immunodeficiency virus replication. *J Virol*, 81, 8827-8832.
- Lozzio, B. B. und Lozzio, C. B.** 1979. Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk Res*, 3, 363-370.
- Luque, I., Solana, R., Galiani, M. D., Gonzalez, R., Garcia, F., Lopez de Castro, J. A. und Pena, J.** 1996. Threonine 80 on HLA-B27 confers protection against lysis by a group of natural killer clones. *Eur J Immunol*, 26, 1974-1977.
- Maenaka, K., Juji, T., Nakayama, T., Wyer, J. R., Gao, G. F., Maenaka, T., Zaccai, N. R., Kikuchi, A., Yabe, T., Tokunaga, K., Tadokoro, K., Stuart, D. I., Jones, E. Y. und van der Merwe, P. A.** 1999. Killer cell immunoglobulin receptors and T cell receptors bind peptide-major histocompatibility complex class I with distinct thermodynamic and kinetic properties. *J Biol Chem*, 274, 28329-28334.

- Martin, A. M., Kulski, J. K., Gaudieri, S., Witt, C. S., Freitas, E. M., Trowsdale, J. und Christiansen, F. T.** 2004. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. *Gene*, 335, 121-131.
- Martin, M. P., Nelson, G., Lee, J. H., Pellett, F., Gao, X., Wade, J., Wilson, M. J., Trowsdale, J., Gladman, D. und Carrington, M.** 2002. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol*, 169, 2818-2822.
- Martin, M. P., Qi, Y., Gao, X., Yamada, E., Martin, J. N., Pereyra, F., Colombo, S., Brown, E. E., Shupert, W. L., Phair, J., Goedert, J. J., Buchbinder, S., Kirk, G. D., Telenti, A., Connors, M., O'Brien, S. J., Walker, B. D., Parham, P., Deeks, S. G., McVicar, D. W. und Carrington, M.** 2007. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet*, 39, 733-740.
- Masilamani, M., Nguyen, C., Kabat, J., Borrego, F. und Coligan, J. E.** 2006. CD94/NKG2A inhibits NK cell activation by disrupting the actin network at the immunological synapse. *J Immunol*, 177, 3590-3596.
- Migueles, S. A., Sabbaghian, M. S., Shupert, W. L., Bettinotti, M. P., Marincola, F. M., Martino, L., Hallahan, C. W., Selig, S. M., Schwartz, D., Sullivan, J. und Connors, M.** 2000. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 2709-2714.
- Miller, M. D., Yamamoto, H., Hughes, A. L., Watkins, D. I. und Letvin, N. L.** 1991. Definition of an epitope and MHC class I molecule recognized by gag-specific cytotoxic T lymphocytes in SIVmac-infected rhesus monkeys. *J Immunol*, 147, 320-329.
- Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Orengo, A. M., Millo, R., Pelicci, P. G., Ciccone, E. und Moretta, L.** 1990. Human T lymphocytes expressing TCR gamma/delta. *Res Immunol*, 141, 630-635.
- Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., Orengo, A. M., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Ciccone, E. und Moretta, L.** 1993. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med*, 178, 597-604.
- Moretta, A., Vitale, M., Sivori, S., Morelli, L., Pende, D. und Bottino, C.** 1996. Inhibitory and activatory receptors for HLA class I molecules in human natural killer cells. *Chem Immunol*, 64, 77-87.
- Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C. und Moretta, A.** 2000. Human NK-cell receptors. *Immunol Today*, 21, 420-422.
- Mothe, B. R., Weinfurter, J., Wang, C., Rehrauer, W., Wilson, N., Allen, T. M., Allison, D. B. und Watkins, D. I.** 2003. Expression of the major histocompatibility complex class I molecule Mamu-A*01 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol*, 77, 2736-2740.

- Mühl, T., Krawczak, M., Ten Haaf, P., Hunsmann, G. und Sauermann, U.** 2002. MHC class I alleles influence set-point viral load and survival time in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Immunol*, 169, 3438-3446.
- Natali, P. G., Fawwaz, R., Ruiter, D. J., Bigotti, A., Kageshita, T., Temponi, M. und Ferrone, S.** 1989. Immunodiagnostic and immunotherapeutic applications of anti human melanoma associated antigen monoclonal antibodies. *Carcinog Compr Surv*, 11, 133-163.
- Natarajan, K., Dimasi, N., Wang, J., Margulies, D. H. und Mariuzza, R. A.** 2002. MHC class I recognition by Ly49 natural killer cell receptors. *Mol Immunol*, 38, 1023-1027.
- Natarajan, K., Li, H., Mariuzza, R. A. und Margulies, D. H.** 1999. MHC class I molecules, structure and function. *Rev Immunogenet*, 1, 32-46.
- O'Callaghan, C. A. und Bell, J. I.** 1998. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunol Rev*, 163, 129-138.
- O'Connor, D. H., Mothe, B. R., Weinfurter, J. T., Fuenger, S., Rehrauer, W. M., Jing, P., Rudersdorf, R. R., Liebl, M. E., Krebs, K., Vasquez, J., Dodds, E., Loffredo, J., Martin, S., McDermott, A. B., Allen, T. M., Wang, C., Doxiadis, G. G., Montefiori, D. C., Hughes, A., Burton, D. R., Allison, D. B., Wolinsky, S. M., Bontrop, R., Picker, L. J. und Watkins, D. I.** 2003. Major histocompatibility complex class I alleles associated with slow simian immunodeficiency virus disease progression bind epitopes recognized by dominant acute-phase cytotoxic-T-lymphocyte responses. *J Virol*, 77, 9029-9040.
- Onfelt, B., Nedvetzki, S., Yanagi, K. und Davis, D. M.** 2004. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol*, 173, 1511-1513.
- Otting, N., de Vos-Rouweler, A. J., Heijmans, C. M., de Groot, N. G., Doxiadis, G. G. und Bontrop, R. E.** 2007. MHC class I A region diversity and polymorphism in macaque species. *Immunogenetics*, 59, 367-375.
- Otting, N., Heijmans, C. M., Noort, R. C., de Groot, N. G., Doxiadis, G. G., van Rood, J. J., Watkins, D. I. und Bontrop, R. E.** 2005. Unparalleled complexity of the MHC class I region in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 1626-1631.
- Pando, M. J., Gardiner, C. M., Gleimer, M., McQueen, K. L. und Parham, P.** 2003. The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J Immunol*, 171, 6640-6649.
- Parham, P.** 2005. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*, 5, 201-214.
- Parham, P., Barnstable, C. J. und Bodmer, W. F.** 1979. Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C, antigens. *J Immunol*, 123, 342-349.
- Parham, P. und McQueen, K. L.** 2003. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev Immunol*, 3, 108-122.

- Parham, P. und Ploegh, H. L.** 1980. Molecular characterization of HLA-A, B homologues in owl monkeys and other nonhuman primates. *Immunogenetics*, 11, 131-143.
- Paul, P., Cabestre, F. A., Ibrahim, E. C., Lefebvre, S., Khalil-Daher, I., Vazeux, G., Quiles, R. M., Bermond, F., Dausset, J. und Carosella, E. D.** 2000. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol*, 61, 1138-1149.
- Payne, R. und Rolfs, M. R.** 1958. Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest*, 37, 1756-1763.
- Powell, J. D., McClure, H. M., Anderson, D., Fultz, P. N., Sell, K. W. und Ahmed-Ansari, A.** 1989. Phenotypic and functional differences in NK and LAK cells in the peripheral blood of sooty mangabeys and rhesus macaques. *Cell Immunol*, 124, 107-118.
- Puppo, F., Costa, M., Contini, P., Brenci, S., Cevasco, E., Ghio, M., Norelli, R., Bensussan, A., Capitanio, G. L. und Indiveri, F.** 1999. Determination of soluble HLA-G and HLA-A, -B, and -C molecules in pregnancy. *Transplant Proc*, 31, 1841-1843.
- Rajagopalan, S., Bryceson, Y. T., Kuppusamy, S. P., Geraghty, D. E., van der Meer, A., Joosten, I. und Long, E. O.** 2006. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol*, 4, e9.
- Rajagopalan, S. und Long, E. O.** 1997. The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4 exhibits peptide selectivity. *J Exp Med*, 185, 1523-1528.
- Rajagopalan, S. und Long, E. O.** 1999. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med*, 189, 1093-1100.
- Rajalingam, R., Parham, P. und Abi-Rached, L.** 2004. Domain shuffling has been the main mechanism forming new hominoid killer cell Ig-like receptors. *J Immunol*, 172, 356-369.
- Rammensee, H. G., Friede, T. und Stevanović, S.** 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 41, 178-228.
- Raulet, D. H.** 2004. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol*, 5, 996-1002.
- Ravetch, J. V. und Lanier, L. L.** 2000. Immune inhibitory receptors. *Science*, 290, 84-89.
- Rebmann, V., Pfeiffer, K., Passler, M., Ferrone, S., Maier, S., Weiss, E. und Grosse-Wilde, H.** 1999. Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. *Tissue Antigens*, 53, 14-22.
- Reed, R.** 1996. Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr Opin Genet Dev*, 6, 215-220.
- Robertson, M. J. und Ritz, J.** 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*, 76, 2421-2438.

- Rodgers, J. R. und Cook, R. G.** 2005. MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nat Rev Immunol*, 5, 459-471.
- Rojo, S., Wagtmann, N. und Long, E. O.** 1997. Binding of a soluble p70 killer cell inhibitory receptor to HLA-B*5101: requirement for all three p70 immunoglobulin domains. *Eur J Immunol*, 27, 568-571.
- Roos, C. und Walter, L.** 2005. Considerable haplotypic diversity in the RT1-CE class I gene region of the rat major histocompatibility complex. *Immunogenetics*, 56, 773-777.
- Sadasivan, B., Lehner, P. J., Ortmann, B., Spies, T. und Cresswell, P.** 1996. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity*, 5, 103-114.
- Sambrook, J. G., Bashirova, A., Andersen, H., Piatak, M., Vernikos, G. S., Coggill, P., Lifson, J. D., Carrington, M. und Beck, S.** 2006. Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates. *BMC Genomics*, 7, 209.
- Sambrook, J. G., Bashirova, A., Palmer, S., Sims, S., Trowsdale, J., Abi-Rached, L., Parham, P., Carrington, M. und Beck, S.** 2005. Single haplotype analysis demonstrates rapid evolution of the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) loci in primates. *Genome Res*, 15, 25-35.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-5467.
- Saper, M. A., Bjorkman, P. J. und Wiley, D. C.** 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol*, 219, 277-319.
- Sauermann, U., Siddiqui, R., Suh, Y. S., Platzer, M., Leuchte, N., Meyer, H., Matz-Rensing, K., Stoiber, H., Nurnberg, P., Hunsmann, G., Stahl-Hennig, C. und Krawczak, M.** 2008. Mhc class I haplotypes associated with survival time in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected rhesus macaques. *Genes Immun*, 9, 69-80.
- Schleypen, J. S., Von Geldern, M., Weiss, E. H., Kotzias, N., Rohrmann, K., Schendel, D. J., Falk, C. S. und Pohla, H.** 2003. Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes. *Int J Cancer*, 106, 905-912.
- Scorza Smeraldi, R., Fabio, G., Lazzarin, A., Eisera, N., Uberti Foppa, C., Moroni, M. und Zanussi, C.** 1988. HLA-associated susceptibility to AIDS: HLA B35 is a major risk factor for Italian HIV-infected intravenous drug addicts. *Hum Immunol*, 22, 73-79.
- Sernee, M. F., Ploegh, H. L. und Schust, D. J.** 1998. Why certain antibodies cross-react with HLA-A and HLA-G: epitope mapping of two common MHC class I reagents. *Mol Immunol*, 35, 177-188.
- Sette, A., Sidney, J., Bui, H. H., del Guercio, M. F., Alexander, J., Loffredo, J., Watkins, D. I. und Mothe, B. R.** 2005. Characterization of the peptide-binding specificity of Mamu-A*11 results in the identification of SIV-derived epitopes and interspecies cross-reactivity. *Immunogenetics*, 57, 53-68.

- Shilling, H. G., Guethlein, L. A., Cheng, N. W., Gardiner, C. M., Rodriguez, R., Tyan, D. und Parham, P.** 2002. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J Immunol*, 168, 2307-2315.
- Sibilio, L., Martayan, A., Setini, A., Lo Monaco, E., Tremante, E., Butler, R. H. und Giacomini, P.** 2008. A single bottleneck in HLA-C assembly. *J Biol Chem*, 283, 1267-1274.
- Sidney, J., Dzuris, J. L., Newman, M. J., Johnson, R. P., Kaur, A., Amitinder, K., Walker, C. M., Appella, E., Mothe, B., Watkins, D. I. und Sette, A.** 2000. Definition of the Mamu A*01 peptide binding specificity: application to the identification of wild-type and optimized ligands from simian immunodeficiency virus regulatory proteins. *J Immunol*, 165, 6387-6399.
- Smith, D. G.** 2005. Genetic characterization of Indian-origin and Chinese-origin rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Comp Med*, 55, 227-230.
- Stam, N. J., Spits, H. und Ploegh, H. L.** 1986. Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products. *J Immunol*, 137, 2299-2306.
- Su, J., Luscher, M. A. und MacDonald, K. S.** 2004. Sequence of beta(2)-microglobulin from rhesus macaque (*Macaca mulatta*) includes an allelic variation in the 3'-untranslated region. *Immunogenetics*, 55, 873-877.
- Tanaka-Takahashi, Y., Yasunami, M., Naruse, T., Hinohara, K., Matano, T., Mori, K., Miyazawa, M., Honda, M., Yasutomi, Y., Nagai, Y. und Kimura, A.** 2007. Reference strand-mediated conformation analysis-based typing of multiple alleles in the rhesus macaque MHC class I Mamu-A and Mamu-B loci. *Electrophoresis*, 28, 918-924.
- Thananchai, H., Gillespie, G., Martin, M. P., Bashirova, A., Yawata, N., Yawata, M., Easterbrook, P., McVicar, D. W., Maenaka, K., Parham, P., Carrington, M., Dong, T. und Rowland-Jones, S.** 2007. Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J Immunol*, 178, 33-37.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D. G.** 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24, 4876-4882.
- The MHC sequence consortium.** 1999. Complete sequence and genemap of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 28, 921-923.
- Toth, J. und Kubes, M.** 1993. Masking of HLA class I molecules expressed on K-562 target cells can restore their susceptibility to NK cell cytotoxicity. *Immunobiology*, 188, 134-144.
- Townsend, A., Ohlen, C., Bastin, J., Ljunggren, H. G., Foster, L. und Karre, K.** 1989. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature*, 340, 443-448.
- Trowsdale, J.** 2001. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity*, 15, 363-374.

- Ullmann, A., Jacob, F. und Monod, J.** 1968. On the subunit structure of wild-type versus complemented beta-galactosidase of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 32, 1-13.
- Urvater, J. A., McAdam, S. N., Loehrke, J. H., Allen, T. M., Moran, J. L., Rowell, T. J., Rojo, S., Lopez de Castro, J. A., Taurog, J. D. und Watkins, D. I.** 2000a. A high incidence of *Shigella*-induced arthritis in a primate species: major histocompatibility complex class I molecules associated with resistance and susceptibility, and their relationship to HLA-B27. *Immunogenetics*, 51, 314-325.
- Urvater, J. A., Otting, N., Loehrke, J. H., Rudersdorf, R., Slukvin, II, Piekarczyk, M. S., Golos, T. G., Hughes, A. L., Bontrop, R. E. und Watkins, D. I.** 2000b. Mamu-I: a novel primate MHC class I B-related locus with unusually low variability. *J Immunol*, 164, 1386-1398.
- Vales-Gomez, M., Reyburn, H. T., Mandelboim, M. und Strominger, J. L.** 1998. Kinetics of interaction of HLA-C ligands with natural killer cell inhibitory receptors. *Immunity*, 9, 337-344.
- van Rood, J. J., Eernisse, J. G. und Leeuwen, A.** 1958. Leukocyte antibodies in sera of pregnant women. *Nature*, 181, 1735-1736.
- Vivier, E. und Malissen, B.** 2005. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol*, 6, 17-21.
- Wagtman, N., Rajagopalan, S., Winter, C. C., Peruzzi, M. und Long, E. O.** 1995. Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer. *Immunity*, 3, 801-809.
- Wainwright, S. D., Biro, P. A. und Holmes, C. H.** 2000. HLA-F is a predominantly empty, intracellular, TAP-associated MHC class Ib protein with a restricted expression pattern. *J Immunol*, 164, 319-328.
- Webster, R. L. und Johnson, R. P.** 2005. Delineation of multiple subpopulations of natural killer cells in rhesus macaques. *Immunology*, 115, 206-214.
- Wehler, T. C., Nonn, M., Brandt, B., Britten, C. M., Grone, M., Todorova, M., Link, I., Khan, S. A., Meyer, R. G., Huber, C., Hartwig, U. F. und Herr, W.** 2007. Targeting the activation-induced antigen CD137 can selectively deplete alloreactive T cells from antileukemic and antitumor donor T-cell lines. *Blood*, 109, 365-373.
- Westgaard, I. H., Berg, S. F., Orstavik, S., Fossum, S. und Dissen, E.** 1998. Identification of a human member of the Ly-49 multigene family. *Eur J Immunol*, 28, 1839-1846.
- Willcox, B. E., Thomas, L. M. und Bjorkman, P. J.** 2003. Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor. *Nat Immunol*, 4, 913-919.
- Winter, C. C., Gumperz, J. E., Parham, P., Long, E. O. und Wagtman, N.** 1998. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol*, 161, 571-577.

-
- Winter, C. C. und Long, E. O.** 1997. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol*, 158, 4026-4028.
- Yant, L. J., Friedrich, T. C., Johnson, R. C., May, G. E., Maness, N. J., Enz, A. M., Lifson, J. D., O'Connor, D. H., Carrington, M. und Watkins, D. I.** 2006. The high-frequency major histocompatibility complex class I allele Mamu-B*17 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol*, 80, 5074-5077.
- Yawata, M., Yawata, N., Abi-Rached, L. und Parham, P.** 2002. Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family. *Crit Rev Immunol*, 22, 463-482.
- Yokoyama, W. M., Jacobs, L. B., Kanagawa, O., Shevach, E. M. und Cohen, D. I.** 1989. A murine T lymphocyte antigen belongs to a supergene family of type II integral membrane proteins. *J Immunol*, 143, 1379-1386.
- Yokoyama, W. M. und Kim, S.** 2006. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev*, 214, 143-154.
- Yokoyama, W. M. und Seaman, W. E.** 1993. The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu Rev Immunol*, 11, 613-635.
- Yu, Y. R., Tian, X. H., Wang, Y. und Feng, M. F.** 2006. Rapid production of human KIR2DL4 extracellular domain and verification of its interaction with HLA-G. *Biochemistry (Mosc)*, 71 Suppl 1, S60-64, 64-65.

ANHANG**Tab. 10.1: Tiernummern der verwendeten Rhesusaffen**

Laufnummer	Tier-Nummer
1	1577
2	1748
3	1818
4	1874
5	1979
6	1989
7	2005
8	2022
9	2051
10	2089
11	2121
12	2136
13	2142
14	2146
15	2148
16	2154
17	2156
18	2181
19	2185
20	2196
21	2206
22	2209
23	2232
24	2237
25	2239
26	2240
27	2251
28	2255
29	2257
30	2269
31	2274
32	2284
33	2285
34	2288
35	2289
36	2296
37	2306
38	2317
39	2324
40	2326
41	2328
42	2340
43	2441
44	4991
45	4992
46	9853
47	9854
48	9858

Laufnummer	Tier-Nummer
49	9861
50	10788
51	12418
52	12419
53	12740
54	12741
55	12742
56	12743
57	12744
58	12745
59	13015
60	13411
61	13414
62	13415
63	13416

Mamu-A*01

ATGGCGCCCCGAACCCCTCCTCGTGGTCTCTCAGGGGCCCTGGTCCCTGACCCAGACCCGGGCGGGCTCTCACTCCATGAAGTATTTCT
 ACACCTCCATGTCCCGGCCCGCCGCGGGCAGCCCCGCTTACATCGCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCCGTGCGGTTTCGACAG
 CGACGCCGCGAGCCAAAGGATGGAGCCGCGGGCCTGGGTGGAGCAGGAGGGTCCGGAGTATTGGGACCGGGAGACACGGAAACATG
 AAGACCGAGACACAGAATGCCCCAGTGAACCTGCGGACCCCTGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACACCTCCAGA
 GGATGGTTGGCTGCGACCTGGGGCCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTACGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCT
 GAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCGGGCAGCTGGCGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGGGATGTGGCGGAGAGC
 ATGAGAGCCTACCTGGAGGGCCAGTGCCTGGAGTGGCTCCCCAGATACTGGAGAAGGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGACCCCC
 CCAAGACACATGTGACCCACCACCCCTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCAC
 ACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACAAACTCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCTGCAGGAGATGGAACCTCCAGAAG
 TGGGCGGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAGGACAGAGATACACCTGTCATGTGCAGCATGAGGGTCTGCCCAAGCCCCACACCTGA
 AATGGAGCCGTTTCCAGTCCACCATCCCCATGGTGGGCATCATTGCTGGCCTGGTTCTCCTTGGAGCTGTGGTCACTGGAGCTGT
 GGTGCTGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGATAGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCAAGCAGTGACAGTGCCAGGGC
 TCTGATGTTTCTTACGGCTTGTAAGTGGA

MRVMAPRLLLLVLSGALVLTQTRAGSHSMKYFYTSMSRPRGRQPRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPW
 VEQEGPEYWDRETRNMKTEFQNAFVNLRLRLLRYNQSEAGSHTLQRMVGCDDLPGDGRLLRGYEQYAYDGKDYIAL
 NEDLRSWTAADVAAQNTQRKWEADVVAESMRAYLEGQCVEWLPYLEKGETLQRTDPPKTHVTHHPVSDHEATL
 RCWALGFYPAEITLTLWQRDGEDQTDTELVETRPAGDGTFFQKWAAVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPKPHTLKWEP
 FSQSTIPMVGIIAGLVLLGAVVTGAVVAVMWRRKSSDRKGGSSYSQAASSDSAQGSVDVSLTACKV

Mamu-A*04

ATGGCGCCCCGAACCCCTCCTCGTGGTCTCTCAGGGGCTCGGCCCTGACCCAGACCCGGGCGGGCTCGCACTCCATGAGCTATTTCA
 ACACCTACATGTACGGCCCGCCGCGGGGAGCCCCGCTTTCGTCGCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCCGTGCGGTTTGACAG
 CGACGCCGCGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCCTGGGTGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGACCGGGAGACACGGATCATG
 AAGACCGAGACACAGAATGCCCCAGTGGCCCTGCGGAACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACACCTACCAGG
 TGATGTACGGCTGCGACCTGGGGCCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGGTATGAACAGTTCGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCT
 GAACGACGACCTGCGTTTCTGGACAGCCGCGGACTTGGCGGCTCAGAACACCCAGCGGAAGTGGGAGGCGGGGTTGTGGCGGAGCAG
 CACAGAACCTACCTGGAGGGCGAGTGCCTGGAGTGGCTCCGAGATACTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGCGGACCCCC
 CCAAGACACATGTGACCCACCACCCCTCTCTGACTATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCAC
 ACTGACCTGGCAGCGGGCCGGGAGGACAAACTCAGGACACGGAGCTTGTGGAGACCAGGCTGCAGGAGATGGAACCTCCAGAAG
 TGGGCGGCTGTGGTGTGTCCTTCTGGAAAAGAGCATAGATACACCTGTCATGTGCAGCATGAGGGTCCGCCCAGCCCTCACCTTGA
 GATGGGAGCCGTTTCCAGTCCACCATCCCCATCGTGGGCATCATTGCTGGCCTGGTTCTGCTTGGAGCTGTGGTCACTGGAGCTGT
 GGTGCTGTTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGATAGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCAAGCAGTGACAGTGCCAGGGC
 TCTGATGTGCTCTTACGGCTTGTAAGTGGA

MRVMAPRLLLLVLSGVLALTQTRAGSHSMSYFNITYMSRPRGRGEPFRVAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPW
 VEQEGPEYWDRETRIMKTEFQNAFVALRNLRLRLLRYNQSEAGSHTYQVMYGCDDLPGDGRLLRGYEQFAYDGKDYIAL
 NDDLRSWTAADLAAQNTQRKWEAAGVAEQHRTYLEGECLEWLRRLYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPVSDYEATL
 RCWALGFYPAEITLTLWQRAGEDQTDTELVETRPAGDGTFFQKWAAVVVP SGKEHRYTCHVQHEGPPPEPLTLRWE
 SSQSTIPVGI IAGLVLLGAVVTGAVVAVMWRRKSSDRKGGSSYSQAASSDSAQGSVDVSLTACKV

Mamu-A*0504

ATGGCGCCCCGAACCTCCTCCTGGTGCTCTCCGGGGCCCTGGCCCTGACCCAGACCTGGGCGGGCTCGCACTCCTTGAGATATTTCT
ACACCTCCATGTCCCGGCCCGGCCGCGGGCAGCCCCGCTTTCATCTCCGTGGGTACGTGGACGACACGCAGTTTCGTGCGGTTTCGACAG
CGACGCCGAGAGTCCGAGAGAGGAGCCGCGGGCCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGACCGAACAACACCGGATCTGC
AAGGCCGACACACAGACTCTCCGAGAGAACCCTGCGGACCTGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACACCTCCAGA
CGATGTACGGCTGCGACCTGGGGCCGACGGGGCCCTCCTCCGCGGGTATGACCAGTCCGCTACGACGGCAGGGATTACATCGCCCT
GAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCGCGGACATGGCGGCTCAGAACACCCAGCGGAAGTGGGAGGCGCGGGTGTGGCGGAGCAG
TGGAGAGCCTACCTGGAGGGCGAGTGCTGGAGTGGCTCCGACACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGGGACTCCC
CCAAGACACATGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCGGAGATCAC
ACTGACCTGGCGCGGGATGGGGAGGACAACTCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCTGCAGGAGATGGAACCTTCCAGAAG
TGGGCGGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAAAGGAGCAGAGATACACCTGTCATGTGCAGCATGAGGGTCTGCCCAGCCCTCACCTGA
GATGGGAGCCGTCTCCAGTCAACCATCCCCATCGTGGGCATCATTGCTGGCCTGGTTCTCCTTGGAACTGTGGTCACTGGAGCTGT
GGTCTGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGATAGAAAAGGAGGAAGCTACTCTCAGGCTGCAAGCAGTGACAGTGCCAGGGA
TCTGATGTGTCTTTACGGCTTGTAAGTGGA

MAPRLLLLLVLSGALALTQTWAGSHSLRYFYTSMRPRGRGQPRFISVGYVDDTQFVRFDSDAESPREEPRAPWMEQ
EGPEYWDQNTIRICKADTQTLRENLRLLRYNQSEAGSHTIQTMYGCDLGPDRLLRQYDQSAIDGRDYIALNED
LRSWTAADMAAQNTQRKWEAAGVAEQWRAYLEGECELEWLRRLHLENGKETLQRADSPKTHVTHHPVSDHEATLRCW
ALGFYPAEITLWRRDGEDQTQDTELVE TRPAGDGTQKWA AVVVP SGKEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEPSQ
STIPVIGIIAGLVLLGAVVTGAVVAAMWRRKSSDRKGGSYSQAASSDSAQGSVSLTACKV

Mamu-A*08

ATGGCGCCCCGAACCTCCTCCTGGTGCTCTCCGGGGCCCTGGCCCTGACCCAGACCTGGGCGGGCTCGCACTCCTTGAGGTATTTCT
ACACCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGCAGCCCCGCTTTCATCTCCGTGGGTACGTGGACGACACGCAGTTTCGTGCGGTTTCGACAG
CGACGCCGAGAGTCCGAGAGAGGAGCCGCGGGCCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGACCGGAACAACCGGATCTAC
AAGGCCGCGACACAGAACTACCGAGAGGGCCTGCAGAACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCCACACCTACCAGA
CGATGTACGGCTGCGACCTGGGGCCAGACGGGGCCCTCCTCCGCGGGTATGACCAGTCCGCTACGACGGCAGGGATTACATCGCCCT
GAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACGGCAGCGGACATGGCTGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGCGGGTGGAGCGGAGCGG
TTCAGAACCTACCTGGAGGGCGAGTGCCTGGAGTGGCTCAGCAGATATCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGGGACCCCC
CCAAGACACACGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCGGAGATCAC
ACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACAACTCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCTGCAGGAGATGGAACCTTCCAGAAG
TGGGCGGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAAAGGAGCAGAGATACACCTGTCATGTGCAGCATGAGGGTCTGCCCAGCCCTCACCTGA
GATGGAGCCGTCTCCAGTCCACCATCCCCATGGTGGGCATCATTGCTGGCCTGGTTCTCCTTGGAACTGTGGTCACTGGAGCTGT
GGTCTGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGATAGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCAAGCAGTGACAGTGCCAGGCG
TCTGATGTGTCTTTACGGCTTGTAAGTGGA

MRVMAPRLLLLLVLSGALALTQTWAGSHSLRYFYTAVSRPGRGQPRFISVGYVDDTQFVRFDSDAESPREEPRAPW
VEQEGPEYWDRNTRIYKAATQNYREGLQNLRGYYNQSEAGSHTYQTMYGCDLGPDRLLRQYDQSAIDGRDYIAL
NEDLRSWTAADMAAQNTQRKWEAAGEAERFRTYLEGECEVWLSRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATL
RCWALGFYPAEITLWQRDGEDQTQDTELVE TRPAGDGTQKWA AVVVP SGKEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEPSQ
SSQSTIPMVGIIAGLVLLGAVVTGAVVAAMWRRKSSDRKGGSYSQAASSDSAQGSVSLTACKV

Mamu-A*11

ATGGCGCCCCGACCTCCTCCTGGTGCTCTCCGGGGCCCTGGCCCTGACCCAGACCTGGGCGGGCTCCCACTCCATGAGGTATTTCC
ACACCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTTCACCGTGGGTACGTGGACGACACGCAGTTTCGTGCGGTTTCGACAG
CGACGCCGAGAGTCCGAGAAAGGAGCCGCGGGCCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGACCGGGAGACACCGGATCTCC
AAGGCCAACACACAGACTACCGAGAGAACCCTGCGGACCGCGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACACCTTCCAGA
CGATGTACGGCTGCGACCTGGGGCCGACGGGGCCCTCCTCCGCGGGTATGACCAGTACGCTACGACGGCAGGGATTACATCGCCCT
GAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACGGCCGGGACATGGCGGCTCAGAACACCCAGCGGAAGTGGGAGGCGCGGGTGTGGCGGAGCAG
CACAGAACCTACCTGAAGGGCGAGTGCTGGAGTGGCTCCGACATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGGGACCCCC
CCAAGACACATGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCGGAGATCAC
ACTGACCTGGCGGGGGATGGGGAGGACAACTCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCTGCAGGAGATGGAACCTTCCAGAAG
TGGGCGGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAAAGGAGCAGAGATACACCTGTCATGTGCAGCATGAGGGTCTGCCCAGCCCTCACCTGA
GATGGGAGCCGTCTCCAGTCCACCATCCCCATCGTGGGCATCATTGCTGGCCTGGTTCTCCTTGGAGCTGTGGTCACTGGAGCTGT
GGTCTGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGGAAGGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAGCGACAGTGCCAGGCG
TCTGATGTGTCTTTACGGCTTGTAAGTGGA

MRVMAPRLLLLLVLSGALALTQTWAGSHSMRYFHTAVSRPGRGEPFRFFTVGYVDDTQFVRFDSDAASPRKEPRAPW
VEQEGPEYWDRETRISKANTQTYRENLRALRYNQSEAGSHTFQTMYGCDLGPDRLLRQYDQYAYDGRDYIAL
NEDLRSWTAGDMAAQNTQRKWEAAGVAEQHRTYLKGECELEWLRRLRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATL
RCWALGFYPAEITLWRRDGEDQTQDTELVE TRPAGDGTQKWA AVVVP SGKEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEPSQ
SSQSTIPVIGIIAGLVLLGAVVTGAVVAAMWRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGSVSLTACKV

Mamu-A*1303

ATGGCGCCCGAACCCCTCCTCCTGGTGTCTCAGGGGCCCTGGCTCTGACCCAGACCCGGGCGGGCTCGCACTCCATGAGGTATTTCT
ACACCACCGTGTCCCGGCCCGCCGCGGGGAGCCCGCTTCATCGCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAG
CGACGCCGCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGTTCCGGAGTATTGGGACCCGGGAGACACAGAATG
AAGACCGAGACACAGAATGCCCCAGTGGCCCTGCGGAACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGTCGGGTCTCACACCTTCAGA
GGATGGTTGGCTGCGACCTGGGACCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGATGAACAGTACGCTACGACGGCAGGGATTACATCGCCCT
GAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCCGCGCGGACATGGCGGCTCAGAACACCCAGCGGAAGTGGGAGGCGCGGATGTGGCGGAGAGG
ATGAGAGCCTACCTGGAGGGCGAGTGCCTGGAGTGGCTCCTAGATACTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGCGGACCC
CCAAGACACATGTGACCCACCACCCCTCTCTGACCATGAGGCCACCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCGGAGATCAC
ACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGAACAACTCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCTGCAGGAGATGGAACCTTCAGAAG
TGGGCGGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAGGAGCAGAGATACACCTGTCATGTGCAGCATGAGGGTCTGCCAAGCCACACCTGA
AATGGGAGCCGTTTCCCAGTCCACCATCCCATGGTGGGCATCATTGCTGGCCTGGTTCTCTTGGAGCTGTGGTCACTGGAGCTGT
GGTTGCTGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGATAGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCAAGCAGTGCAGTGCCAGGGC
TCTGATGTGTCTTTACGGCTTGTAAGTGA

MRVMAPRTLLLVLSGALALTQTRAGSHSMRYFYTTVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPW
VEQEGPEYWDRETQNMKTETQNAVALRNLRYNQSSEVGSHTFQRMVGC DLGPDGRLLRGRYEQYAYDGRDYIAL
NEDLRSWTAADMAAQNTQRKWEAADVAERMRAYLEGECEVWLPYRLENGKETLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATL
RCWALGFYPAEITLTLWQRDGEDQTQDTELVE TRPAGDGTGFKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPKPHTLKWEP
FSQSTIPMVGIIAGLVLLGAVVTGAVVA VMWRRKSSDRKGGSSYQAASSDSAQGSVSLTACKV

Mamu-A*1403

ATGGCGCCCGAACCCCTCCTCCTGGTGTCTCAGGGGCCCTGACCCAGACCTGGGCCGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTACACCT
CCATGTCCCGGCCCGCCGCGGGGAGCCCGCTTCATCGCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGAGTTCGACAGCGACGC
CGCGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCATGGTGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGACCCGGGAGACACGGAACATGAAGACC
GCGACACAGAATGCCCCAGTGGCCCTGCGGAACCTGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACACCTCCAGACGATGT
ACGGCTGCGACCTGGGGCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGATGACCCAGTCCGCTACGACGGCAGGGATTACATCGCCCTGAACGA
GGACCTGCGCTCCTGGACCCGCGGACATGGCGGCTCAGAACACCCAGCGGAAGTGGGAGGCGCGGGTGTGGCGGAGCAGCACAGA
ACCTACCTGGAGGGCAGTGCCTGGAGTGCCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGGGACTCCCCAAGA
CACATGTAACCCACCACCCCTCTCTGACCATGAGGCCACCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCGGAGATCACACTGAC
CTGGCGCGGGATGGGGAGGACAACTCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCTGCAGGAGATGGAACCTTCAGAAGTGGGGC
GCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAAAGGAGCAGAGATACACCTGTCATGTGCAGCATGAGGGTCTGCCGAGCCCTCACCTGAGATGGG
AGCCGTTTCCCAGTCAACGATCCCATCGTGGGCATCATGCTGGCCTGGTTCTCCTTGGAACTGTGCTCACTGGAGCTGTGGTGC
TGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGATAGAAAAGGAGGAAGCTACTCTCAGGCTGCAAGCAGTGCAGTGCCAGGGATCTGAT
GTGTCTCTTACGGCTTGTAAGTGA

MRVMAPRTLLLVLSGALALTQWAGSHSMRYFYTSMSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVQFSDAASQRMEPRAPWVE
QEGPEYWDRETRNMKTATQNAVALRNLRLRYNQSSEAGSHTLQTMVGC DLGPDGRLLRGRYDQSAYDGRDYIALNE
DLRSWTAADMAAQNTQRKWEAAGVAEQHRYTYLEGQCLESLRRYLENGKETLQRADSPKTHVTHHPVSDHEATLRC
WALGFYPAEITLTLWRDGEDQTQDTELVE TRPAGDGTGFKWA AVVVP SGKEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEPS
QSTIPIVGIIAGLVLLGTVVVTGAVVA VMWRRKSSDRKGGSSYQAASSDSAQGSVSLTACKV

Mamu-B*07

ATGGGGTTCATGGCGCCCGAACCCCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGCCCTGGCCCTGACCCAGACCTGGGCCGGCTCGCACTCCTTGA
GGTATTTTCAGCACCGCCGTATCCCGGCCCGCCGCGGGAACCCCTGGTATTTTCGAAGTCCGGTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCG
GTTTCGACAGCGACCGGAGAGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGCGACA
CGGAGGCCAAGGGCAACGCACAGACTCACCGAGGAACCTGAGGACCCGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGGGGGTCTCACA
CCCTCCAGTGGATGTACGGCTGTGACCTGGGGCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGATGAACAGTTCGCTTACGACGGCAAGGATTA
CATCGCCCTGAACGAGGACCTTCGCTCCTGGACCCGCGGACATGGCGGCTCGGTTACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCGTGCG
GCGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGGCAAGTGCCTGGAGTGGCTCCGAGATACCTGGAGAACCAGAATGATCGCTGCTGCGCG
CGGATCCCCAAGACACACGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTG
GGAGATCACACTGACCTGGCAACGGGATGGGGAGGACAACTCAGGACACCCAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGGAGGAGATGGAACC
TTCCAGAAGTGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCACGAGGGATTGCCGAGCCCC
TCACCTGAGATGGGAGCCATCTCCAGTCCACCATCCCATCGTGGGCATTGTTGCTGGCCTGGCTGTCTTAGCAGTTGTGGTAC
CGGAGCTGTGGTGCCTGTTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGAAAAGGAGGGAGCTACTTTCAGGCTGCGTCCAACGACAGT
GCCAGGGTTCTGATGTGTCTCTACGGCTAA

MRVMAPRTLLLLLLSGALALTQWAGSHSLRYFSTAVSRPGRREPWYFEVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPW
MEQEGPEYWEATRRAKNAQTHRGNLRTALRYNQSSEGGSHTLQWVGC DLGPDGRLLRGRYEQYAYDGRDYIAL
NEDLRSWTAADMAARFTQRKWEAARAAEQLRAYLEGECEVWLPYRLENGKETLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATL
RCWALGFYPAEITLTLWQRDGEDQTQDTELVE TRPAGDGTGFKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEPS
SSQSTIPIVGIVAGLAVLAVVTGAVVA VMWRRKSSGGKGGSSYQAASNDQAQGSVSLTA

Mamu-B*09

ATGGCGCCCGGAACCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGGCTCGCACTCCTTGAGGTATTTCCG
GCACCACAGTGTCCCGGCTGGCCCGGGGAGCCCGCTTTCATCGCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTTCGTGCGGTTTCGACAG
CGACGGGAGAGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCCCGTGGATGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGGAGACCGGATCGCC
AAGGCCCGCGCACAGACTGAGCGAGGAACTCGCGACCGCGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGGGGGGTCTCACACCTCCAGA
AGATGTGTGGCTGCGACCTGGGGCCGACGGGGCCCTCCTCCGCGGTATTACCAGTCCGCTACGACGGCAGGGATTACATCGCCCT
GAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCTGCGGGTGAGGGCGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCGGTGAGGCAGAGCAG
CGGAGAGCCTACCTGGAGGGCCGGTGGTGGAGTGGCTCCGAGATACTGGAGAAGGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGGGATCCCC
CAAAGACACACGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCGGAGATCAC
ACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGAGCAAACCTCAGGACACCGAGCTCGTGGAGACCAGGCCAGGAGGAGATGGAACCTTCCAGAAG
TGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCGGAGCCCTCACCTGA
GATGGGAGCCATCTCCAGTCCACCATCCCCATCATGGGCATTGTTGCTGGCCTGGCTGTCTAGCAGTTGTGGTACCAGGAGCTGT
GGTCCGAGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAGCAACAGTGCCAGGGC
TCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MAPGTL L L L L L S G A L A L T E T W A G S H S L R Y F G T T V S R P G R G E P R F I A V G Y V D D T Q F V R F D S D A E S P R M E P R A P W M E Q
E G P E Y W E E T R I A K A R A Q T E R G N L R T A L R Y N Q S E G G S H T L Q K M C G C D L G P D G R L L R G Y Y Q S A Y D G R D Y I A L N E D
L R S W T A A G E A A Q N T Q R K W E A A G E A E Q R R A Y L E G R C V E W L R R Y L E K G K E T L Q R A D P P K T H V T H H P V S D H E A T L R C W
A L G F Y P A E I T L T W Q R D G E E Q T D T E L V E T R P G G D G T F Q K W G A V V P S G E E Q R Y T C H V Q H E G L P E P L T L R W E P S S Q
S T I P I M G I V A G L A V L A V V V T G A V V A A V M W R R K S S G G K G G S Y S Q A A S S N S A Q G S D V S L T A

Mamu-B*12

ATGCGGGTCATGGCGCCCGGAACCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGACCTGTCCCTGACCGAGACCTGGGCCGGCTCGCACTCCATGA
GGTATTTTCAGCACCGCAGTGTCCCGGCCCGGCCCGGGAAACCTGGTATCTCGAAGTCGGCTACGTGGACGACACGCAGTTTCGTGCG
GTTTCGACAGCGACGCCGAGAGTCCGAGGATGGAGCCGAGGGCCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGCAGACA
CGGAACGCCAAGGCCAACGCACAGACTGACCGAGTGAGCCTGGGGAACCTGCGCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGTGGGGTCTCACA
CTGTCCAGATAATGTACGGCTGCGACCTGGGACCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGGTATCACCAGTTCGCTACGACGGCAAGGATTA
CATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCCGCGGACATGGCGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGGGGGACCGTTAT
GCGGAGCGGTTTCAGAGCCTATCTGGAGGGCCGGTGCCTGGAGTGGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCG
CGGATCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACCCCGTCTCTAACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGT
GGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACAACTCAGGACACCGAGCTCGTGGAGACCAGGCCAGGAGGAGATGGAACC
TTCCAGAAGTGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCAGAGCCCC
TCACCCTGAGATGGGAGCCATCTCCAGTCCACCATCCCCATCGTGGGCATCGTTGCTGGCCTGGCTGGCCTAGCAGATGTGGTAC
CGAGCTGTGGTGCCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAACGACAGT
GCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MAPGTL L L L L L S G A L A L T E T W A G S H S L R Y F G T T V S R P G R G E P R F I A V G Y V D D T Q F V R F D S D A E S P R M E P R A P W M E Q
E G P E Y W E E T R I A K A R A Q T E R G N L R T A L R Y N Q S E G G S H T L Q K M C G C D L G P D G R L L R G Y Y Q S A Y D G R D Y I A L N E D
L R S W T A A G E A A Q N T Q R K W E A A G E A E Q R R A Y L E G R C V E W L R R Y L E K G K E T L Q R A D P P K T H V T H H P V S D H E A T L R C W
A L G F Y P A E I T L T W Q R D G E E Q T D T E L V E T R P G G D G T F Q K W G A V V P S G E E Q R Y T C H V Q H E G L P E P L T L R W E P S S Q
S T I P I M G I V A G L A V L A V V V T G A V V A A V M W R R K S S G G K G G S Y S Q A A S S N S A Q G S D V S L T A

Mamu-B*17

ATGCGGGTCATGGCGCCCGGAACCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGGCTCGCACTCCATGA
AGTATTTCTACACTCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCGCTTTCATCTCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTTCGTGCG
GTTTCGACAGCGACGCCGAGAGTCCGAGAGGAGTCCGCGGGCCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGGGCAGACA
CGGAGAGCCAAGGAGGCCGACAGACTCACCGAGAGAACCTGGGACCGCGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACA
CCATCCAGAAGATGTATGGCTGCGACCTGGGGCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGGTATCACCAGTCCGCTACGACGGCAAGGATTA
CATCGCCCTGAACGGTACCTGCGCTCCTGGACCGCCGCGGACATGGCGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGGGGAACCGTTAT
GCGGAGCGGTTTCAGAGCCTACCTGGAGGGCAGTGCCTGGAGTGGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCG
CGGATCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGC
GGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGAGCAAACCTCAGGACACAGAGTTTGTGGAGACCAGGCCAGGAGGGGATGGGACC
TTCCAGAAGTGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCGGAGCCCC
TCACCCTAAGATGGGAGCCATCTCCAGTCCACCATCCCCATCGTGGGCATTGTTGCTGGCCTGGCTGTCTAGCAGTTGTGTTTAC
CGGAGCTGTGGTGCCTGTGATGTGGAGGAGAAAAGCTCAGGTGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCATCCAGCGACAGT
GCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

M R V M A P G T L L L L L S G A L A L T E T W A G S H S M K Y F Y T S V S R P G R G E P R F I S V G Y V D D T Q F V R F D S D A E S P R E E S R A P W
V E Q E G P E Y W E E A T R R A K E A A Q T H R E N L R T A L R Y N Q S E A G S H T I Q K M Y G C D L G P D G R L L R G Y H Q S A Y D G K D Y I A L
N G D L R S W T A A D M A A Q N T Q R K W E G N R Y A E R F R A Y L E G E C L E W L R R Y L E N G K E T L Q R A D P P K T H V T H H P V S D H E A T L
R C W A L G F Y P A E I T L T W Q R D G E E Q T D T E F V E T R P G G D G T F Q K W G A V V P S G E E Q R Y T C H V Q H E G L P E P L T L R W E P
S S Q S T I P I V G I V A G L A V L A V V F T G A V V A A V M W R R K S S G G K G G S Y S Q A A S S D S A Q G S D V S L T A

Mamu-B*21

ATGCCGCCCGAACCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGGCTCGCACTCCTTGAGGTATTTCC
 ACACCGCCGTGTCCCGGCCCGCCCGGGGAGCCCGCTTTCATCTCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTTCGTGCGGTTTCGACAG
 CGACGCCAGAGTCCGAGGATGGAGCCCGGGCCCGTGGATGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGACCGGAACACACGGATCTCC
 AAGGCCACGCACAGACTCATCGAGGAACTGAGGACCTGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGGGGGGTCTCACACCATCCAGA
 CGATGTACGGCTGCGACCTGGGACCCGACCGGGCCTCCTCCGCGGTATAACCAGCAGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCT
 GAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCCCGCGGACATGGCGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGACCGTTATGCGGAGCAG
 TTCAGAGCCGACCTGGAAGGGGCGTGCATGGAGTCCGTCAGATACCTGGAGAACGGGGAGGAGACGCTGCAGCGGAGGATCCCC
 CAAAGACACACGTGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGCGGAGATCAC
 ACTGACCTGGCAGCGGAATGGGGAGGAGCAAACCTCAGGACACTGAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGGAGGAGATGGAACCTTCCAGAAG
 TGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCACCAGGGACTACCGGAGCCCTCACCTGA
 GATGGGAGCCATCTCCAGTCCACCATCCCCATGTGCGGATTGTTGCTGGCCTGGCTGTCTAGGAGCTGTGTTTCATCGGAGCTGT
 GGTGCTGCTATGATGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCAGCGTCCAACGACAGTGCCAGGGCTCT
 GATGTGCTCTCACGGCTAA

MPPRTL LLLLLSGALAL TETWAGSHSLRYFHTAVSRPGRGEPRFISVGYVDDTQFVRFDSDAQSPRMEPRAPWMEQ
 EGPEYWRNTRI SKAHAQTHRGNLRL LRYNQSEGGSHTIQTMYGCDLGPDRLLRGNQHAYDGKDYIALNED
 LRSWTAADMAA QNTQRKWEADRYAEQFRADLEGACMESLRRYLENGEETLQREDPPKTHVTHHPISDHEATLRCW
 ALGFYPAEITL TWQRNGEEQTQDTELVE TRPGDGT FQKWGAVVVP SGEEQRYTCHVQHQLPEPLTLRWEPSQ
 STIPIVGI VAGLAVL GAVF IGAVVAAMMRKSSGGKGGSYSQAASNSDAQGSDVSLTA

Mamu-B*22

ATGCAGATCATGGCCCGGACCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGGCTCGCACTCCTTGA
 GGTATTTACCACCGCCGTATCCCGCCCGCCCGGGAACTTGGTATCTCGAAGTCCGGCTACGTGGACGACACGCAGTTTCGTGTG
 GTTCGACAGCGACCCGAGAGTCCGAGGATGGAGCCCGGGCCCGTGGATGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGACCGGAACACA
 CGGAGAGCCAAGGCCAACGCACAGACTGACCGAGGAACTGAGGACAGCGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGGGGGGTCTCACA
 CCATCCAGTGGATGTACGGCTGTGACCTGGGGCCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGTATCACCAGTTCGCCTACGACGGCAAGGATTA
 CATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACC CGCGGACATGGCGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCGGAG
 GCAGAGCAGCAGAGAGCCTACCTGGAGGGCAGTGCCTGGAGTTGCTCCGACAGACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGG
 CGGATCCCCAAAGACACAGCTGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGTCCACCCTGAGGTGCTGGGCTCTGGGCTTCTACCCTGC
 GGAGATCAGCGTACCTGGCAGCGGGATGGGGTGGATCAAACCTCAGGACACCGAAGTGTGGAGACCAGGCCAGGAGGAGATGGAACC
 TTCCAAAAGTGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCTATGTACAGCAGAGGGATTGCCGGAGCCCC
 TCACCTTGAGATGGGAGCCGTCTCCAGTCCACCATCCCCATCGGATCGGATCGTGTGCTGGCCTGGCTGCTTAGCAGTTGTACCCG
 AGCTGTGGTGCCTGTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGAAAAGGAGGGAGCTACTTTCAGGCTGCGTCCAAGGACAGTCCC
 CAGGGCTCTGATGTGCTCTCACGGCTAA

MQIMAPRTL LLLLLSGALAL TETWAGSHSLRYFHTAVSRPGRREPWYLEVGYVDDTQFVWFDSDAESPRMEPRAPW
 MEQEGPEYWRNTRRAKANAQTD RGNLRTALRYNQSEGGSHTIQWMYGCDLGPDRLLRGNQHAYDGKDYIALNED
 NEDLRSWTAADMAA QNTQRKWEAAREAEQQRAYLEGECELELRRHLENGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHESTL
 RCWALGFYPAEITL TWQRDGDVDTQDTELVE TRPGDGT FQKWGAVVVP SGEEQRYTYVQHEGLPEPLTLRWEPSQ
 SSQSTIPIVGI VAGLAVLAVVTGAVVAAMWRRKSSGGKGGSYFQAASKDSPQGSVDVSLTA

Mamu-B*26

ATGCGGGTCATGGCCCGGACCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGGCTCGCACTCCTTGA
 GGTATTTACGCGCCGACGTCCTCCCGCCCGCCCGGGGAGCCCGCTTTCATCTCCGTGTGCTACGTGGACGACACGCAGTTTCGTGCG
 GTTCGATAGCGACCCGAGAGTCCGAGGATGGAGCCCGGGCCCGTGGTGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGAGGAGCAGACA
 GGGCTCGCCAAGGAGGCCGACAGACTTCCGAGTGGGCTGGGGAACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGGGGGGTCTCACA
 CCTCCAGTGGATGTACGGCTGCGACCTGGGGCCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGTATCACCAGTTCGCCTACGACGGCAAGGATTA
 CATCGCCCTGAACGGGACCTGCGCTCCTGGACC CGCGGACAGACCGGCGCTCAGATAACCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCGGAG
 GCAGAGCAGTGGAGAGCCACCTGGAGGGGACGTGCGTGGAGTGGCTCCGACAGACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTGCAGCGG
 CGGATCCCCAAAGACACACATGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGC
 GGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCAAACCTCAGGACACCGAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGCAGGAGATGGAACC
 TACCAGAAGTGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCGGAACCCC
 TCACCCTGAGATGGGAGCCATCTCCAGTCCACCATCCCCATCGTGGGCATCGTGTGGTGTGGCTGTCTTAGCAGTTGTGGTCAC
 TGGAGCTGTGGTGGCTGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGTCCCTCACAGGACATTTCTTGTACAGGTGAAAAGGAGGGA
 GCTACTCTCAGGCTGTGTCAGCGACAGTGCCAGGGCTCTGATGTGCTCTCACGGCTAA

MVRMAPRTL LLLLLSGALAL TETWAGSHSLRYFSAGTSRPGRGEPRFISVCYVDDTQFLRFDSDAESPRMEPRARW
 LEQEGPEYWEEQTGLAKEAAQTFRVGLGNLRGYNQSEAGSHTLQWMYGCDLGPDRLLRGNQHAYDGKDYIALNED
 NGDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQWRAHLEGTCEWELRRHLENGKEMLQRADPPKTHMTHHPISDHEATL
 RCWALGFYPAEITL TWQRDGEDQTQDTELVE TRPAGDGT YQKWGAVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEPSQ
 SSQSTIPIVGI VGLAVLAVVTGAVVAAMWRRKSSVPSQDIFLLQVEKEGATLRLCPATVPRALMCLSR

Mamu-B*28-L

ATGAGGTATTTTCGGCACCCCGTGTCCCGGCCCGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCTACGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCA
TGCGGTTTCGACAGCGACGCCGAGAGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGACGT
GACACGGAGAGCCAAAGGCCGCGCACAGACTGACCGAGTGGACCTGGGGACCCCTGCGCGGCTACTACAACCCAGAGCGAGGGGGGTCT
CACACCATCCAGATATTGTACGGTTGCGACCTGGGACCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGTACCGGCAGGACGCCTACGACGGCAAGG
ATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCCGCGGGACATGGCGGCTCAGAACACCCAGCGGAAGTGGGAAGCGGCCGG
TGTGGCAGAGCAGATGAGAGCCTACCTGGAGGGCGAGTGCCTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGTGACACTGCAG
CGCGGGATCCCCCAAAGACACATGTGACCCACCACCCCTCTCTGACCATGAGGCCACCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACC
CTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGAGGAGCAAACTCAGGACACTGAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGGAGGAGATGG
AACCTTCCAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCGGAG
CCCCTACCCTGAGATGGGAGCCATCTTCCAGTCCACCATCCCCATCGTGAGCATTGTTGCTGGCCTGGCTGTCTAGCAGTCGTGG
TCACTGGAGCTGTGGTGCCTGTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCATCCAGCGA
CAGTGCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MRYFGTTVSRPGRGEPRIYVGYVDDTQFMRFSDAESPRMEPRAPWVEQEGPEYWEDVTRRAKARAQTDRVDL
TLRYYNQSEGGSHTIQIILYGC DLGPDGRLLRGRYRQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQTQRKWEAAGVAE
QMRAYLEGECEVWLRRLRYLENGKVTLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLWQRDGEETQDTE
LVETRPGDGTGFKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEPSQSSTIPIVSIIVAGLAVLAVVVTGAVVA
AVMWRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGS DVS LTA

Mamu-B*28+L

ATGCGGGCCATGGCGCCCCGAACCCCTCCTCCTGTCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCGGGCTCGCACTCCATGA
GGTATTTTCGGCACCCCGTGTCCCGGCCCGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCTACGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTTCATGCG
GTTTCGACAGCGACGCCGAGAGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGACGTGACA
CGGAGAGCCAAGGCCCGCGCACAGACTGACCGAGTGGACCTGGGGACCCCTGCGCGGCTACTACAACCCAGAGCGAGGGGGGTCTCACA
CCATCCAGATATTGTACGGTTGCGACCTGGGACCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGTACCGGCAGGACGCCTACGACGGCAAGGATTA
CATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCCGCGGGACATGGCGGCTCAGAACACCCAGCGGAAGTGGGAAGCGGCCGGTGTG
GCAGAGCAGATGAGAGCCTACCTGGAGGGCGAGTGCCTGGAGTGGCTCCGCGGATACTGGAGAACGGGAAGGAGACTGCAGCGCG
CGGATCCCCCAAAGACACTTGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGC
GGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGAGCAAACTCAGGACACTGAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGGAGGAGATGGAACC
TTCCAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCGGAGCCCC
TCACCCTGAGATGGGAGCCATTTCCAGTCCACCATCCCCATCGTGAGCATTGTTGCTGGCCTGGCTGTCTAGCAGTTGTGGTCC
TGGAGCTGTGGTGCCTGTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCATCCAGCGACAGT
GCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MRAMAPRTL LLLLLSGALAL TETWAGSHSMRYFGTTVSRPGRGEPRIYVGYVDDTRFMRFSDAESPRMEPRAPW
VEQEGPEYWEDVTRRAKARAQTDRVDLGT LRGYYNQSEGGSHTIQIILYGC DLGPDGRLLRGRYRQDAYDGKDYIAL
NEDLRSWTAADMAAQTQRKWEAAGVAEQMRAYLEGECEVWLRRLRYLENGKETLQRADPPKTLVTHHPVSDHEATL
RCWALGFYPAEITLWQRDGEETQDTELVETRPGDGTGFKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWE
FSQSSTIPIVSIIVAGLAVLAVVVTGAVVAAVMWRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGS DVS LTA

Mamu-B*29012

ATGCGGGTCATGGCGCCCCGAACCCCTCCTCCTGTCTCTCGGGGACCCCTGTCCCTGACCGAGACCTGGGCGGGCTCGCACTCCTTGA
GGTATTTTCAGCACCCCGTGTCCCGGCCCGCCGCGGGAACCCCTGGTATGTGGAAGTCCGGCTACGTGGACGACACGCAGTTTCGTGCG
GTTTCGACAGCGACGCCGAGAGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCCCGTGGATAGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAAACA
CGGAGAGCCAAGGCCAACGCACGACTGACCGAGTGGACCTGGGGACCCCTGCGCGGCTACTACAACCCAGAGCGAGGGCGGGTCTCACA
CCATCCAGTGGATGTACGGCTGCGACCTGGGGCCCGAGGGGCGCCTCCTCCGCGGTATCACCAGTCCGCCTACGACGGCAAGGATTA
CATCGCCGTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCCCGCGGACATAGCGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGGGGACCGTTAT
GCGGAGCGGTTACAGAGCCTACCTGGAGGGGACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCG
CGGATCCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGC
GGAGATCACCGTACGCTGGCAGCGGGATGGGGAGGATCAAACTCAGGACATAGAGTTTGTGGAGACCAGGCCAGGAGGAGATGGAACC
TTCCAGAAGTGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCGGAGCCCC
TCACCCTGAGATGGGAGCCATTTCCAGTCCACCATCCCCATCGTGGGCATTGTTGTTGGCTGGCTGTCTAGCAGTTGTGGTCC
CGGAGCTGTGGTGCCTGTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGTGTCCAATGACAGT
GCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MVMAPRTL LLLLLSGT LSLTETWAGSHSLRYFSTAVSRPGRREPWYVEVGYVDDTQFVRFSDAESPRMEPRAPW
IEQEGPEYWEEETRRAKANARTDRVDLGT LRGYYNQSEGGSHTIQWYMGCDLGPGRLLRGRYHQSAYDYGKDYIAV
NEDLRSWTAADIAAQTQRKWEEDRYAERFRAYLEGTCEVWLRRLRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATL
RCWALGFYPAEITLWQRDGEDQTQDIEFVETRPGDGTGFKWAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWE
SSQSSTIPIVGIIVGLAVLAVVVTGAVVAAVMWRKSSGGKGGSYSQAVSNDSAQGS DVS LTA

Mamu-B*30

ATGCGGGTCATGGCGCCCCGAACCCCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGGCTCGCACTCCTTGA
 GGTATTTTCAGCACACCCTGTCTGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCGCTTCATCTCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCG
 GTTCGACAGCGACGCTGAGAGTCCGAGAGAGGAGCCGCGGGCCCGTGGGCGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGCAGACA
 CGGAACACGGAGGCCACGCACAGAATCACCGAGTGTGCCTGCGGACCGTGCCTGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACA
 CCCTCCAGAGGATGTTTGGCTGCGACCTGGGGCCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGTATAACCAGTATGCCTACGACGGCAAGGATTA
 CATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCTCGGGCGACGTGGCGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGACCCGTTAT
 GCGGAGCGGTTACAGAGCCTACCTGGAGGAGACGTGCGTGGAGTGCCTCCGACAGACCTGGAGAAAGGAAGGAGACGCTGCAGCGCG
 CGGACCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGC
 GGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACAAACTCAGGACACAGAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGCAGGAGATGGAACC
 TTCCAGAAGTGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCACAGGGATTGCCAGAGCCCC
 TCACCCTCAGATGGGAGCCATCTTCCAGTCCACCATCCCATCGTGGGCATTGTGCTGGCTGGCTGCTGCTAGCACTTGTGGTAC
 CGGAGCTGTGGTGCCTGCTGTGATGTGCAGGAGGAAGAGCTCAGGTGCAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAGCGACAGT
 GCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MRVMAPRTL LLLLLSGALAL TETWAGSHSLRYFSTTVSWPGRGEPRFISVGYVDDTQFVRFSDAESPREEPRAPW
 AEQEGPEYWEEQTRNTEAHAQNHRVCLRTVPGYYNQSEAGSHTLQRMFGCDLGPDRLLRGINQYAYDGDYIAL
 NEDLRSWTSADVAAQNTQRKWEATRYAERFRAYLEETCVESLRRHLEKGETLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATL
 RCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVE TRPAGDGTGFKWGA VVVP SGEEQRYTCHVQHKGLPEPLTLRWEPS
 SSQSTIPIVGIVAGLAVVALVVTGAVVA VMCRKSSGAKGGSYSQAASSDSAQGSVSLTA

Mamu-B*3003

ATGCGGGTCATGGCGCCCCGAACCCCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGGCTCGCACTCCTTGA
 GGTATTTTCAGCACACCCTGTCTGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCGCTTCATCTCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCG
 GTTCGACAGCGACGCTGAGAGTCCGAGAGAGGAGCCGCGGGCCCGTGGGCGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGCAGACA
 CGGAACACGGAGGCCACGCACAGAATCACCGAGTGTGCCTGCGGACCGTGCCTGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACA
 CCCTCCAGAGGATGTTTGGCTGCGACCTGGGGCCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGTATAACCAGTATGCCTACGACGGCAAGGATTA
 CATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCTCGGGCGGACGTGGCGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGACCCGTTAT
 GCGGAGCGGTTACAGAGCCTACCTGGAGGAGACGTGCGTGGAGTGCCTCCGACAGACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCG
 CGGATCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGC
 GGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACAAACTCAGGACACCGAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGCAGGAGATGGAACC
 TTCCAGAAGTGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCACAGGGATTGCCAGAGCCCC
 TCACCCTCAGATGGGAGCCATCTTCCAGTCCACCATCCCATCGTGGGCATTGTGCTGGCTGGCTGCTGCTAGCACTTGTGGTAC
 CGGAGCTGTGGTGCCTGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGCAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAGCGACAGT
 GCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MRVMAPRTL LLLLLSGALAL TETWAGSHSLRYFSTTVSWPGRGEPRFISVGYVDDTQFVRFSDAESPREEPRAPW
 AEQEGPEYWEEQTRNTEAHAQNHRVCLRTVPGYYNQSEAGSHTLQRMFGCDLGPDRLLRGINQYAYDGDYIAL
 NEDLRSWTSADVAAQNTQRKWEATRYAERFRAYLEETCVESLRRHLENGKETLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATL
 RCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVE TRPAGDGTGFKWGA VVVP SGEEQRYTCHVQHKGLPEPLTLRWEPS
 SSQSTIPIVGIVAGLAVVA VVVVTGAVVA VMWRKSSGAKGGSYSQAASSDSAQGSVSLTA

Mamu-B*45

ATGCGGGTCATGGCGCCCCGACCCCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACAGAGACCTGGGCCGGCTCCCACTCCTTGA
 GGTATTTCCACACCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCCTGGGAGCCCGCTTCATCTCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCG
 GTATGACAGCGACGCGGAGAGTCCGAGAGAGGAGCCGCGGGCCCGTGGATGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGCAGACA
 CGGATCGACAAGGCCAACGCACAGACTCACCGAGGGAACCTGCGGACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGGGGGGTCTCACA
 CCATCCAGAAGATGTACGGCTGCGACCTGGGACCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGTATGACCAGTACGCCTACGACGGCAAGGATTA
 CATCGTCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACGGCCGCGGACATGGCGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCGTGCG
 GCGGAGCGGCAGAGAGCCTACCTGGAGGGCGAGTGCCTGGAGTGGCTCCGACAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTACAGCGCG
 CGGATCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGC
 GGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGAGAAACTCAGGACACCGAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGGAGGAGATGGAACC
 TTCCAGAAGTGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATGACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCGGAGCCCCG
 TCACCCTGAGATGGGAGCCATCTTCCAGTCCACCATCCCATCGTGGGCATTGTGCTGGCTGGCTGCTGCTAGCACTTGTGGTAC
 CGGAGCTGTGGTGCCTGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGCAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAGCGACAGT
 GCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MRVMAPRTL LLLLLSGALAL TETWAGSHSLRYFHTAVSRPGRWEPRFISVGYVDDTQFVRYSDAESPREEPRAPW
 MEQEGPEYWEEQTRIDKANAQTHRGNLRTLRYGYYNQSEGGSHTIQKMYGCDLGPDRLLRGINQYAYDGDYIVL
 NEDLRSWTAADMAAQNTQRKWEAARAERQRAYLEGECELEWLRRYLENGKEMLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATL
 RCWALGFYPAEITLTWQRDGEETQDTELVE TRPGDGTGFKWA VVVP SGEEQRCTCHVQHEGLPEPVTTLRWEPS
 SSQSTIPIVGIVAGLAVLAVVVVTGAVVA VMWRKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVSLTA

Mamu-B*46

ATGCGGGTCATGGCGCCCCGAACCCCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGCGCCCTGGCCCTGACCCAGACCTGGGCCGGCTCGCACTCCTTGA
GGTATTTTCAGCGCCGGCACGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCTCCGTGTGCTACGTGGACGACACGCAGTTCTGTGC
GTTTCGATAGCGACGCCGAGAGTCCGAGGATGGAGCCCGGGCGCGGTGGCTGGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAGGAGCAGACA
GGGCTCGCCAAGGAGGCCGACAGACTTTCGAGTGGGCTGGGGAACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGGCGGGTCTCACA
CCCTCCAGTGGATGTACGGCTGCGACCTGGGGCCCGACGGCGCCTCCTCCGCGGTATCACCAGTTCGCTACGACGGCAAGGATTA
CATCGCCCTGAACGGGGACCTGCGCTCCTGGACCGCGGCAGACACGGCGGCTCAGATAACCCAGCGCAAGTGGGAGCGGCCCGCGAG
GCAGAGCAGTGGAGAGCCACCTGGAGGGGACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGACACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTGCAGCGCG
CGGATCCCCCAAAGACACACATGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGC
GGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACAAACTCAGGACACCGAGCTTGTGGAGACCGGGCCAGCAGGAGATGGAACC
TACCAGAAGTGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCGGAACCC
TCACCCTGAGATGGGAGCCATCTTCCAGTCCACCATCCCATCGTGGGCATCGTTGTTGGCTGGCTGTCTAGCAGTTGTGGTAC
TGGAGCTGTGGTGGCTGCTGTGATGTGGAGGAGGATGAGCTCAGTCCCTCACAGGACATTTTCTTGTACAGGTGAAAAGGAGGGA
GCTACTCTCAGGCTGTGTCCAGCGACAGTGGCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAAGGTACC

MRVMAPRTL LLLLLL SAALAL TQTWAGSHSLRYFSAGTSRPRGEPRFISVCYVDDTQFLRFDSDAESPRMEPRARW
LEQEGPEYWEETQLAKEAAQTFRVGLGNLRGYNQSEAGSHTLQWMYGCDLGPDRLLRGRYHQFAYDGDYIAL
NGDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQWRAHLEGTCEWLRRLHLENGKEMLRADPPKTHMTHHPISDHEATL
RCWALGFYPAEITLWQRDGEDQTQDTELVEITRPGDGTQKQWAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWE
SSQSTIPIVGIVVGLAVLAVVVTGAVVAAMWRRMSSVPSQDIFLLQVEKEGATLRLCPATVPRALMCLSRRLRY

Mamu-B*48

ATGCGGGTCATGGCGCCCCGAACCCCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCCAGACCTGGGCCGGCTCCCACTCCATGA
GGTATTTTCAGCACCTCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCTGTGC
GTTTCGACAGCGACGCCGAGAGTCCGAGGATGGAGCCCGGGCGCGGTGGATAGAGCAGGAGGGGCCGAGTATTGGGAAGAGGAGACA
CGGATCGCCAAGGACGCCGACAGACTTTCGAGTGGGCTGGGGATCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGGCGGGTCTCACA
CCTACCAGTGGATGTATGGCTGCAACGTGGGACCAGACGGGCACCTCCTCCGCGGTATCACCAGTTCGCTACGACGGCAAGGATTA
CATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCGGGGACATGGCGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGCGGTCCGTGAG
GCAGAGCGGTTACAGAGCTACGTGGAGGGCCGGTGGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCG
CGGATCCTCAAAGACATACGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGC
GGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACAAACTCAGGACACCGAGCTTGTGGAGACCGGCCAGGAGGAGATGGAACC
TTCCAGAAGTGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCGAGCCCC
TCACCCTGAGATGGGAGCCATCTTCCAGTCCACCATCCCATCGTGGGCATCGTTGTTGGCTGGCTGTCTAGCAGTTGTGTTCAC
TGGAGCTGTGGTGGCTGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAGCGACAGT
GCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MRVMAPRTL LLLLLL SGALAL TETWAGSHSMRYFSTSVSRPRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFSDAESPRMEPRARW
IEQEGPEYWEETRIAKDAAQTFRVGLGILRGYNYQSEAGSHTYQWMYGCNVGPDGHLLRGRYHQFAYDGDYIAL
NEDLRSWTAGDMAAQNTQRKWEAVGEAERFRAYVEGRCEWLRRLYLENGKETLQADPPKTYVTHHPVSDHEATL
RCWALGFYPAEITLWQRDGEDQTQDTELVEITRPGDGTQKQWAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPQPLTLRWE
SSQSTIPIVGIVVGLAVLAVVFTGAVVAAMWRRKSSGGKGGSSYQAASSDSAQGSDVSLTA

Mamu-B*6002

ATGCGGGTCATGGCGCCCCGAACCCCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGCGCCCTGGCCCTGACCCAGACCCGGGCCGGCTCGCACTCCTTGA
GGTATTTTCAGCGCCGGCACGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATGTCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCTGTGC
GTTTCGACAGCGACGCCGAGAGTCCGAGGATGGAGCCCGGGCGCGGTGGGCGGAGCAGGAGGGTCTGGAGTATTGGGAAGAGCAGACA
GGGCTCGCCAAGGACTTACACAATCTTTCGAGTGGGCTGGGGAACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGGCGGGTCTCACA
CCCTCCAGTGGATGTACGGCTGCGACCTGGGGCCCGACGGCGCCTCCTCCGCGGTATCACCAGTTCGCTACGACGGCAAGGATTA
CATCGCCCTGAACGGTACCTGCGCTCCTGGACCGCGGCAGACACGGCGGCTCAGATAACCCAGCGCAAGTGGGAGTGGCCCGCGAG
GCAGAGCAGGTGAGAGCGCACCTGGAGGGGACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGACACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGAGCG
CGGATCCCCCAAAGACACATGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGC
GGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGAGAAACTCAGGACACCGAGCTTGTGGAGACCGGCCAGTGGAGATGGAACC
TTCCAGAAGTGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCAGAGCCCC
TCACCCTGAGATGGGAGCCATCTTCCAGTCCACCATCCCATCGTGGGCATCGTTGTTGGCTGGCTGTCTAGCAGTTGTGTTCAC
TGGAGCTGTGGTGGCTGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAGCGACAGT
GTCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MRVMAPRTL LLLLLL SAALAL TETRAGSHSLRYFSAGTSRPRGEPRFMSVGYVDDTQFLRFDSDAASPRMEPRAPW
AEQEGLEYWEETQLAKDFTQSFVGLGNLRGYNQSEAGSHTLQWMYGCDLGPDRLLRGRYHQFAYDGDYIAL
NGDLRSWTAADTAAQITQRKWEVAREAEQVRAHLEGTCEWLRRLHLENGKETLQADPPKTHVTHHPVSDHEATL
RCWALGFYPAEITLWQRDGEETQDTELVEITRPGDGTQKQWAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWE
SSQSTIPIVGIVAGLAVLAVVVTGAVVAAMWRRKSSGGKGGSSYQAASSDSVQSDVSLTA

Mamu-B*64

ATGCGGGTCATGGCGCCCCGAACCCCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTAGCCCCGACCGAGACCTGGGCCGGCTCGCACTCCTTGA
GGTATTTTCGGCACCCGCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTACCTACGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCG
GTTTCGACAGCGACCCGCGAGTCCGAGGGTGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGCAGACA
CGGATCGCAAGGCCCGCGCACAGACTGACCGAGCGGACCTGGGGACCTGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACA
CCATCCAGTGGATGTTTGGCTGCGACCTGGGGCCCGACGGCGCCTCCTCCGCGGGTATCACCAGTCCGCTACGACGGCAAGGATTA
CATCGCCCTGAACCGGGACCTGAGCTCCTGGACTGCCCGGACTTGGTGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGCGGACCGTTAT
GCGGAGCGGCAGAGAGCCTACCTGGAGGGCGAGTGCCTGGAGTGGCTCCGCAGATACTTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCG
CGGATCCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGC
GGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGATCAAACCTCAGGACACCGAACTTGTGGAGACTAGGCCAGCAGGAGATGGAACC
TTCCAGAAGTGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCTGGAGCCAC
TCACCCTGAAATGGGAGCCATCTTCCAGCCCACCATCCCATCGTGGGCATTGTTGTTGGCTGGCTGCTTAGCAGTTGTAGTTAC
CGGAGCTGTGGTGCCTGCTGTGATGTGGAGAAGGAGACTCAGGCGGAAGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGTGTCCAACGACAGTGC
CAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MRVMAPRTL LLLLLSGALAP TETWAGSHSLRYFGTAVSRPGRGEP RFTYVGYVDDTQFVRFDS DAASPRVEPRAPW
MEQEGPEYWEEQTR IAKARAQ TDRADLGTLLRYNQSEAGSHTIQW MFGCDLGPDRLLRGRYHQ SAYDGDYI IAL
NRDLSSWTAADLVAQNTQRKWEADRYAERQRAYLEGECELEWLRRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATL
RCWALGFYPAEITL TWQRDGEDQTQDTELVE TRPAGDGT FQKWGAVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLEPLETLKWE P
SSQSTIP IVGIVVGLAVLAVVVTGAVVAAMWRRKSSGGRGSSYSQAVSND SAQGSVSLTA

Mamu-B*69

ATGCGGGTCATGGCGCCCCGAACCCCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGGCTCGCACTCCATGA
GGTATTTACCACCAGCCCTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGCAGCCTCGCTTACGCGCGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCG
GTTTCGTAGCGACCGGAGAGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCGGTGGATAGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGCGACA
CGGAGAGTCAAGGGCCACGCACAGACTGACCTAGGGGGCCTGGGGATCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGGGGGTCTCACA
CCTACCAGAAGATGTCTGGCTGCGACGTGGGACCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGGTATCACCAGCGCGCCTACGACGGCAAGGATTA
CATCTCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACC CGCGGACATGGCGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGCGGCCCGTGC
GCGGAGCGGCAGAGAGCCTACCTGGAGGGCCGGTGCCTGGAGTGGCTCCGCAGATACTTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTACAGCGCG
CGGATCCCCCAAAGACACATGTGATCCACCCTCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGC
GGAGATCACACTGACCTGGCGCGGGATGGGGAGGAGCAAACCTCAGGACACCGAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGGAGGAGATGGAACC
TTCCAGAAGTGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCACGAGGGGCTGCCAGAACCC
TCACCCTGAGATGGGAGCCATCTTCCAGTCCACCATCCCATCGTGGGCATTGTTGCTGGCTGGCTGCTTAGCAGTTGTGGTGC
CGGAGCTGTGGTGCCTGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGGAAGAGGAGGGAGCTACTTTCAGGCTGCGTCCAGTGACAGT
GCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MRVMAPRTL LLLLLSGALAL TETWAGSHSMRYFTTALSRPGRGQPRFIAAGYVDDTQFVRFVSDAESPRMEPRARW
IEQEGPEYWEEATR RVKHAQ TDLGGLGILRGYNYQSEGGSHTYQKMSGCDVGPDRLLRGRYHQRAYDGDYI IAL
NEDLRSWTAADMAAQNTQRKWEAARAERQRAYLEGRCELEWLRRYLENGKETLQRADPPKTHVIHHSVSDHEATL
RCWALGFYPAEITL TWRRDGE EQTQDTELVE TRPGDGT FQKWGAVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLEPLETLRWE P
SSQSTIP IVGIVAGLAVLAVVVTGAVVAAMWRRKSSGGRGSSYFQAASSD SAQGSVSLTA

Mamu-B*7201/7202

ATGCGGGTCATGGCGCCCCGAACCCCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCGAGACCCGGGCCGGCTCGCACTCCATGA
GGTATTTTCATCACCGGCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTACGCGCGTGGGCTACGTGGACGAAACGCAGTTCGTGCG
GTTTCGACAGCGACCGGAGAGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGGAGACA
CGGAAAGTCAAGGAGACCGCACAGACTTCCGAGTGAAGCTGGGGAACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACA
CCTACCAGTGGATGTACGGCTGCGACCTGGGGCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGGTATCACCAGTTCGCTACGACGGCAAGGATTA
CATCGCCCTGAACAGGGACCTGCGCTCCTGGACCCTGCGGATGAGGCGGCTCAGAACACCCAGAGCAAGTGGGAGCGGGCGGTGTG
GCGGAGCAGATGAGAGCCTACCTGGAGGGGAGTGCCTGGAATGTCTCCGCGGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCG
CGGATCCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGC
GGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGAGCAAACCTCAGGACACCCAGCTCGTGGAGACCAGGCCAGGAGGAGATGGAACC
TTCCAGAAGTGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCACGAGGGGCTCCCGGAGCCCC
TCACCCTGAGATGGGAGCCATCTTCCAGTCCACCATCCCATCGTGGGCATTGTTGTTGGCTGGCTGCTTAGCAGTTGTGGTGC
TGGAGCTGTGGTGCCTGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTGGAAGAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAGCGACAGT
GCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MRVMAPRTL LLLLLSGALAL TETRAGSHSMRYFITGVS R PGRGEP RFI AVGYVDETQFVRFDS DAESPRMEPRAPW
MEQEGPEYWEEETR KVKE TAQTFRVSLGNLRGYNYQSEAGSHTYQW MYGCDLGPDRLLRGRYHQFAYDGDYI IAL
NRDLRSWTAAD EAAQNTQSKWEAAGVAEQM RAYLEGGQCLECLRGYLENGKETLQRADPPKTHVTHHP I SDHEATL
RCWALGFYPAEITL TWQRDGE EQTQDTELVE TRPGDGT FQKWGAVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLEPLETLRWE P
SSQSTIP IVGIVVGLAVLAVVVTGAVVAAMWRRKSSGGKGGSSYSQAASSD SAQGSVSLTA

Mamu-B*7402-v1 (Pseudogen)

ATGCCGCCCCGAACCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGCGCCCTGGCCCTGACCGAGACCCGGGCCGGCTCGCACTCCTTGAGGTATTTCCG
GCACCGCCGTGTCCCGGCCCGCCACGGGGAGCCCGCTTTCATCTACGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGCGCGGTTTCGACAG
CGACGCCGCGAGTCCGAGGGCGGAGCCGCGGGCCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGCAGACAGGGCTCGCC
AAGGCCCGCGCACAGACTGACCGAGTGGACCTGGGGACCTGCTCCGCTAGTACAACCAGAGCGAGGGGGACGCCTACGACGGCAAGG
ATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCCGCGGACATGGCGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCGG
TGTGGCAGAGCAGTGGAGAGCCTACCTGGAGGGCGAGTGCCTGGAGTGGCTCCGCAGACACCTGGAGAACGGGAAGGAGACTCTGCAG
CGCGCGGATCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACCCCTGCTCTGACCATGAGGCCACCTGAGGTGCTGTGCCTGGGCTTCTACC
CTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGAGCAAACTCAGGACACAGAGTTTGTGGAGACCAGGCCAGGAGGAGATGG
AACCTTCCAGAAGTGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCCGAG
CCTCTCACCTGAGATGGGAGCCATCTTCCAGTCCACCATGGCCATCGTGGGCATTGTTGTTGGCTGGCTGTCTTGGCAGTTGTGG
TCACCGGAGCTGTGGTGCCTGTGTGATGTGGAGGAGAAAGAGCTCAGGTGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAACGA
CAGTGCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

Mamu-B*8801

ATGCGGGTCATGGCGCCCCGAACCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCGAGACCCGGGCCGGCTCGCACTCCATGA
GGTATTTTCATCACCGCGGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGGGAGCCCGCTTTCATCGCCGTGGGCTACGTGGACGAAAACGCAGTTCGTGCG
GTTTCGACAGCGACGCCGAGAGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGGAGACA
CGAAAAGTCAAGGAGACCCGACAGACTTTCGAGTGGAGCTGGGGAACTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCAC
CCTACAGTGGATGTACGGCTGCGACCTGGGGCCGACGGCGCCTCCTCCGCGGTATCACAGTTCGCTACGACGGCAAGGATTA
CATCGCCCTGAACAGGGACCTGCGCTCCTGGACCGCTGCGGATGAGGCGGCTCAGAACACCCAGAGCAAGTGGGAGGCGGGGTGTG
GCGGAGCAGATGAGAGCCTACCTGGAGGGGCGAGTGCCTGGAATGTCTCCGCGGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGG
CGGATCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGC
GGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGAGCAAACTCAGGACACCGAGCTCGTGGAGACCAGGCCAGGAGGAGATGGAACC
TTCCAGAAGTGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCACGAGGGGCTCCCGAGCCCC
TCACCTGAGATGGGAGCCATCTTCCAGTCCACCATCCCATCGTGGGCATTGTTGTTGGCTGGCTGTCTTAGCAGTTGTGGTCAC
TGGAGCTGTGGTGCCTGCGGTGATGTGGAGGAGAAAGAGCTCAGGTGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAGCGACAGT
GCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MRVMAPRTL L L L L L S G A L A L T E T R A G S H S M R Y F I T G V S R P G R G E P R F I A V G Y V D E T Q F V R F D S D A E S P R M E P R A P W
M E Q E G P E Y W E E E T R K V K E T A Q T F R V S L G N L R G Y Y N Q S E A G S H T Y Q W M Y G C D L G P D G R L L R G Y H Q F A Y D G K D Y I A L
N R D L R S W T A A D E A A Q N T Q S K W E A A G V A E Q M R A Y L E G Q C L E C L R G Y L E N G K E T L Q R A D P P K T H V T H H P I S D H E A T L
R C W A L G F Y P A E I T L T W Q R D G E E Q T Q D T E L V E T R P G D G T F Q K W G A V V V P S G E E Q R Y T C H V Q H E G L P E P L T L R W E P
S S Q S T I P I V G I V V G L A V L A V V V T G A V V A A V M W R R K S S G G K G G S Y S Q A A S S D S A Q G S D V S L T A

Mamu-B-NEU-TM

ATGTGGTTCATGGCGCCCCGAACCTCCTCTTACTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGGCTCGCACTCCATGA
GGTATTTACCACCGCCGTGTCCCGGCCAGCCGCGGGGAGCCCGCTTTCATCGTCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCG
GTTTCGACAGCGACGCCGAGAGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCAGTGGATGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGCAGACA
CGGATCGTCAAGGACAACGCACAGACTTTCGAGTGGGTCTGGGGACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCGGGGTCTCACA
CCATCCAGACGATGTACGGCTGCGACCTGGGGCCGACGGCGCCTCCTCCGCGGTATTACCAGGACGCTACGACGGCAGGGATTA
CATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCTGCGGATGAGGCGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCGGTGTG
GCGGAGCAGTGGAGAGCCTACCTGGAGGGCAAGTGCCTGGAGTGTCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTGCAGCGG
CGGATCCCCAAAGACACATGTGACCCACCACCCCTCTCTGACCATGAGGCCACCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGTTTCTACCCTGC
GGAGATCTCACCGACCTGGCGCAGGATGGGGAGGAGCAAACTCAGGACACCGAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGCAGGAGATGGAACC
TTCCAGAAGTGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGGGCAGAGATACACATGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCTGGAGCCCC
TCACCTGAGATGGGGCGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCTCCAGCGACAGTGCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGG
TAA

MWVMAPRTL L L L L L S G A L A L T E T W A G S H S M R Y F T T A V S R P S R G E P R F I V V G Y V D D T Q F V R F D S D A E S P R M E P R A Q W
M E Q E G P E Y W E E Q T R I V K D N A Q T F R V G L G T L R G Y Y N Q S E A G S H T I Q T M Y G C D L G P D G R L L R G Y Y Q D A Y D G R D Y I A L
N E D L R S W T A A D E A A Q N T Q R K W E A A G V A E Q W R A Y L E G K C V E C L R R Y L E N G K E M L Q R A D P P K T H V T H H P V S D H E A T L
R C W A L G F Y P A E I S P T W R Q D G E E Q T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W G A V V V P S G E G Q R Y T C H V Q H E G L L E P L T L R W G G
K G G S Y S Q A A S S D S A Q G S D V S L T A

Mamu-B-NEU+TM

ATGGCGGTTCATGGCGCCCCGAACCCCTCTTACTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGGCTCGCACTCCATGA
GGTATTTTACCACCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGGGGAGCCCCGCTTTCATCGTCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCG
GTTCCGACAGCGAGCCGAGATCCGAGGATGGAGCCCGCGGCGCAGTGGATGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGCAGACA
CGGATCGTCAAGGACAACGCACAGACTTTCGAGTGGGTCTGGGGACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCGGGGTCTCACA
CCATCCAGACGATGTACGGCTGCGACCTGGGGCCCGACGGCGCCTCTCCGCGGTATTACCAGGACGCCTACGACGGCAGGGATTA
CATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCTGGACCGCTGCGGATGAGGCGGCTCAGATCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCGGTGTG
GCGGAGCAGTGGAGAGCCTACCTGGAGGGCAAGTGCCTGGAGTGTCTCCGAGATACTGGAGAACGGGAAGGAGATGCTGCAGCGCG
CGGATCCCCCAAAGACACATGTGACCCACCACCCGCTCTTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGTTCCTACCCTGC
GGAGATCTCACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGATCAAACCTCAGGACACCGAACTTGTGGAGACTAGGCCAGCAGGAGATGGAACC
TTCCAGAAGTGGGGAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACATGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCTGGAGCCCC
TCACCCTGAAATGGGAGCCATCTCCAGTCCAGCATCCCATCGTGGGCATTGTGCTGGCCTGGCTGCTTAGCAGTTGTAGTCAC
TGGAGCTGTGGTGCCTGTGTGATGAGGAGGAAAGAGCTCAGGCGGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAGCGACAGT
GCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

MRVMAPRTL LLLLLSGALAL TETWAGSHSMRYFTTAVSRPGRGEP RFI VVGYVDDTQFVRFDSDAESPRMEPRAQW
MEQEGPEYWEEQTRIVKDNAQTFRVGLGTLRGYINQSEAGSHTIQTMYGCDLGPDRLLRGGYQDAYDGRDYIAL
NEDLRSWTADEAAQITQRKWEAAGVAEQWRAYLEKGCVECLRRYLENGKEMLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATL
RCWALGFYPAEISL TWQRDGEDQTQDELVE TRPAGDGTFRKWA VVVP SGEEQRYTCHVQHEGLLEPLTLKWEPS
SSQSSIPVIGIVAGLAVLAVVVTGAVVAAMVRRRKSSGGKGGSSYSQAASSDSAQGSVDVSLTA

Mamu-I*01011

ATGGCGCCCGGAACCCCTCTCTGCTGCTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCGGCTCCCACTCCTTGAGGTATTTCCG
GCACCACAGTGTCCCGGCCCGGCCGGGGAGCCGCTTTCATCGCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTCCGACAG
CGACGCCGAGAGTCCGAGGATGGAGCCCGCGGCCCGCTGGATGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGAAGAGGAGACACGGATCGCC
AAGGCCCGCGCACAGACTGAGCGAGGAACTGCGGACCGCGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGCGGGGTCTCACACCCCTCCAGA
AGATGTGTGGCTGCGACCTGGGGCCCGACGGCGCCTCTCCGCGGTATTACCAGTCCGCTACGACGGCAGGGATTACATCGCCCT
GAACGAGGACCTGCGCTCTGGACCGCTGCGGGTGGAGCGGCTCAGAACACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCGGTGGAGGAGAGCAG
CGGAGAGCCTACTGGAGGGCCGGTGGAGTGGCTCCGAGATACCTGGAGAAGGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGGATCCCC
CAAAGACACACCTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCAC
ACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGAGCAAACCTCAGGACACCGAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGGAGGAGATGGAACTTCCAGAAG
TGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTGCCGAGCCCTCACCTGA
GATGGGAGCCGCTTCCAGTCCACCATCCCATCATGGGCATTGTGCTGGCCTGGCTGTCTTAGCAGTTGTGGTCCACCGAGCTGT
GCTCGCAGCTGTGATGTGGAGGAAAGAGCTCAGGTGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGCCAGCAACAGTGCCAGGGC
TCTGATGTGTCTTCCACAGCTTG

MAPGTL LLLLLSGALAL TETWAGSHSLRYFGTTVSRPGRGEP RFI AVGYVDDTQFVRFDSDAESPRMEPRAPWMEQ
EGPEYWEETRIAKARAQTERGNLRTALRYINQSEAGSHTLQKMGCDLGPDRLLRGGYQSAIDGRDYIALNED
LRSWTAAGEAAQNTQRKWEAAGEAEQRRAYLEGRVLEWLRRYLEKGETLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATLRCW
ALGFYPAEITL TWQRDGEETQDELVE TRPGDGNFQKWA VVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEPSQ
STIPIMGIVAGLAVLAVVVTGAVVAAMVRRRKSSGGKGGSSYSQAAPSNSAQGSVDVSLTA

Mamu-E*0110

ATGGCACTAGGAACCCCTACTTCTCTGCTCTCGGCCCTTACCAAGACCTGGGCGGGCTCCCACTCCTTGAAGTATTTCCACACTTCCG
TGTCCCGGCCCGCGCGGGGGGCCCGCTTTCATCTCCGTGGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTGCGGTATGACAGCGACGCGGC
GAGTCCGAGGATGGAGCCCGGGCGCTGTGGATGAAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGACAGGAGACACGGAGCGCCAGGGCCACC
GCACAGACTTTCGAGTGAACCTGGAGACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCGGGGTCTCATAACCTCCAGTGGATGCATG
GCTGCGACCTGGGGCCCGACGGGCGCTTCTCCGCGGTATGAACAGTTCGCTACGACGGCAAGGATTATCTCACCCCTGAATGAGGA
CCTGCGCTCTGGTCCGCGGTGGACACGGCGGCTCAAATCTCCGAGCAAAAGTCAAATGATGGCTCTGAGGCGGAGCACAGAGAGCC
TACCTGGAAGACACATGCGTGGAGTGGCTCCGAGATACCTGGAGAATGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCTCGGAATCCCCAAAGACAC
ACGTGACCCACCACCCGCTCTGATCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTACCTGCGGAGATCACAGTGCACCTG
GCAGCGGGATGGGGAGGACCAGACCCAGGACACGGAGCTTGTGGAGACCAGGCCTGCAGGGGATGGAACCTTCCGGAAGTGGGCAGCT
GTGGTGGTACCTTCTGGAGAGGAGCAGAGATACAGTGCATGTGCAGCATGAGGGGCTACCCGAGCCCTCACCTGAGATGGGAGC
CGTCTCCAGTCCACCATCCCATCCGTCGCGCATATTGCTGGCCTGGTCTCTCTGCGCGTGTGCTCACTGGAGCTGTGGTGTGCTGC
TGTGGTGTGGAGGAGAAAGAGCTCAGGTAGAAAAGGATGGAGCTACTCTCAGGCTGTGGGAAGCGACAGTTCACAGGATCTGATGAT
TCTCTCACAGCTTATAACC

MALGTL LLLLLSALTKTWAGSHSLKYFHTSVSRPGGGGPRFISVGYVDDTQFVRYDSDAASPRMEPRALWМКQEGP
EYWDQETRSARATAQTFRVNLETLRGYINQSEAGSHTLQWMHGCDLGPDRFLRGYEQFAYDGKDYLLNEDLRS
WSAVDTAAQISEQKSNDSAEHQRAYLEDTCVEWLRRYLENGKETLQRSESPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALG
FYPAEITV TWQRDGEDQTQDELVE TRPAGDGTFRKWA VVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEPSQSTI
PIVGI IAGLVLLGAVLTGAVVAAMVRRRKSSGRKGWSSYSQAVGSDSSQGSDDSLTAYK

Mamu-E*02

ATGGCACTAGGAACCTACTTCTCCTGCTCTCGGCCCTTACCAAGACCTGGGCGGGCTCCCACTCCTTGAAGTATTCCACACTTCCG
 TGTCCCGGCCCGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCACTCCTGTTGGCTACGTGGGCGACACCCAGTTCGTGCGGTACGACAGCGACGCCCG
 GAGTCCGAGGATGGAGCCGCGGGCGCTGTGGATGAAGCAGGAGGGGCGGAGTATGGGACCAGGAGACCGGAGCGCCAGGGACACC
 GCACAGACTTCCGAGTGAACCTGAAGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCATACTCTCCAGTGGATGCATG
 GCTGCGACCTGGGGCCGACGGGCGCTTCTCCGCGGGTATGAACAGTTTGCCACGACGCAAGGATTATCTCACCTGAATGAGGA
 CCTGCGCTCCTGGTCCGCGGTGGACACGGCGGCTCAAATCTCCGAGCAGAAGTCAAATGATGGCTCTGAGGCGGAGCACCAGAGAGCC
 TACCTGGAAGACACATGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAATGGGAAGGAGACGCTGCTGCGCTCGGAATCCCCAAAGACAC
 ACGTGACCCGCCACCCCGTCTGTATCATGAGGCCACCCAGAGTGTGGGCCCTGGGCTTACCCCTCGGAGATCACAGTGACCTG
 GCAGCGGGATGGGGAGACCAGACCCAGGACACGGAGCTTGTGGAGACCAGGCTGCAGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCAGCT
 GTGGTGGTACCTTCTGGAGAGGAGCAGATACACGTGCCATGTGCAGCATGAGAGGCTACCCGAGCCCTCACCTGAGATGGGAGC
 CGTCTCCAGTCCACCATCCCCATCGTGGGCATCATTGCTGGCCTGGTTCTCCTTGGAGCTATGGTTGTTGCTGTGTTGTTGCTGT
 GATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGGTAGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTTCGTGTAGCGACAGTACCAGGGATCTGATGAGTCT
 CTCACAGCTTATAAACC

MALGTL L L L L L S A L T K T W A G S H S L K Y F H T S V S R P G R G E P R F I S V G Y V G D T Q F V R Y D S D A A S P R M E P R A L W M K Q E G P
 E Y W D Q E T R S A R D T A Q T F R V N L K T L R G Y N Q S E A G S H T L Q W M H G C D L G P D G R F F R G Y E Q F A Y D G K D Y L T L N E D L R S
 W S A V D T A A Q I S E Q K S N D G S E A E H Q R A Y L E D T C V E W L R R Y L E N G K E T L L R S E S P K T H V T R H P V S D H E A T L R C W A L G
 F Y P A E I T V T W Q R D G E D Q T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W A A V V V P S G E E Q R Y T C H V Q H E R L P E P L T L R W E P S S Q S T I
 P I V G I I A G L V L L G A M V V A V V V A V M W R R K S S G R K G G S Y S Q A S C S D S T Q G S D E S L T A Y K

Mamu-80-6 (Pseudogen, Teilsequenz)

ATGCGGGTCATGGCGCCCCGCTAAGGACAGACCTCAGGAAGACAATGGTCCAGCTTCAGCACATCCTCTCCCTCGGGTTTCTCTGA
 TCCTGACCTGGGTCTGCAGTCACAGTCTTGAAACTCCTCTGGGATCTCACGGCCCTGCCTCCTCTCTGGCCTCTCACAGCTTGTTTT
 CTTTCCACAGATGACAGCCGTGCTCAGGCTTCAATGTAAGTGTAGTAGGGGTGGGAGAGTATCCCTGAGAGCCTTGGGATAGTGTAGA
 CAGGAGCCCATGGGGAGCTCACCCACCCACAATTCTCCTTTAGTCACATCAGCTGTGAGCTCTGACCAGATTTGTTTTTCTTCC
 ACCCGAACAGGGACGGTATCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACGGCTACCCGGGTACGAATCGAATTCGCGCGGCCCATGGCGGC
 CGGGAGCATGCGACGTGCGGCCCAATTCGCCCTATAGTGATGTGTCTCTCACGGCTAA

HLA-Cw*0301

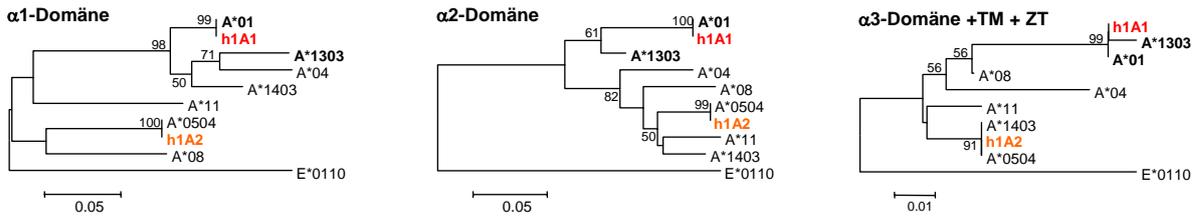
ATGCGGGTCATGGCGCCCCGAACCTCATCCTGCTGCTCTCGGGAGCCCTGGCCCTGGCCGAGACCTGGGCGGGCTCCCACTCCATGA
 GGTATTTCTACACCGCTGTGTCCCGCCCGCCGCGGGGAGCCCCACTTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACGACACCGAGTTCGTGCG
 GTTCGACAGCGACGCCCGGAGTCCGAGAGGGGAGCCCGGGCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGACCGGGAGACA
 CAGAAGTACAAGCGCCAGGCACAGACTGACCGAGTGGCCTGCGGAACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCAGGTCTCACA
 TCATCCAGAGGATGTATGGCTGCGACGTGGGGCCGACGGCGCCTCCTCCGCGGGTATGACCAGTACGCTACGACGGCAAGGATTA
 CATCGCCTGAACGAGGATCTGCGCTCCTGGACCGCCGCGGACACGGCGGCTCAGATCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCGTGAG
 GCGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGGCCTGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGAAGAATGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCG
 CGAAACACCCAAAGACACACGTGACCCACCATCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCTGC
 GGAGATCACACTGACCTGGCAGTGGGATGGGGAGGACCAACTCAGGACACTGAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGCAGGAGATGGAACC
 TTCCAGAAGTGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACAGTGCATGTGCAGCAGAGGGGCTGCCGGAGCCCC
 TCACCTGAGATGGGAGCCGTCTTCCAGCCACCATCCCATCGTGGGCATCGTTGCTGGCCTGGCTGTCTGGCTGTCTAGCTGT
 CCTAGGAGCTGTGGTGGCTGTTGTGATGTGTAGGAGGAAGAGCTCAGGTGGAAAAGGAGGGAGCTGCTCTCAGGCTGCGTCCAGCAAC
 AGTGCCAGGGCTCTGATGAGTCTCTCATCGCTTGTAAGCCCA

MRVMAPRTL I L L L L S G A L A L A E T W A G S H S M R Y F Y T A V S R P G R G E P H F I A V G Y V D D T Q F V R F D S D A A S P R G E P R A P W
 V E Q E G P E Y W D R E T Q K Y K R Q A Q T D R V S L R N L R G Y N Q S E A R S H I I Q R M Y G C D V G P D G R L L R G Y D Q Y A Y D G K D Y I A L
 N E D L R S W T A A D T A A Q I T Q R K W E A A R E A E Q L R A Y L E G L C V E W L R R Y L K N G K E T L Q R A E H P K T H V T H P V S D H E A T L
 R C W A L G F Y P A E I T L T W Q W D G E D Q T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W A A V V V P S G E E Q R Y T C H V Q H E G L P E P L T L R W E P
 S S Q P T I P I V G I V A G L A V L A V L A V L G A V V A V M C R R K S S G G K G G S C S Q A A S S N S A Q G S D E S L I A C K A

Abb. 10.1: Auflistung aller isolierten MHC-Klasse-I-Sequenzen.

Für jedes isolierte Transkript ist die Nukleotidsequenz vom Startkodon bis vor die Restriktionssequenz, die durch den 3'-Primer in die Sequenz eingebaut wurde, dargestellt. Bei offenem Leserahmen ist auch die AS-Sequenz angegeben.

Mamu-A



Mamu-B

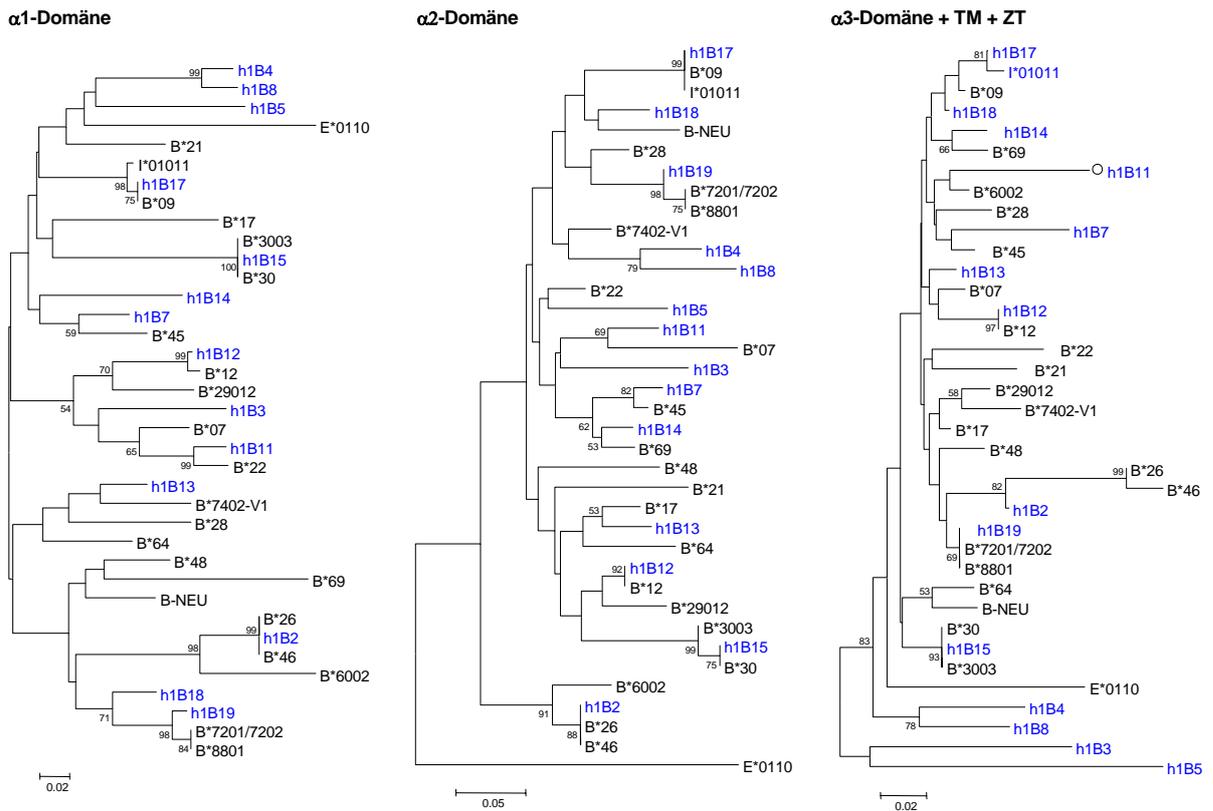


Abb. 10.2: Vergleich der einzelnen Domänen zwischen genomischen Sequenzen und den in der Arbeit isolierten *Mamu-A-* und *Mamu-B-* / *-I*-Sequenzen.

Die phylogenetischen Bäume basieren auf AS-Sequenzen, die die einzelnen Domänen verschlüsseln. In die Auswertung wurden die Gene des Haplotyps h1 und die hier isolierten *Mamu-A-* und *Mamu-B-* / *-I*-Sequenzen. (a) α 1-Domäne (b) α 2-Domäne, (c) α 3-Domäne + Transmembranregion + zytoplasmatische Region. Gene mit unvollständigem Leserahmen und Varianten (*B*28-L*, *B-NEU-TM*) wurden nicht in die Auswertungen mit einbezogen. Die Bezeichnungen der hier isolierten Sequenzen (schwarz) entspricht Tab. 4.1. Die Berechnung der phylogenetischen Bäume erfolgte mit *MEGA 3.1* nach dem NeighborJoining-Verfahren mit 10000 Wiederholungen.

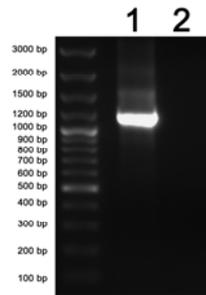


Abb. 10.3: Amplifikation der vollständigen HLA-C-Sequenzen aus cDNA von Proband 1.

Dargestellt ist ein Agarosegel mit 2 μ l HLA-C-PCR-Ansatz in Spur 1 und einer H₂O-Negativkontrolle in Spur 2 neben einem Längenstandard (links). In den HLA-C-spezifischen PCR-Ansatz wurde je 1 μ l cDNA als *template* mit den Oligonukleotiden HLA-C GFP F/ R eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte nach PCR-Programm 1.

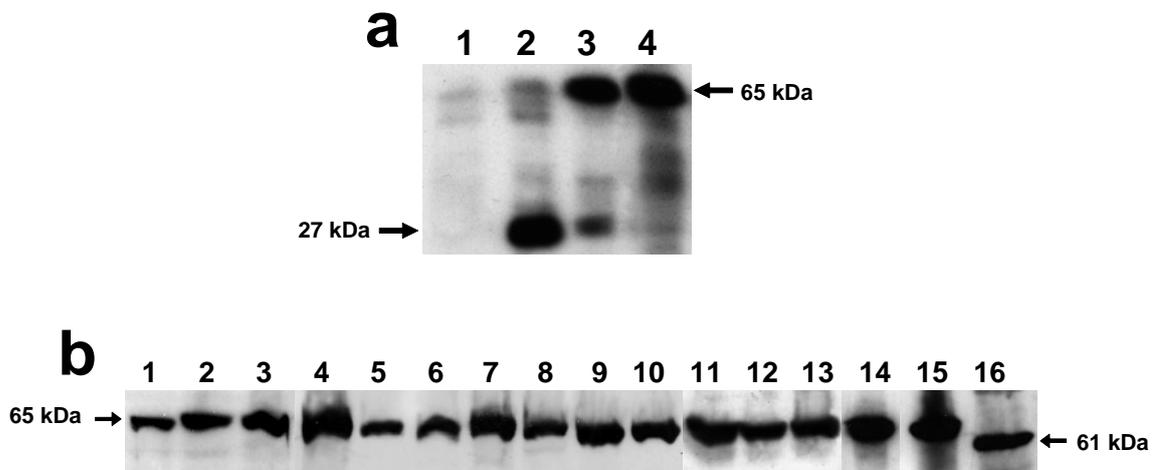


Abb. 10.4: Expressionskontrolle der Mamu-B-, Mamu-I-, Mamu-E- und HLA-C-AcGFP-Fusionsproteine mit dem anti-GFP-AK.

Immunoblot-Analysen mit Auftrennungen von 5×10^4 Zellen pro Spur auf 10%igen SDS-Gelen. Die Nitrozellulosemembranen beider *Blots* wurden über Nacht bei 4 °C mit dem monoklonalen anti-GFP-AK (1:5000) inkubiert und anschließend 1 h mit dem polyklonalen HRP-gekoppelten IgG-AK inkubiert. Nach der ECL-Reaktion wurde ein Röntgenfilm 15 s bis 45 s aufgelegt. (a) AcGFP-Nachweis in K562-Zellen transfiziert mit dem pAcGFP-N1-Vektor ohne integriertes MHC-Klasse-I und mit integriertem MHC-Klasse-I. (1) untransfizierte K562-Zellen, (2) AcGFP-Kontrolltransfektante, (3) Mamu-B*09-AcGFP-Transfektante, (4) Mamu-B*48-AcGFP-Transfektante. (b) Expressionskontrolle aller Mamu-B-, Mamu-I-, Mamu-E- und HLA-C-AcGFP-Fusionsproteine. (1) HLA-Cw*0301-AcGFP, (2) Mamu-E*0110-AcGFP, (3) Mamu-I-AcGFP, (4) Mamu-B*09-AcGFP, (5) Mamu-*12-AcGFP, (6) Mamu-B*17-AcGFP, (7) Mamu-B*28-L-AcGFP, (8) Mamu-B*28+L-AcGFP, (9) Mamu-B*3002-AcGFP, (10) Mamu-B*45-AcGFP, (11) Mamu-B*47-AcGFP, (12) Mamu-B*48-AcGFP, (13) Mamu-B*6002-AcGFP, (14) Mamu-B*64-AcGFP, (15) Mamu-B-NEU+TM, (16) Mamu-B-NEU-TM.

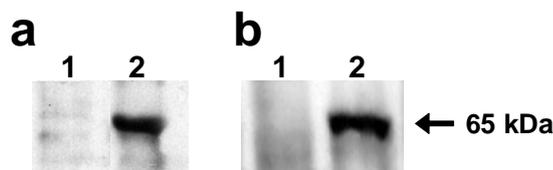


Abb. 10.5: Expressionskontrolle des Mamu-E-AcGFP-Fusionsproteins mit dem HC-A2 und des HLA-Cw*0301-AcGFP-Fusionsproteins mit dem HC-10-AK.

Immunoblot-Analysen mit Auftrennungen von 5×10^4 Zellen pro Spur auf 10%igen SDS-Gelen. Die Nitrozellulosemembranen beider *Blots* wurden über Nacht bei 4 °C (a) mit dem monoklonalen anti-MHC-Klasse-I-AK HC-A2 (1:5) und (b) mit dem monoklonalen anti-MHC-Klasse-I-AK HC-10 (1:5) inkubiert und anschließend 1 h mit dem polyklonalen HRP-gekoppelten IgG-AK inkubiert. Nach der ECL-Reaktion wurde ein Röntgenfilm 45 s aufgelegt. (a) Nachweis von Mamu-E*0110-AcGFP neben untransfizierten K562-Zellen (b) Nachweis von HLA-Cw*0301-AcGFP neben untransfizierten K562-Zellen.

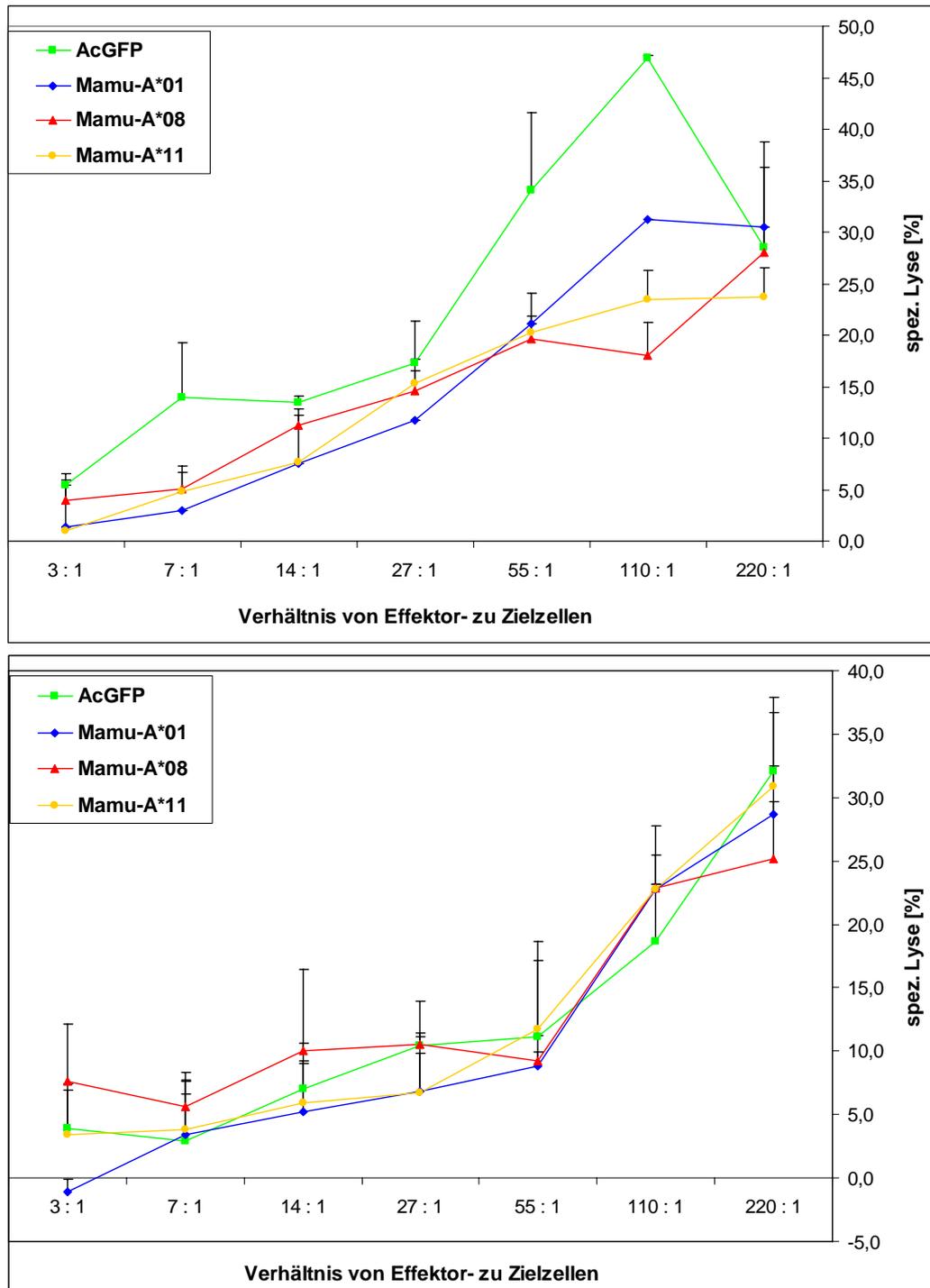


Abb. 10.6: Beispiele für variierende Ergebnisse in Chromfreisetzungstests mit Mamu-A-Transfektanten und Rhesusaffen-Lymphozyten.

Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte mit *Excel 2003*. Dargestellt sind zwei unabhängige Tests mit der K562-AcGFP-Kontrolltransfektante und den stabilen K562-Transfektanten Mamu-A*01, Mamu-A*08 und Mamu-A*11. Als Effektorzellen dienten PBMC aus Rhesusaffenblut (Tier-Nr.: 2146 und 2181 bzw. 12418, 12419, 12740 und 12741). Aufgetragen ist die spezifische Lyse in Prozent gegen die Lymphozyten-Anzahl pro Zielzelle. Jeder Punkt gibt den Mittelwert von 3 parallelen Ansätzen mit gleichem PBMC / Zielzellverhältnis wieder. Die Standardabweichung ist als schwarzer Balken für jeden Mittelwert angegeben. Der obere Test zeigt ein Beispiel, bei dem die spezifischen Lysen der Mamu-A-Transfektanten deutlich gegenüber der spezifischen Lyse der AcGFP-Kontrolltransfektante reduziert war. Der untere Test zeigt ein Beispiel, bei dem kaum Unterschiede zwischen der spezifischen Lyse der AcGFP-Kontrolltransfektante und den spezifischen Lysen der Mamu-A-Transfektanten zu beobachten waren.

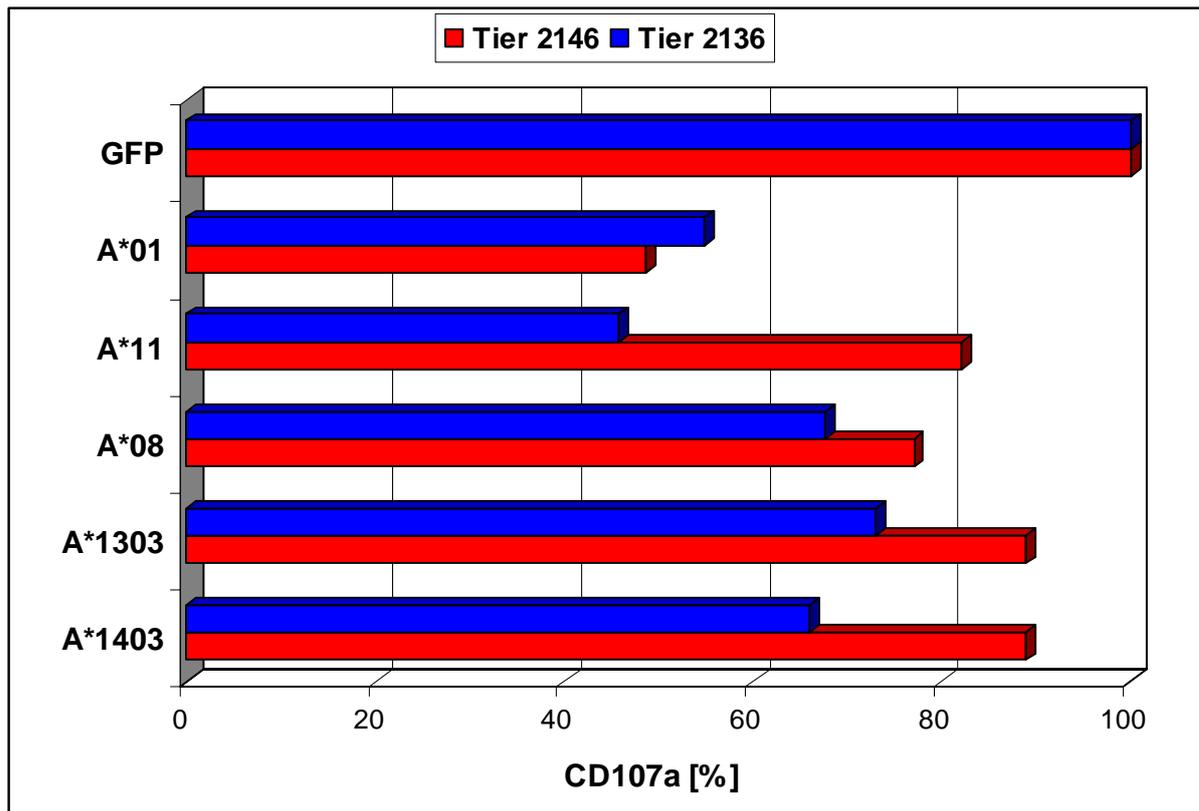


Abb. 10.7: Zusammenfassung der unabhängigen Degranulierungsassays mit Mamu-A-Moleküle.

Gezeigt ist je ein repräsentativer von fünf vergleichbaren Tests mit PBMC isoliert aus Tier 2136 und Tier 2146. Von einer statistischen Zusammenfassung verschiedener Experimente wurde abgesehen, da einzelne Tests nur bedingt miteinander vergleichbar sind. Pro Tag konnte aufgrund der geringen Blutmenge jeweils nur ein Test angesetzt werden. Die NK-Zellmenge wie auch deren Expressionsmuster kann jedoch stark tagesabhängig variieren und damit die Maximalstimulation, so wie die prozentualen Veränderungen in Proben inkubiert mit einzelnen Transfektanten stark verändern. Da die K562-AcGFP-Kontrolltransfektante keine MHC-Klasse-I-Moleküle exprimiert, wird bei Inkubation mit NK-Zellen eine maximale Stimulation erreicht. Dieser Wert an CD107a-positiven Zellen wurde in allen Tests auf 100% gesetzt. Die Degranulierung der einzelnen Mamu-A-Transfektanten wurde prozentual zur Maximalstimulation berechnet und in farbigen Balken angegeben. Verwendet wurden jeweils die Transfektanten Mamu-A*01, Mamu-A*08, Mamu-A*11, Mamu-A*1303 und Mamu-A*1403. Die graphische Darstellung wurde mit *Excel 2003* erstellt. Die Degranulierungsassays zeigten, dass Mamu-A-Transfektanten in der Lage sind, die Degranulierung von NK-Zellen beider Tiere zu verringern.

ABKÜRZUNGEN

β2M	β2-Mikroglobulin
β-ME	β-Mercaptoethanol
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AcGFP	grünes Fluoreszenzprotein der Qualle <i>Aequorea coerulea</i>
ad.	adjust
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i> (erworbenes Immundefektsyndrom)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	<i>antigen presenting cell</i> (antigenpräsentierende Zelle)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5-triphosphat
BAT1	HLA-B assoziiertes Transkript 1
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
BT	BSA-Triton-X
bzw.	beziehungsweise
C-terminal	Carboxyl-terminal
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Ci	Curie
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Zytomegalie-Virus
Cr	Chrom
cpm	<i>counts per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
Cy	Cyanin
d	Dichte
d. h.	das heißt
DAP12	<i>DNAX activating protein of molecular mass 12 kDa</i>
dATP	Desoxyadenosin-5-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5-triphosphat
ddATP	Didesoxyadenosin-5-triphosphat
ddCTP	Didesoxycytidin-5-triphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosin-5-triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotid-5-triphosphat
ddTTP	Didesoxythymidin-5-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5-triphosphat
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>fluorescence activated cell scanning</i> (Durchflusszytometrie)
Fc	<i>fragment crystallizable</i> (kristallines Fragment)

FG	Forschergruppe
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
F / <i>for</i>	<i>forward</i> (vorwärts)
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GTC	Guanidinthiocyanat
h	<i>hour</i> (Stunde)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> (Humanes Immundefizienzvirus)
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> (Humane Leukozytenantigene)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
i. d. R.	in der Regel
IC	<i>immunochemistry</i> (Immunchemie)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF γ	Interferon-gamma
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β D-Thiogalactopyranosid
ITIM	<i>immunorezeptor tryrosine-based inhibitory motif</i>
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHCO ₃	Kaliumbicarbonat
KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i> (Killerzell-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor)
KMT	Kalium-Magnesium-Tris (-Puffer)
l	Liter
LAIR	<i>leukocyte-associated Ig-like receptor</i> (Leukozyten-assoziiertes Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor)
LAMP-1	<i>lysosome-associated membrane protein-1</i> (Lysosomen-assoziiertes Membranprotein-1)
LB	Luria-Bertani
LILR	<i>leukocyte immunoglobulin-like receptor</i> (Leukozyten-immunglobulin-ähnlicher Rezeptor)
LRC	<i>leukocyte receptor complex</i> (Leukozyten Rezeptorkomplex)
M	Molarität
mAK	monoklonaler Antikörper
Mamu	MHC von <i>Macaca mulatta</i>
Mane	MHC von <i>Macaca nemestrina</i>
max.	maximal
Mb	Megabasen
MCS	<i>multiple cloning site</i> (multiple Klonierungsstelle)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIC	<i>MHC class I chain related</i> (MHC-Klasse-I-Ketten verwandtes Molekül)
min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mM	Millimolar

MOG	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i> (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteine)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> (Boten-) Ribonukleinsäure
Na ₂ ⁵¹ CrO ₄	Dinatriumchromat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCitrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
Na-Desoxycholat	Natriumdesoxycholat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaJ	Natriumjodid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NP40	Nonylphenyl-polyethylenglycol
N-terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (Mononukleäre Blutzellen)
PBR	Peptidbindungsregion
PBS	Phosphat-gepufferter Salz-Puffer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMA	<i>phorbol myristate acetate</i> (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Azetat)
pmol	Picomol
R / rev	<i>reverse</i> (hinten)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Natriumchlorid-EDTA (-Puffer)
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i> (Simian Immundefizienzvirus)
SOB	Hefe-Tryptone-Salz-Medium
SOC	glukosehaltiges SOB-Medium
spez.	spezifisch
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
SSP	sequenzspezifische Primer
Strep	Streptavidin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TC	<i>tricolour</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell Rezeptor)
TE	Tris-EDTA (-Puffer)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembran
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF19	Transkriptionsfaktor 19
TRIM39	<i>tripartite motif-containing 39</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
Tween	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	<i>units</i> (Enzymeinheit)
u. a.	unter anderem (n)

UV	Ultraviolett
V	Volt
vergl.	vergleiche
Vol.	Volumen
WB	<i>Western Blot</i>
x g	x Erdbeschleunigung (9,81 m / s ²)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
z. B.	zum Beispiel

Abkürzungen der DNA-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Wobble-Positionen

W	<i>Weak-2h-bonds</i> (Basen mit schwachen Wasserstoffbindungen; Adenin /Thymin)
Y	Pyrimidine (Cytosin / Thymin)

Abkürzungen der Aminosäuren

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

DANKSAGUNG

Während der Zeit meiner Doktorarbeit standen mir viele helfende Hände zur Seite, die sowohl im Wissenschaftlichen wie auch im Privaten mein Leben bereichert haben.

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Hardeland für die Übernahme des Referats im Fachbereich Biologie und für seine stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen und organisatorischen Hilfe. Bei Herrn PD Dr. W. Kramer bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats.

Für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Dissertation, die fachliche Betreuung, sowie für die Diskussionsbereitschaft bedanke ich mich bei PD Dr. L. Walter.

Großen Dank schulde ich all meinen Kollegen in der FG Primatengenetik für das angenehme Arbeitsklima und die allgemeine Hilfsbereitschaft. Vor allem bedanke ich mich bei den technischen Assistenten Christiane Schwarz und Nico Westphal für die Unterstützung im Labor. Besonders muss ich dabei die Mithilfe von Nicole Otto in der Zellkultur hervorheben.

Bei Dr. med. R. Dressel bedanke ich mich für die Möglichkeit, in seinem Labor Versuche durchzuführen und seine Hilfe bei der Auswertung.

Ein besonderer Dank kommt den Tierärzten des DPZ zu, ohne deren kooperative Zusammenarbeit viele Versuche nicht möglich gewesen wären.

Immanuel Grützner und Alexander Weismann kommt mein Dank für die Hilfe bei der statistischen Auswertung einiger Versuche zu.

Meinen lieben „Mitdoktoranden“ gilt ein besonderer Dank für ihre Diskussionsbereitschaft, sowie für die vielen lustigen Stunden im Labor und die gemeinsamen Koch- und DVD-Abende. Ein besonderer Dank gilt auch Dr. C. Roos, der immer eine große Hilfe im Labor war und für alle Fragen ein offenes Ohr hatte.

Bei Anna, Christian, Christiane, Martin, Nicole, Philip und Trixi bedanke ich mich im Besonderen für die entgegengebrachte Freundschaft, den gemeinsamen Sport, die fröhlichen Koch- und Spieleabende und so vieles mehr...

Meiner Familie gilt mein ganz besonderer Dank. Meine Eltern Ruth und Erich Rosner standen immer hinter mir und haben mich in allen Belangen unterstützt. Ohne ihre Zuversicht und Hilfe in allen Lebenslagen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Auch meinem „großen“ Bruder Martin Rosner kommt ein besonderer Dank zu. Er hat stets meine Karriereplanung im Auge gehabt und stand mir mit seiner Frau Carolin immer zur Seite.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Wolfgang Vukovich, der alle Höhen und Tiefen des vergangenen Jahres tapfer ertragen hat und mir eine Große Hilfe bei der Verfassung der Arbeit war. Tausend Dank für die (Ver-)Pflegung! In diesem Zuge muss auch Herr C. Vukovich Erwähnung finden, der mit seiner ausgleichenden Art stets beruhigend auf mich einwirkte.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei allen Freunden und der Familie für ihre Zuversicht in mich.

DANKE!

LEBENS LAUF

Cornelia Melanie Rosner

Diplom-Biologin

geboren am 06.09.1978 in Kassel

- seit Okt. 2004 Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der FG-Primatengenetik bei PD Dr. Lutz Walter am Deutschen Primaten Zentrum in Göttingen
- März 2008 P. Kruse, C. Rosner, L. Walter. „Characterisation of the killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and specificity of interaction with MHC class I molecules“, KIR polymorphism Workshop 2008, Dublin, Irland (Vortrag)
- Sep. 2007 C. Rosner, L. Walter. „Functional analysis of MHC class I genes in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*)“, 37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg, Deutschland (Poster)
- Feb. 2007 C. Rosner, P. Kruse, L. Walter. „KIR gene diversity in rhesus macaques“, 2. Göttinger Workshop on Immunogenetics, Göttingen, Deutschland (Vortrag)
- Okt. 2006 C. Rosner, P. Kruse, L. Walter. „KIR gene polymorphism in rhesus macaques“, KIR polymorphism Workshop 2006, Düsseldorf, Deutschland (Vortrag)
- März 2006 Teilnahme an der „2. Spring School of Immunology“ der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Ettal
- Sep. 2005 C. Rosner, P. Kruse, L. Walter. „MHC class I and KIR molecules of rhesus monkey (*Macaca mulatta*)“, Joint Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies for Immunology, Kiel, Deutschland (Poster)
- 2003 - 2004 Anfertigung der Diplomarbeit „Die Bedeutung von interspergiert repetitiver DNA (SINEs oder *short interspersed elements*) für Prionerkrankungen (TSE)“, in der AG Infektiopathologie bei PD Dr. Walter Bodemer am Deutschen Primaten Zentrum in Göttingen
- 2003 Abschluss des Studiums zur Diplom-Biologin

2001 - 2003	Studentische Hilfskraft an der Georg-August-Universität Göttingen im Fachbereich Zoologie
2000 - 2003	Hauptstudium im Fachbereich Biologie an der Universität Göttingen
1998 - 2000	Studium im Fachbereich Biologie an der Universität Kassel bis zum Vordiplom
1998	Abitur
1989 - 1998	Engelsburggymnasium Kassel
1985 - 1989	Grundschule Habichtswald-Dörnberg