

**Analyse der Peptidmotive von molekulargenetisch
definierten HLA-A*66 Varianten:
Einfluss von allelischen Aminosäureaustauschen
auf Peptid-Ankerpositionen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Christina Bade-Döding

geboren am 21. November 1972 in Minden

Referent: Prof. Dr. Scheper
Institut für Technische Chemie
Universität Hannover

Koreferent: Prof. Dr. Müller
Institut für Biochemie
Medizinische Hochschule Hannover

Datum der Promotion: 12.03.2007

Diese Arbeit entstand im Institut für Technische Chemie an der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. T. Scheper und in Kooperation mit Prof. Dr. R. Blasczyk, Institut für Transfusionsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover.

Lea und Adele gewidmet

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper ganz herzlich für die Betreuung und freundliche Unterstützung dieser Promotion.

Herrn Prof. Dr. Müller danke ich sehr für die Übernahme des Koreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Blasczyk für das stete Interesse an den Ergebnissen, viele Ideen und Motivation und ausserordentliche Unterstützung und Geduld.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Holger-Andreas Elsner, Labor Fenner, Hamburg, und Herrn Prof. Dr. Axel Seltsam bedanken. Holger für das ausführliche Korrekturlesen dieser Arbeit, viele konstruktive Ideen und für das artifizielle System und Axel für seine Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

Frau Prof. Dr. Britta Eiz-Vesper danke ich sehr für die Betreuung, viele anregende Gespräche und das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein ganz spezieller Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Constanca Sofia Ferreira de Figueredo für viele wissenschaftliche und private Diskussionen und dafür, dass sie immer im richtigen Moment da ist.

Ich danke Frau Dipl. Biol. Marta Albis-Camps ganz herzlich für die gute Arbeitsatmosphäre und viele wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Gespräche.

Claudia van Deventer möchte ich einen ganz besonders großen Dank für ganz viel Hilfe in administrativen und privaten Fragen aussprechen.

Julia Plote, Herrn Dr. rer. nat. Joachim Kuhn und Herrn Dr. rer. nat. Christian Götting, Herz- und Diabeteszentrum Bad Oeynhausen, möchte ich danken für motivierende Anfragen. Danke für kritisches Korrekturlesen, Joe.

Bei allen Institutsmitgliedern der Transfusionsmedizin, besonders bei Herrn M.Sc. David DeLuca, Frau Susanne Aufderbeck, Frau Jana Zenk, Frau Dipl. Ing. Murielle Verboom, sowie auch bei allen hier nicht explizit aufgeführten Kollegen, möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meiner Familie, besonders Lea und Adele danke ich ganz besonders für ihr Verständnis und Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zusammenfassung

Allel-spezifische Peptidmotive von HLA-A*66 Varianten

Humane Leukozyten Antigene (HLA)-Klasse I Moleküle präsentieren endogen prozessierte Peptide, welche von cytotoxischen CD8+ T-Zellen erkannt werden. Die hochpolymorphe Peptidbindungsregion (PBR) der HLA Moleküle besteht aus sechs Spezifitätstaschen (*specificity pockets*, Pockets A-F). Die Seitenketten der den Pockets zugeordneten Aminosäuren (AS) interagieren mit einer spezifischen AS Position des gebundenen Peptides. Der AS Polymorphismus der PBR bestimmt die Eigenschaften sowie die Konformation der korrespondierenden Peptide. Unterschiede im Peptidbindungsmuster zwischen HLA-Klasse I Subtypen resultieren in alloreaktiven T-Zell Reaktionen.

Bisher waren kaum Daten über die Bindungsmotive der korrespondierenden Peptide von A*66 Varianten, welche zur serologischen HLA-A10 Gruppe gehören, bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden Peptide aus rekombinanten HLA-A*6602 und A*6603 Molekülen sequenziert und deren Eigenschaften mit publizierten Daten von Peptiden aus A*6601 Molekülen verglichen.

Das Allel A*6602 unterscheidet sich von A*6601 an AS Position 90 (außerhalb der PBR) und 163 (Pocket A). A*6603 unterscheidet sich von A*6601 und A*6602 an AS Position 70 (Pocket B und C). Die Bindungsmotive der Peptide aus A*6602 und A*6603 unterscheiden sich nicht, was darauf schließen lässt, daß der Polymorphismus Gln70His in diesem Fall keine Auswirkung auf das Peptidspektrum hat. Dahingegen konnte ein starker Unterschied zwischen dem Hilfsanker (*auxiliary anchor*) an P1 der A*6601 gebundenen Peptide (polar / sauer: Asp, Glu) und der A*6602/6603 gebundenen Peptide (polar / neutral: Ser) nachgewiesen werden. Die AS an P1 interagiert mit Pocket A der PBR. Die Änderung in den physiko-chemischen Eigenschaften des Peptidmotives an P1 läßt sich durch den Polymorphismus an AS Position 163 erklären, wo Arg (hydrophil, basisch) im A*6601 Molekül durch Glu (hydrophil, sauer) in den Molekülen A*6602/6603 ersetzt wird. Dadurch kommt es zu einer pK_s -Änderung des Pocket A für diese Moleküle, wodurch die Bindung saurer AS an P1 des Peptides nicht mehr möglich ist; dies resultiert in der Präferenz für die neutrale AS Ser.

Die starken Unterschiede im Peptidbindungsmotiv zwischen A*6601 vs. A*6602/6603 weisen auf eine starke Allogenität hin. Die Kenntnis von Allel-spezifischen Peptidmotiven hilft, bei der Spendersuche für die Stammzelltransplantation Mismatches zwischen HLA Subtypen besser werten zu können, wenn kein HLA identischer Spender verfügbar ist.

Stichworte: HLA-A*66 / Peptidmotiv / Pocket A / allogen

Abstract

Allele-specific peptide motifs of HLA-A*66 variants

Class I Human Leukocyte Antigens (HLA) present peptides from the endogenous antigen presentation pathway to CD8⁺ cytotoxic T-cells, contributing to the recognition of HLA molecules by T-cells. The peptide binding region (PBR) of HLA molecules is characterised by a pronounced amino acid (AA) polymorphism while the AA side-chains of the PBR form six specificity pockets, designated A-F, to which distinct AA positions of the bound peptide can be assigned. The AA polymorphisms of the PBR determine the features and conformation of bound peptides. Alloreactive T-cell responses between HLA class I subtypes have been observed due to the presentation of different sets of self-peptides.

Since few data were available about peptide binding specificities of the HLA-A*66 group as a part of the serological A10 crossreactive family, in this thesis peptides from truncated recombinant A*6602 and A*6603 molecules were sequenced and their features were compared with data reported for peptides presented in the A*6601 molecule.

The A*6602 allele differs from A*6601 by two AA exchanges at positions 90 (outer loop) and 163 (pocket A). A*6603 differs from both alleles by an exchange at position 70 (pockets A, B and C). There were no significant differences in the peptide motifs of A*6602 and A*6603, suggesting a minor importance for the exchange Q70H, with both AA having neutral side-chains. However, a striking difference at the auxiliary anchor P1 of peptides bound by A*6601 (polar / acidic AA: Asp, Glu) and A*6602/6603 (polar / neutral AA: Ser) which interacts with pocket A of the PBR was observed. Accordingly, this shift in the physico-chemical properties of the auxiliary anchor may be best explained by the polymorphism at AA position 163 in the HLA molecule, where Arg (hydrophilic, alkaline) in A*6601 has been replaced by Glu (hydrophilic, acidic) in A*6602/6603. This exchange results in a shift towards higher acidity in pocket A of A*6602/6603, apparently leading to the loss of preference for acidic auxiliary anchors and leading to the preference for the neutral AA Ser.

The similar peptide motifs of A*6602 and A*6603 suggest low allogenicity when these alleles are mismatched in stem cell transplantation; whereas differences in the peptide motif suggest the opposite for the mismatch A*6601 vs. A*6602/6603. This knowledge about allele-specific peptide motifs will contribute to the ranking of HLA subtype mismatches in the donor selection process, when no HLA-identical donor is available.

key words: HLA-A*66 / peptide motif / pocket A / allogenicity

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	4
1.1 Einführung	4
1.2 MHC- / HLA-Klasse I und -Klasse II Moleküle	5
1.3 Genetische Organisation des HLA-Komplexes	6
1.4 Struktur der HLA-Klasse I Moleküle und Peptidbindung	8
1.5 Funktion von HLA-Klasse I Molekülen	13
1.6 Peptidprozessierung und -präsentation	16
1.7 Epitopvorhersage	18
1.8 Die T-Zell-Antwort der CD8+ Lymphozyten	19
1.9 Die T-Zell-Antwort der CD4+ Lymphozyten	20
1.10 Klinische Bedeutung von HLA-Molekülen	20
1.11 Die HLA-A*66-Gruppe	22
2. MATERIAL	24
2.1 Chemikalien	24
2.2 Puffer und Lösungen	26
2.3 Verbrauchsmaterialien	27
2.4 Geräte	28
2.5 Antikörper	30
2.6 Software zur Datenverarbeitung und –auswertung	31
2.7 Organismen	32
2.7.1 Bakterien	32
2.7.2 Humane Zelllinien	32
2.8 Nukleinsäuren	32
2.8.1 DNA	32
2.8.2 Plasmide	33
2.8.3 Oligonukleotide	33
2.9 DNA-Längen- und Molekulargewichtsstandards	34
2.10 Enzyme	34
2.11 Kits	34
2.12 Kulturmedien	35
2.12.1 Medien für Bakterien	35
2.12.2 Medien für die Kultivierung von humanen Zelllinien	36
3. METHODEN	38
3.1 Amplifikation der schweren Kette von HLA-A*6602 und A*6603	38
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion	38
3.1.2 Nachweis der DNA-Fragmente aus der PCR mittels DNA-Gelelektrophorese	40
3.1.3 Klonierung von PCR-Produkten	41
3.1.4 Vektorligation	41
3.1.5 Transformation	42
3.1.6 Selektion und Expansion transformierter Bakterien	43
3.1.7 Isolierung von Plasmid DNA	43
3.1.8 Restriktionsanalyse	44
3.1.9 DNA-Sequenzierung	44
3.1.10 Sequenzierreaktion	45
3.1.11 Aufreinigung der Sequenzierprodukte	46
3.1.12 Automatische Auftrennung und Analyse der Sequenzierprodukte am ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	47
3.2 Herstellen von stabilen sHLA-produzierenden humanen Zell-Linien	47

3.2.1	Kultivierung humaner Zellen	47
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl unter Verwendung von Trypanblau	48
3.2.3	Kryokonservierung humaner Zellen	48
3.2.4	Bestimmung der letalen Geneticin-Konzentration	48
3.2.5	Endotoxin-freie Aufreinigung der Expressionsvektoren	49
3.2.6	Elektroporation von LCL 721.221-Zellen unter Verwendung des Multiporator	50
3.2.7	Transfektion von HEK293-Zellen unter Verwendung des <i>Fugene VI</i> -Transfektionsreagenz	50
3.2.8	<i>Limitind dilution Assay</i> HEK und LCL	50
3.2.9	Quantitativer Nachweis der sHLA-Moleküle im Zellkulturüberstand	51
3.3	<i>Large scale</i> Produktion und Isolierung von sHLA-Molekülen	53
3.3.1	3-D Kultivierung von LCL 721.221-Zellen	53
3.3.2	Rollerflaschenkultivierung von HEK293-Zellen	54
3.3.3	Aufbereitung der Zellkulturüberstände für die Affinitätschromatographie	54
3.3.4	Beladung der NHS-aktivierten <i>HiTrap</i> Säule mit einem Liganden	54
3.3.5	Aufreinigung der rekombinanten sHLA-Moleküle an immobilisiertem Antikörper	56
3.4	Elektrochemische Verfahren zur Analyse der sHLA-Moleküle	57
3.4.1	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	57
3.4.2	Western-Blot und Immundetektion der sHLA-Moleküle	58
3.4.3	Native isoelektrische Fokussierung	58
3.5	Sequenzierung und massenspektrometrische Charakterisierung der Liganden	59
3.5.1	Isolierung der Peptide aus den MHC-Molekülen	59
3.5.2	RP-HPLC-Trennung der Liganden	59
3.5.3	N-terminale Pool Sequenzierung	60
3.5.4	Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)	61

4. ERGEBNISSE **63**

4.1	Klonierung der sHLA-Moleküle	63
4.1.1	Amplifikation der A*6602- und A*6603-gDNA	63
4.1.2	Klonierung der PCR-Produkte	63
4.2	Herstellen von stabilen sHLA-produzierenden Zelllinien	64
4.2.1	Endotoxin-freie Aufreinigung der Expressionsvektoren	64
4.2.2	Bestimmung der letalen Geneticin-Konzentration für die LCL 721.221-Zellen	65
4.2.3	Elektroporation der LCL 721.221-Zellen	65
4.2.4	Bestimmung der letalen Geneticin-Konzentration für die HEK293-Zellen	65
4.2.5	<i>Fugene VI</i> -Transfektion der HEK293-Zellen	65
4.2.6	Etablierung eines Elisa zur quantitativen Analyse sHLA-produzierender Zellen	66
4.2.7	<i>Scale-up</i> der sHLA-Produktion	66
4.2.8	Produktion von tHLA_A6602_V5-Molekülen in der <i>Tecnomouse</i>	67
4.2.9	Kultivierung von HEK293 / tHLA_A6603_V5-Zellen in Zellkulturflaschen	67
4.3	Affinitätschromatographie zur Isolierung der sHLA-Moleküle aus dem Zellkulturüberstand	68
4.3.1	Messung der Kopplungseffizienz des mAk W6/32 an die NHS-aktivierte <i>HiTrap</i> Säule	68
4.3.2	Affinitätschromatographie unter Verwendung von NHS-aktivierten <i>HiTrap</i> Säulen	69
4.4	Analyse der sHLA-Moleküle nach Affinitätschromatographie	69
4.4.1	SDS-PAGE zur qualitativen Analyse der sHLA-Moleküle	70
4.4.2	Immunoblot zur qualitativen Analyse der sHLA-Moleküle	71

4.4.3	Sandwich-ELISA zur quantitativen Analyse der sHLA-Moleküle	73
4.4.4	Peptide-mass-fingerprint zur qualitativen Analyse der tHLA_A6603_V5-Moleküle	73
4.4.5	Isoelektrische Fokussierung zur qualitativen Analyse der tHLA_A6602_V5-Moleküle	74
4.5	Isolierung und Analyse der Peptide aus den sHLA-Molekülen	75
4.5.1	Denaturierung des trimeren sHLA-Komplexes	75
4.5.2	RP-Chromatographische Trennung des Peptid-Gemisches	75
4.5.3	Massenspektrometrische Auftrennung der Peptidfraktionen	76
4.5.4	Analyse des erhaltenen Peptid-Spektrums aus tHLA_A6602_V5-Molekülen	78
4.5.5	Analyse des erhaltenen Peptid-Spektrums aus tHLA_A6603_V5-Molekülen	79
4.5.6	Edman-Pool-Sequenzierung der Peptide	80
4.5.7	Ergebnisse der Edman-Pool-Sequenzierung der Peptide aus tHLA_A6602_V5-Molekülen-Molekülen	80
4.5.8	Ergebnisse der Edman-Pool-Sequenzierung der Peptide aus tHLA_A6603_V5-Molekülen	81
5.	DISKUSSION	82
	Einfluß von AS Unterschieden zwischen HLA-A*66-Varianten auf die Peptidbindungsregion	84
	HLA-A*66-Peptidbindungsmotive	85
	Klinische Anwendung	86
6.	LITERATURVERZEICHNIS	87
7.	ANHANG	97
7.1	Abkürzungen	97
7.2	Abkürzungen für Aminosäuren	99
7.3	Abkürzungen für Basen	100
7.4	Verzeichnis der Abbildungen	100
7.5	Verzeichnis der Tabellen	101
ERKLÄRUNG		102
LEBENS LAUF		103
VERÖFFENTLICHUNGEN		104

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die Aufgabe des Immunsystems von Menschen und höheren Wirbeltieren besteht darin, körperfremde Strukturen abzuwehren, eigene dagegen zu tolerieren. Primär gehört hierzu, den Organismus vor eindringenden Pathogenen (Bakterien, Viren, Pilze) zu schützen. Neben der Erkennung und Abwehr klassischer Infektionserreger erfolgt auch eine Immunreaktion bei Transplantationen von Gewebe eines Individuums auf ein anderes (genetisch nicht identisches); hierbei wird das Gewebe als fremd erkannt und zerstört.

Diese Immunantworten lassen sich prinzipiell aufgrund ihrer angeborenen bzw. erworbenen Mechanismen unterscheiden. Hierbei dient die angeborene Immunantwort der ersten Abwehr gegen viele allgemein vorkommende Mikroorganismen. Einige Krankheitserreger können aufgrund konservierter Strukturen spezifisch erkannt werden; dies bietet jedoch keinen gezielten Schutz gegen eine erneute Infektion.

Die adaptive Immunantwort hingegen basiert auf der klonalen Selektion von Lymphozyten, welche eine Vielzahl hochspezifischer Rezeptoren besitzen, die es dem Immunsystem ermöglichen, jedes beliebige fremde Antigen zu erkennen und sich in Form eines immunologischen Gedächtnisses spezifischer Antigene zu erinnern. Bei der adaptiven Immunantwort lassen sich zudem eine humorale und eine zelluläre Antwort unterscheiden. Die humorale Reaktion wird durch die von B-Lymphozyten sezernierten Antikörper und die Komplementkomponenten (Plasmaproteine) vermittelt und richtet sich gegen extrazelluläre Krankheitserreger und Toxine. Für die zelluläre Reaktion sind die T-Lymphozyten verantwortlich, die in der Lage sind, intrazelluläre Erreger aufzuspüren und zu bekämpfen und die bei der Aktivierung der B-Zell-Reaktion in Aktion zu treten.

Das Immunsystem besteht aus den immunologisch kompetenten Organen, den zentralen und peripheren lymphatischen Organen. Bei den zentralen lymphatischen Organen handelt es sich um das Knochenmark, den Ort der Bildung der lymphatischen und der myeloischen Vorläuferzellen, und den Thymus, in dem die T-Lymphozyten reifen. Die peripheren lymphatischen Organe sind neben den Lymphknoten die Milz und die lymphatischen Gewebe der Schleimhäute. Hier treffen die Lymphozyten auf die Antigene, gegen die eine Immunantwort eingeleitet werden kann.

Für eine erfolgreiche zelluläre Immunantwort ist die spezifische Erkennung eines Antigens durch T-Zellen notwendig; diese erkennen jedoch keine intakten Proteinantigene, sondern Peptide aus extra- bzw. intrazellulären Molekülen. Hierbei wird zwischen natürlichen Antigenen, welche z.B. bakteriellen oder viralen Ursprungs sein können und den

Transplantationsantigen unterschieden. Bei einer Organ-Transplantation wird das transplantierte Gewebe von den T-Zellen als „fremd“ erkannt (Empfänger-gegen-Transplantat-Reaktion), bei einer Knochenmarktransplantation (KMT) oder hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) wird das Empfänger-Gewebe als „fremd“ erkannt (Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion; GvHD: *graft versus host disease*). Haupthistokompatibilitäts- (Gewebe-Verträglichkeits-) Antigene (MHC = *major histocompatibility complex*) sind bisher ausschließlich bei Vertebraten nachgewiesen worden. MHC-Moleküle sind Rezeptoren, welche die Peptide aus dem intrazellulären Proteingemisch an der Zelloberfläche präsentieren (Rammensee et al., 1993). T-Zellen weisen eine Antigen-spezifität auf, welche vom MHC-Genotyp abhängig ist (Zinkernagel and Doherty, 1974). Dieses als MHC-Restriktion bezeichnete Grundprinzip innerhalb der adaptiven Immunabwehr stellt die Basis für die Fähigkeit des Abwehrsystems zur Unterscheidung zwischen Selbst (autolog) und Nicht-Selbst (allogen) dar.

1.2 MHC- / HLA-Klasse I und -Klasse II Moleküle

Die MHC-Moleküle werden beim Menschen als HLA-Antigene (*human leucocyte antigens*) bezeichnet, da diese erstmals als System von Alloantigenen auf humanen Leukozyten beschrieben wurden. HLA-Moleküle können in zwei Klassen unterteilt werden:

HLA-Klasse I Moleküle der Loci A, B und C werden auf der Mehrzahl der kernhaltigen Zellen exprimiert, unter anderem auf T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen, Langhans-Zellen und neutrophilen Granulozyten. Ausnahmen stellen z.B. neuronale Zellen des Gehirns, Spermien und Trophoblastzellen der Plazenta dar (Kuhlmann et al., 1986; Guillaudeux et al., 1995). Klinisch von Bedeutung ist darüber hinaus ihr Nachweis auf Thrombozyten, da hierdurch die Möglichkeit der Bildung lymphozytotoxischer Antikörper nach allogenen Thrombozytentransfusionen besteht. MHC-Klasse I Moleküle präsentieren kurze proteolytisch erzeugte Fragmente, endogene Peptide aus der zelleigenen Proteinsynthese (Selbstpeptide, Viruspeptide, Tumorpeptide). Der MHC-Klasse I Antigenpräsentationsweg existiert in allen Somazellen. MHC-Klasse I gebundene Liganden können von CD8⁺ T-Lymphozyten (cytotoxische T-Zellen, CTL) erkannt werden (Natarajan et al., 1999). Die T-Zell-Rezeptoren (TZR) erkennen nur körperfremde Antigene, denn bei der Reifung der T-Lymphozyten im Thymus findet eine Selektion der TZR statt. Die gegen eigene MHC-Moleküle mit sog. "Self"-Peptiden aus dem eigenen Körper reagierenden TZR werden eliminiert, die TZR, welche fremde Peptide erkennen, werden positiv selektioniert.

MHC-Klasse II Moleküle werden auf spezialisierten antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie z.B. B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Thymusepithelzellen

exprimiert. MHC-Klasse II Moleküle präsentieren kurze proteolytisch erzeugte Fragmente aus dem endozytotischen Kompartiment. Diese Liganden werden durch den exogenen Prozessierungsweg aufbereitet. Der MHC-Klasse II Antigenpräsentationsweg existiert nur in APCs. MHC-Klasse II gebundene Liganden können von CD4⁺ T-Lymphozyten (T-Helfer-Zellen) erkannt werden.

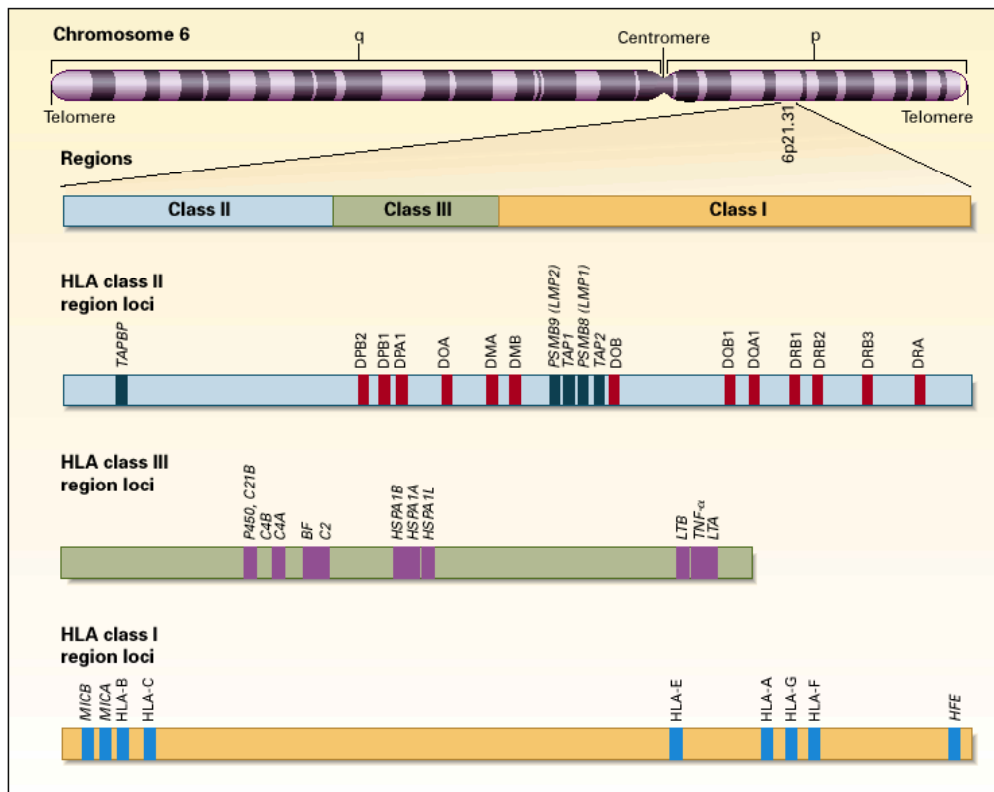
Grundlage für die große Variabilität der MHC-Moleküle und somit für ihre Peptidpräsentationsvielfalt sind zum einen ihre Polygenie, d.h. die Existenz mehrerer MHC-Klasse I und Klasse II Gene. Beim Menschen existieren für die schweren Ketten der Klasse I und der Klasse II MHCs folgende Gene: Klasse I: HLA-A, -B, -C; Klasse II: HLA-DR, -DP, -DQ. Diese Gene werden kodominant exprimiert.

1.3 Genetische Organisation des HLA-Komplexes

Die membranständigen MHC-I-Moleküle gehören zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie. Sie bestehen aus zwei Polypeptidketten, der schweren α -Kette (hc = heavy chain; MG 45 kDa) und der leichten Kette (β 2m = β 2 Mikroglobulin; MG 12 kDa), die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die schwere α -Kette wird vom HLA-Genort auf Chromosom 6 (6p21.3) kodiert (Abb. 1.1). Das Gen für die monomorphe leichte Kette, das β 2m wird beim Menschen außerhalb des HLA-Komplexes auf Chromosom 15 (15q21-q22.2) kodiert und setzt sich aus zwei Exons und einem Intron zusammen (Übersicht bei Cerundolo and Braud, 1996).

MHC-Gene zeichnen sich durch einen außergewöhnlich starken Polymorphismus aus, d.h. dass für jedes Gen multiple Allele existieren. Der Polymorphismus von HLA-Klasse I Genen, welche relevant für die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) sind, weist zum jetzigen Zeitpunkt (Nov. 2006) 489 Allele für den HLA-A Genort auf, 830 Allele für HLA-B sowie 266 Allele für HLA-C (<http://www.anthonynolan.com/HIG>).

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des humanen MHC-Komplexes



Schematische Darstellung des humanen MHC auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.31) und seine klassische Unterteilung in die Klassen I, II und III.

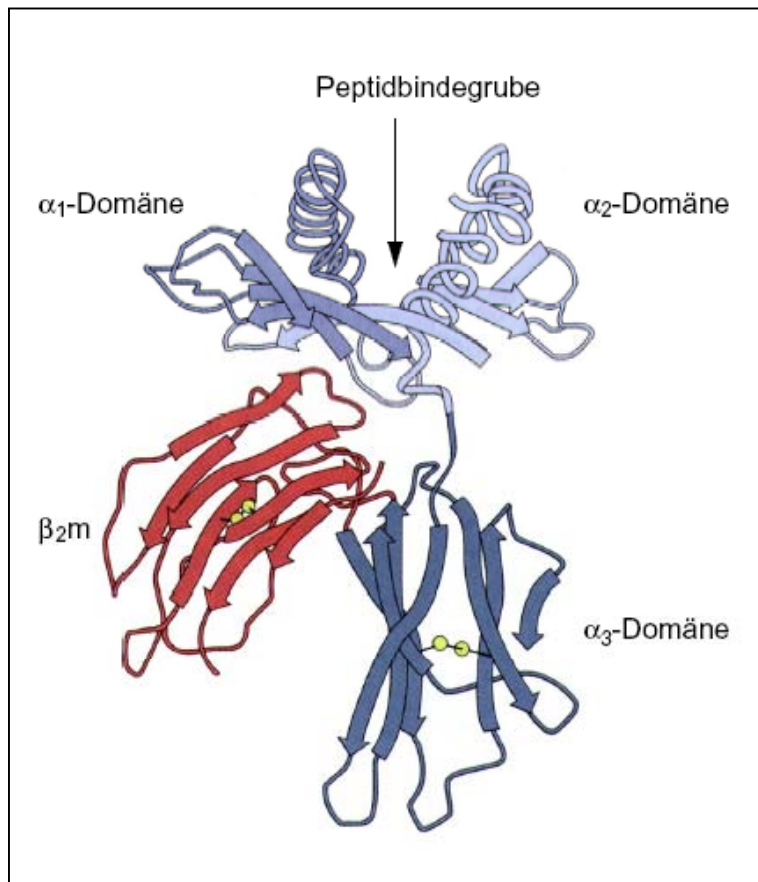
Innerhalb des HLA-Komplexes werden drei Bereiche unterschieden (Campbell and Trowsdale, 1993). Die HLA-Klasse I Region liegt auf der telomeren Seite von Chromosom 6 und beinhaltet neben den klassischen Ia Genorten HLA-A, -B und -C die Ib Genorte HLA-E, -F und -G. Diese Genorte exprimieren funktionell aktive Klasse I Moleküle, weisen aber im Vergleich zu den Ia Genorten, die die klassischen serologisch definierten Spezifitäten kodieren, einen weitaus geringeren Polymorphismus auf. Außerdem unterscheiden sich die Genprodukte der Ib Genorte sowohl in ihrer Gewebeverteilung als auch in ihrer Funktion von den HLA Klasse Ia Molekülen (Wei and Orr, 1990; Geraghty, 1993). HLA-E Moleküle werden auf ruhenden T-Lymphozyten exprimiert und präsentieren prozessierte Signalpeptide der Klasse Ia Antigene sowie des HLA-G Moleküls gegenüber CD94/NKG2 tragenden Natürlichen Killerzellen und CD8+ T-Lymphozyten und überwachen somit eine ausreichende Biosynthese und Expression der jeweiligen HLA Antigene (Lopez-Botet et al., 2000). HLA-G wird auf extravillösen Trophoblastzellen präsentiert und spielt für die Toleranz des Immunsystems der Schwangeren gegenüber dem Fetus eine entscheidende Rolle, während die Bedeutung von HLA-F noch nicht abschließend geklärt ist (Trowsdale, 1996; O'Callaghan and Bell, 1998).

Die HLA-Klasse II Region liegt auf dem zentromeren Abschnitt des humanen MHC-Komplexes und konnte durch molekulargenetische Analysen in mehrere Subregionen unterteilt werden. In den HLA-DP, -DQ und -DR Regionen sind verschiedene α - und β -Kettenantigene kodiert, deren Genprodukte in Form von $\alpha\beta$ -Heterodimeren auf APCs exprimiert werden. Innerhalb der Klasse II Region konnten weitere Gene identifiziert werden, welche in der Antigenprozessierung eine wichtige Rolle spielen. Hierzu zählen vor allem die *transporter associated with antigen processing-* (TAP) und *large multicatalytic proteasome-* (LMP) Gene. LMP2 und LMP7 kodieren Komponenten des Proteasoms, wohingegen das Genprodukt von TAP1 und TAP2 ein heterodimeres Molekül darstellt, welches für den Transport von prozessierten Antigenen von Bedeutung ist (Kelly et al., 1991 und 1992).

Zwischen der Klasse I und Klasse II Region liegt die Klasse III Region, deren Gene für funktionell sehr heterogene Nicht-HLA Proteine wie z.B. Komplementfaktoren (C2, C3, C4A, C4B, Faktor B), Tumornekrosefaktoren (TNF- α , TNF- β), Stoffwechsellzyme (P450c21A, P450c21B), Steroid-21-hydroxylasen oder auch das Hitzeschockprotein HSP70 kodieren (Übersicht bei Aguado et al., 1996).

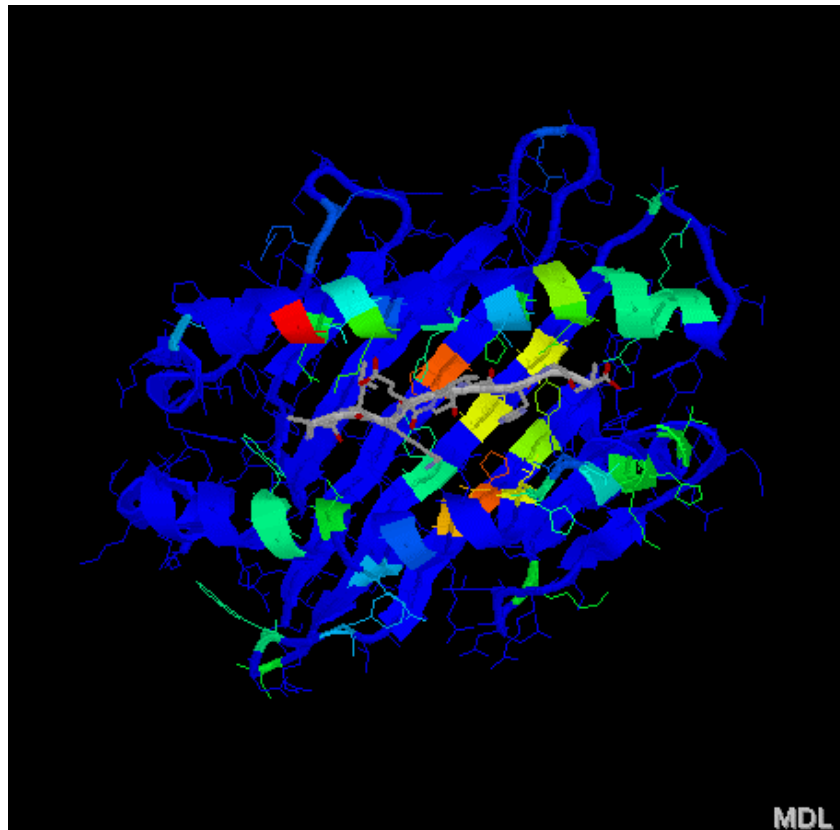
1.4 Struktur der HLA-Klasse I Moleküle und Peptidbindung

HLA-Klasse I Gene haben in etwa eine Gesamtlänge von 3.500 Basenpaaren und bestehen aus sieben (HLA-B) bzw. acht (HLA-A und HLA-C) Exons, die durch nicht-kodierende Abschnitte (Introns) voneinander getrennt sind. Exon 1 kodiert den kurzen 5'-untranslatierten Teil sowie das Signalpeptid, das nach dem Eintritt ins endoplasmatische Retikulum (ER) abgespalten wird und für die Lokalisation des Moleküls an der Zelloberfläche von entscheidender Bedeutung ist. Exon 2, 3 und 4 kodieren die drei extrazellulären Domänen $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ (Abb. 1.1), Exon 5 die hydrophobe Transmembranregion und Exon 6 und 7 (HLA-B) bzw. Exon 6 bis 8 (HLA-A und -C) den zytoplasmatischen Anteil. Daran schließt sich die 3'-untranslatierte Region an (Blasczyk, 1998).

Abbildung 1.2: Struktur eines MHC-Klasse I Moleküls

Schematische Darstellung eines MHC-Klasse I Moleküls (Kuby, 1997).

Die Peptidbindungsregion (PBR) liegt auf dem N-terminalen Teil der glykosylierten α -Kette, welche aus drei extrazellulär liegenden Domänen, einer Transmembranregion und einem zytosolischen Anteil besteht. Die N-terminal, extrazellulär gelegenen Domänen α_1 , α_2 und α_3 bestehen aus jeweils 90, 92 und 92 Aminosäuren (AS) (Orr et al., 1979). Dabei bilden die α_1 - und α_2 -Domänen eine Grube, die seitlich von zwei parallelen α -Helices begrenzt wird, welche die Wände der PBR bilden. Der Boden der Grube wird durch eine β -Faltblatt-Struktur aus acht Strängen gebildet. In dieser $25\text{\AA} \times 10\text{\AA} \times 11\text{\AA}$ großen grubenartigen Vertiefung können Peptidliganden (Antigene) mit einer Länge von meistens acht bis zwölf AS gebunden werden (Bjorkman et al., 1987 und 1990). Im Bereich der PBR liegen ebenfalls die hypervariablen Regionen, die sich durch polymorphe AS Positionen auszeichnen und durch ihre Sequenzvariabilität den allelischen Polymorphismus der HLA-Klasse I Moleküle im Wesentlichen ausmachen (Abb.1.3). Durch ihre Lage haben sie außerdem einen maßgeblichen Einfluss auf die Antigenpräsentation.

Abbildung 1.3: Darstellung der hypervariablen Bereiche der PBR im HLA-Molekül

VARIABILITÄT



Computersimulation eines HLA-A*0201 Molekül-Peptid-Komplex. Farblich gekennzeichnet sind die hypervariablen Regionen im HLA-Molekül, welche maßgeblich die Ligandenspezifität beeinflussen. (http://immunax.dfc.harvard.edu/Tools/hla_seqanal.html).

Auf die Peptidbindungsregion folgt extrazellulär die Ig-ähnliche $\alpha 3$ -Domäne. Sie ist konserviert, da sie die Bindungsstelle für den CD8-Korezeptor und auch die Hauptbindungsstelle für $\beta 2m$ enthält (Bjorkman et al., 1987 a; Salter et al., 1990), mit welchem eine nicht-kovalente Assoziation eingegangen wird (Solheim and Thorsby, 1974). $\beta 2m$ hat Kontakt mit allen drei Domänen der schweren Kette von HLA-Klasse I Molekülen (Tysoe-Calnon et al., 1991). Zusammen dienen sie der Abstützung der von den $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen gebildeten Plattformstruktur (Güssow et al., 1987) und sind gleichzeitig, zusammen mit der Bindung des zu präsentierenden Peptidliganden, eine notwendige Voraussetzung für die Expression an der Zelloberfläche.

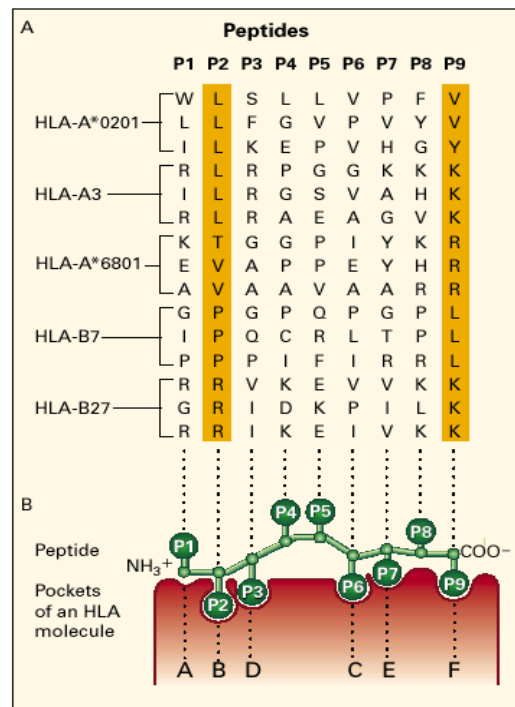
Die nun folgende transmembranöse Region von HLA-Klasse I Molekülen, die durch die in diesem Bereich α -helicale Kette gebildet wird, weist eine Länge von 39-40 AS auf und stellt

das Verbindungsglied zwischen dem extrazellulären und dem 29-32 AS umfassenden zytosolischen Anteil dar (Strachan et al., 1984; Ways et al., 1985; Güssow et al., 1987) (Abb. 1.2).

Die Peptidliganden werden in der PBR im HLA-Molekül über „komplementäre“ nicht-kovalente Wechselwirkungen (van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen) gebunden. Hierbei werden die Kontakte zwischen Atomen der Hauptkette des Peptids und definierten AS Positionen in der Peptid-bindenden Furche hergestellt. Zudem wird die Peptidbindung bei HLA-Klasse-I-Molekülen über die Interaktion des freien Amino- und Carboxylendes des Peptids mit den invarianten Bereichen der Peptidbindungsfurche stabilisiert (Bouvier et al., 1994).

Bereiche der Peptidbindungsgrube bilden 6 Peptidbindungstaschen („*specificity pockets*“), diese werden mit A-F (Abb. 1.4) bezeichnet und binden mehr oder weniger restringierte AS-Seitenketten des Peptids (Ankerpositionen). Hauptanker des gebundenen Peptides sind die AS Positionen P2 und P9, welche mit den *specificity pockets* B und F interagieren und der Verankerung des Peptides im HLA Molekül dienen. Diese Anker Positionen bestimmen eine selektive Peptidbindung der verschiedenen HLA-Klasse I Moleküle. Entscheidend dafür, welche Peptide an ein bestimmtes HLA Allel binden, sind die hochpolymorphen Bereiche, die in der Bindungsfurche der HLA-Moleküle zu finden sind (Saper et al., 1991). Peptide, die an eine bestimmte allelische HLA-Variante binden, haben an diesen Aminosäurepositionen identische bzw. ähnliche Reste. Die Bindungsumgebung beeinflusst die bevorzugte Orientierung der Peptide; der N-Terminus bindet in Tasche A, der C-Terminus in Tasche F. Es sind sowohl konservierte Aminosäurereste wie auch polymorphe Aminosäuren an der Ligandenbindung beteiligt. Die AS Positionen des gebundenen Peptides mit etwas größerer Flexibilität sind P1, P3, P5 und P7, welche durch die *specificity pockets* A, D, C und E gebunden werden. Die gebundenen Peptide nehmen eine gestreckte Konformation in der PBR ein.

Abbildung 1.4: Darstellung der Pockets



Schematische Darstellung der *specificity pockets* und den korrespondierenden AS Positionen des gebundenen Peptides unter Berücksichtigung von allelspezifischer Peptidselektivität. (J. Klein, 2000).

Durch N-terminale Pool-Sequenzierungen (Edman Abbau des gesamten Peptidpools einer definierten allelischen Variante) bzw. massenspektrometrische Sequenzanalysen eluierter Einzel-Peptide können Sequenzübereinstimmungen in bestimmten Positionen der Peptide detektiert werden (Röttschke et al., 1990; Stevanovic und Jung, 1993). Durch die begrenzte Auswahl möglicher Peptide, die zur Bindung und Stabilisierung eines bestimmten HLA-Allels befähigt sind, kann für dieses ein so genanntes „Peptidmotiv“ beschrieben werden. Dieses definiert die Anforderungen, die an ein Peptid für die Bindung an ein bestimmtes HLA-Allel gestellt werden (Falk et al., 1991). Konservierte AS Positionen im Peptid werden als Anker (*anchor positions*) bzw. als Hilfsanker (*auxiliary anchors*) bezeichnet. Die Anker werden definiert durch ein Vorkommen von 100 % aller vorhandenen Aminosäuren an einer spezifischen Position im Peptid; Hilfsanker Positionen weisen eine Häufigkeit von mindestens 50 % einer Aminosäure an dieser spezifischen Position auf (Falk et al., 1991). Zur Ermittlung der Feinspezifität von HLA Molekülen müssen zudem möglichst viele einzelne Liganden identifiziert werden, damit bevorzugte Aminosäuren in Nicht-Ankerpositionen, die bei einer Poolsequenzierung nicht sichtbar werden, mit in das Peptidmotiv eingearbeitet werden können.

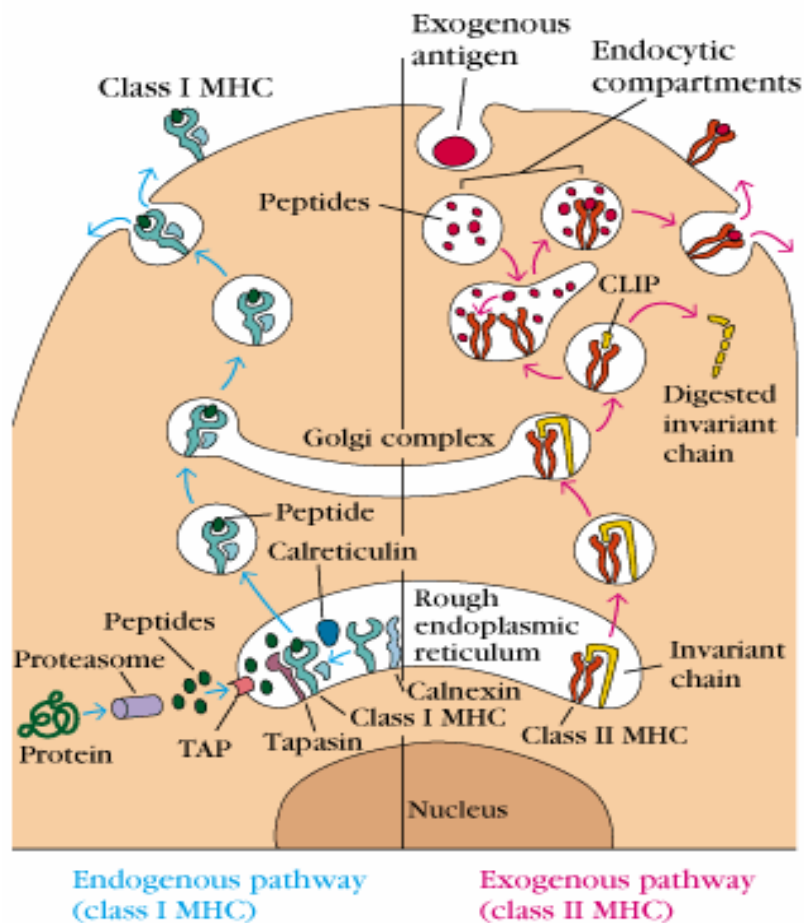
Einige Seitenketten des Peptids ragen nach oben und dienen der Wechselwirkung mit dem spezifischen Rezeptor der T-Zelle. Der TZR erkennt den trimeren HLA-Peptid- β 2m-Komplex durch Bindung an die Oberfläche, die von exponierten Resten des gebundenen Peptids und den zugänglichen Elementen der beiden α -Helices gebildet wird (Garboczi et al., 1996; Garcia et al., 1996).

1.5 Funktion von HLA-Klasse I Molekülen

Die Funktion der HLA-Moleküle besteht darin, eigene und fremde Peptidliganden für die Erkennung durch T-Lymphozyten auf Zelloberflächen zu präsentieren. Dabei ist eine erfolgreiche Präsentation der Peptidfragmente und die daraus resultierende Antigenerkennung durch den TZR nur durch den stabilen Komplex möglich, der aus der dreidimensionalen Struktur des HLA-Moleküls und der festen Bindung des zu präsentierenden Antigens gebildet wird. Dieses allgemeine Erkennungsmuster im Immunsystem (HLA-Restriktion) wurde erstmals von Zinkernagel und Doherty 1974 beschrieben.

Durch HLA-Klasse I Moleküle werden Peptidliganden aus zytosolischen Proteinen präsentiert, bei denen es sich sowohl um Selbst- als auch um virale oder tumorassoziierte Proteine handeln kann. Die Prozessierung dieser Peptide beginnt mit ihrem Abbau durch das Proteasom und zytosolische Proteasen (Stoltze et al., 1998; van Endert, 1999). Der Proteasomkomplex zeigt bei der Fragmentbildung eine Präferenz für Peptide mit einer Länge von acht bis zwölf Aminosäuren (Ehring et al., 1996; Kisselev et al., 1998; Wenzel et al., 1994), was in guter Übereinstimmung mit den Bindungsmotiven der PBR der HLA-Klasse I Moleküle steht. Im nächsten Schritt werden die vom Proteasom generierten Peptide unter Beteiligung des TAP1/TAP2-Heterodimers ins ER transloziert (Momburg and Hammerling, 1998; Trowsdale et al., 1990; Shepherd et al., 1993), wo die Assoziation der Proteinfragmente mit *de novo* synthetisierten HLA-Klasse I und β 2m-Molekülen erfolgt. Proteine wie Calnexin, Calreticulin und Tapasin stabilisieren hierbei das HLA Klasse I Molekül während seiner Faltung und spielen bei der Peptidbeladung eine wichtige Rolle (Hammond and Helenius, 1995; Sadasivan et al., 1996). Abschließend wird das heterotrimere Molekül durch den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert (s. Kap. 1.6; Abb. 1.5).

Abbildung 1.5: Prozessierung von Peptiden



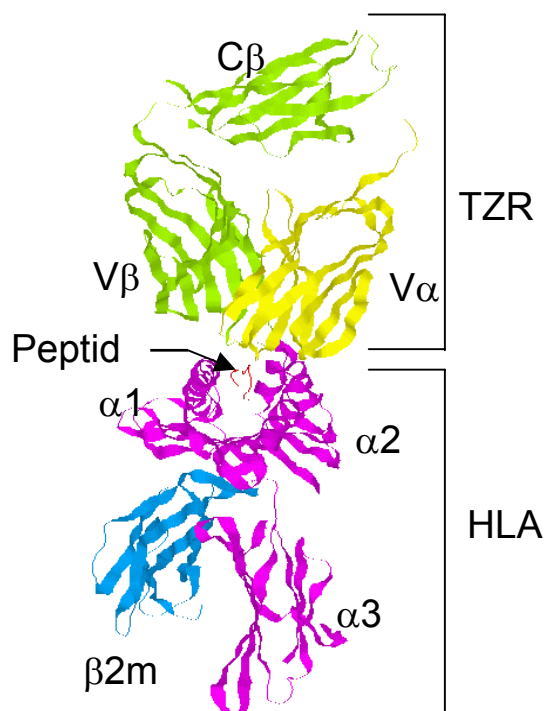
Prozessierung von endogenen und exogenen Proteinen und Beladung der MHC-Klasse I und -Klasse II Moleküle mit den Peptidliganden. „Antigen Processing Pathways“.

Die von HLA-Klasse I Molekülen präsentierten Antigene werden von den TZR der CTLs erkannt (Abb. 1.6) (Garboczi et al., 1996), wobei die $\alpha 3$ -Domäne des HLA-Klasse I Moleküls die Bindungsregion für das CD8 Molekül enthält (Salter et al., 1989).

Jeder CD8+ T-Lymphozyt erkennt ein Antigen nur in Verbindung mit dem präsentierenden HLA-Klasse I Molekül und besitzt dafür jeweils mehrere Kopien eines TZR, der für einen bestimmten HLA-Klasse I Molekül-Antigen-Komplex spezifisch ist. Somit unterscheiden CD8+ T-Lymphozyten auch zwischen autologen und allogenen MHC-Molekülen, was z.B. bei der Abstoßungsreaktion nach Gewebetransplantationen eine Rolle spielt. Nach Bindung der CTL erfolgt dann die Zerstörung der Zielzelle über die Freisetzung von Zytotoxinen wie Perforin, Granzymen oder den Fas-Liganden (Shiver et al., 1992; Suda et al., 1993).

HLA-Klasse I Molekül-Antigen-Komplexe fungieren ebenfalls als Liganden für inhibierende Rezeptoren auf natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), was jedoch im Gegensatz zur Bindung an CTL zu einer Hemmung der zytotoxischen Funktion der NK-Zellen führt.

Abbildung 1.6: HLA-Klasse I Molekül mit gebundenem T-Zellrezeptor



Computersimulation eines röntgenkristallographischen Bildes eines HLA-Klasse I Moleküls mit Peptidligand und gebundenem T-Zellrezeptor (TZR); vom T-Zellrezeptor sind die variablen Regionen der α - und β -Kette ($V\alpha$ und $V\beta$) und die konstante Region der β -Kette ($C\beta$) dargestellt (Computersimulation beruhend auf den röntgenkristallographischen Daten von Garboczi et al., 1996; Abbildung aus Elsner et al. 2005).

1.6 Peptidprozessierung und -präsentation

Bei der Präsentation endogener Peptide wird der anabole Stoffwechselweg, die Biosynthese der HLA-Klasse I Moleküle, mit einem katabolen Prozess, dem Proteinabbau zu Peptidliganden verknüpft. Hierzu werden intrazelluläre Proteine aus allen Kompartimenten, wie zum Beispiel zytosolischen, nukleären, mitochondrialen und sekretorischen Molekülen, zunächst durch das Proteasom, einem zytosolischen Proteasekomplex und zytosolischer Proteasen (Stoltze et al., 1998; van Endert, 1999) in Peptidfragmente von acht bis zwölf AS geschnitten.

Das Proteasom ist ein multikatalytischer tonnenförmiger Komplex. Die Kernkomponente, das 20S-Proteasom, besteht aus 28 Untereinheiten, welche sich in α - und β -Typen unterscheiden lassen. Diese Untereinheiten sind in vier Ringen mit je sieben Untereinheiten angeordnet ($\alpha 7$ - $\beta 7$ - $\beta 7$ - $\alpha 7$) und so miteinander verbunden, dass sie drei große Hohlräume im Proteasom bilden. Der zentrale Hohlraum wird nur von β -Untereinheiten gebildet und beherbergt die katalytischen Bereiche auf je drei Untereinheiten jedes β -Rings. Diese katalytisch aktiven β -Untereinheiten sind verantwortlich für drei verschiedene proteolytische Aktivitäten: $\beta 5$ zeigt eine chymotrypsinartige Aktivität (hydrophobe Reste in Position 1), $\beta 2$ ist verantwortlich für die trypsinartige Aktivität (basische Reste in Position 1) und $\beta 1$ für die proteolytische Aktivität bei sauren Resten in Position 1. Diese katalytischen Aktivitäten werden jedoch durch IFN- γ -Induktion durch die drei Untereinheiten $\beta 1i$ (MECL1), $\beta 2i$ (LMP2; Low-molecular-weight protein 2) und $\beta 5i$ (LMP7) ersetzt, von denen die letzten beiden in der MHC-Region codiert sind. Das gebildete Proteasom wird als Immunproteasom bezeichnet (Tanaka et al., 1998). Zudem induziert IFN- γ die Bildung des PA28-Aktivierungskomplexes. Die Ausbildung des Immunproteasoms und die Bildung des PA28-Aktivators führen zu einer Verbesserung der quantitativen und qualitativen Fähigkeit des Proteasoms bei der Peptidgenerierung (Dick et al., 1996; Groettrup et al., 1996). Der Proteasomkomplex bildet Fragmente mit einer Längenverteilung, die einer Gaußverteilung entspricht, jedoch zeigt sich eine Präferenz für Peptide mit acht bis elf AS (Ehring et al., 1996; Kisselev et al., 1998; Wenzel et al., 1994), welches in guter Übereinstimmung mit den Bindungsmotiven der HLA Klasse I Moleküle steht.

Aus dem Zytosol werden die vom Proteasom generierten Peptide dann von ATP-abhängigen *Transporter-associated-with-Antigen-Processing* (TAP) Proteinen in das ER transportiert.

TAP besteht aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2; es wählt für den Transport Peptide definierter Länge und AS Sequenz aus. (Trowsdale et al., 1990; Shepherd et al., 1993; Momburg, 1998). Vom TAP bevorzugte AS befinden sich am C-Terminus und an den drei letzten Positionen des N-Terminus (P1: K, N, R; P2: R; P3: W, Y). Es scheint, dass die für die Bindung am TAP relevanten AS den der Ankeraminosäuren vieler HLA-Klasse I Moleküle

entsprechen. In jedem Fall aber stimmt die Präferenz für den C-Terminus der Peptide beim humanen TAP und HLA-Klasse I Molekülen gut überein, denn die AS F, L, R, T und V, welche vom humanen TAP bevorzugt werden, decken sich mit einem Großteil der AS Reste, die bei HLA-Klasse I Molekülen als Ankeramino­säuren am C-Terminus beschrieben wurden (Rammensee et al., 1995). Hingegen scheinen die AS in Position 5 bis 8 keiner Selektion durch den TAP zu unterliegen. Diese AS sind von großer Bedeutung bei der T-Zell-Erkennung und müssen daher eine große Vielfalt zeigen. Neben positiver Selektion erscheint bei der TAP-Bindung auch eine negative Selektion, bei der z.B. P in Position 2 und saure Aminosäuren (D, E) in Position 1 des Peptids eine Bindung an das TAP-Molekül fast vollständig verhindern. Dieses Phänomen wirft die Frage auf, wie HLA-Klasse I Allele mit D und E als Anker in Position 1 (z.B. HLA-A*2601) mit Peptiden versorgt werden. Da der Transport längerer Peptide als der an HLA-Klasse I bindenden durch den TAP möglich ist, scheint das N-terminale *Trimmen* der transportierten Peptide in diesem Fall eine Schlüsselrolle zu spielen (Uebel et al., 1997). Verschiedene zytosolische Proteasen wurden bereits beschrieben, wie z.B. die Leucin-Aminopeptidase (LAP) (Beninga et al., 1998), die Tripeptidylpeptidase (TPPII) (Geier et al., 1999), die Bleomycin-Hydrolase (BH) und eine Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSH) (Stoltze et al., 2000). Die in diesem Fall für das *Trimmen* relevanten Aminopeptidasen müssen jedoch ER-resident sein (Falk et al., 1990). Eine ER-residente Aminopeptidase, die so genannte ERAAP1, wurde beschrieben (York et al., 2002; Saric et al., 2002; Serwold et al., 2002).

Nach dem Transport der Peptide durch den TAP-Peptidtransporter ins ER, wo sie mit HLA-Klasse I Molekülen assoziieren und diese stabilisieren, werden die HLA-Klasse I Moleküle im Verlauf ihrer Reifung von verschiedenen Helfermolekülen (Chaperonen) begleitet, die die korrekte Molekülfaltung sowie die Bindung der Peptide unterstützen. Nach erfolgreicher Peptidbeladung verlassen HLA-Klasse I Moleküle das ER und werden an der Zelloberfläche präsentiert (Abb. 1.5).

1.7 Epitopvorhersage

Beim Vorliegen eines verlässlichen Peptidbindungsmotivs kann aus Proteinen, deren Aminosäuresequenz bekannt ist, eine Vorhersage der proteasomalen Prozessierung und daraus folgend eine Bindungsvorhersage für mögliche peptidische Liganden für ein definiertes HLA Molekül gemacht werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Bindungsfurche eines HLA-Moleküls im Normalfall von neun AS besetzt wird. Längere HLA-Klasse I Liganden nehmen in dieser Bindungsfurche eine gebogene oder nach außen gewölbte Konformation ein. Die mit dem HLA-Molekül in Kontakt tretenden AS bzw. die, die sich aus der Furche herauswölben, können dabei je nach HLA-Allel unterschiedlich sein.

Für die Epitopvorhersage sind verschiedene Systeme frei im Internet verfügbar (Tab. 1.1).

Das älteste dieser Programme ist die NIH-Epitopvorhersage, die nach den Experimenten von Parker et al. (1994) auf der Basis von synthetischen Peptiden entwickelt wurde. Eine Vorhersage, bei der die Beurteilung des Bindungsverhaltens von Peptiden ausschließlich auf Informationen von natürlichen Liganden basiert, wurde 1999 entwickelt und heißt SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999). Diese beiden Systeme beruhen auf der Annahme, dass alle Aminosäuren eines Liganden einen größeren oder kleineren Beitrag zur Stabilität des MHC-Komplexes leisten. Über eine Matrix wird jeder Aminosäure ein Wert, gemäß ihrem Stabilitätsbeitrag, zugeordnet. Für einen potentiellen Ligandenkandidaten werden die Werte aus der Matrix addiert. Der resultierende Wert spiegelt schließlich die Wahrscheinlichkeit der Bindung des Peptids an das gewählte HLA-Allel wieder.

Neuere Methoden, wie z. B. MHCpred, verwenden zur Epitopvorhersage keine empirischen Daten, hier werden die Liganden mittels *quantitative activity relationship regression* (QSAR) (Guan et al., 2003) vorhergesagt.

Einige Programme bieten zudem die Möglichkeit, zwischen *hidden Markov models* und *artificial neural networks* zu wählen, wie z. B. Multipred (Brusic et al., 2002, Srinivasan et al., 2004), NetMHC (Buus et al., 2003), nHLAPred (Raghava). Diese Algorithmen sind weitaus präziser als die oben genannten Matrix Berechnungen, benötigen jedoch eine sehr große Datenmenge (Yu et al., 2002), das heißt Bindungsdaten natürlicher eluierter Liganden, welche für viele HLA-Allele nicht zur Verfügung stehen.

Tabelle 1.1: MHC-Epitop-Vorhersagen im Internet

BIMAS	http://www-bimas.dcrn.nih.gov/molbio/hla_bind/
SYFPEITHI	http://www.syfpeithi.de
RANKPEP	http://www.mifoundation.org/Tools/rankpep.html
ProPred-I	http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/index.html
HLA Ligand/Motif Database	http://hlaligand.ouhsc.edu
SVMHC prediction page	http://www.sbc.su.se/svmhc/new.cgi
MHCPred	http://www.jenner.ac.uk/MHCPred/
Multipred	http://research.i2r.a-star.edu.sg/multipred/
NetMHC	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/
nHLAPred	http://www.imtech.res.in/raghava/nhlapred/

1.8 Die T-Zell-Antwort der CD8+ Lymphozyten

Eine normale Zelle präsentiert etwa 10^4 verschiedene Peptide in ihren 10^5 bis 10^6 HLA-Klasse I Molekülen. Die Kopienanzahl eines Peptids pro Zelle liegt dabei im Bereich von einer Kopie bis zu 10.000 Kopien. Dabei werden im Idealfall alle präsentierten Selbstpeptide vom Immunsystem toleriert, da die für die Erkennung zuständigen CD8+ T-Lymphozyten aufgrund einer negativen Selektion während ihrer Entwicklung im Thymus oder später durch periphere Mechanismen inaktiviert werden. Werden hingegen Fremdpeptide, z.B. virale Peptide präsentiert, so werden diese in Verbindung mit HLA Klasse I Molekülen vom TZR der CD8+ T-Lymphozyten erkannt. Allerdings muss erwähnt werden, dass die Grenze zwischen „selbst“ und „fremd“ während der Erkennung durch T-Lymphozyten nicht klar definiert ist. So können z.B. CD8+ T-Lymphozyten stimuliert werden, gegen Selbstpeptide zu reagieren, die auf normalen Zellen nur in kleinen Mengen präsentiert werden. Auch können CTLs gegen Tumorzellen aktiviert werden, die Selbstpeptide in einer größeren Dichte als normale Zellen exprimieren (Kawakami et al., 1996). Weitere Ziele von tumorzerstörenden CTLs könnten möglicherweise Oncogen-Produkte, Tumor-Suppressor-Genprodukte, mutierte normale Proteine und ungewöhnlich exprimierte Proteine sein.

Die Immunantwort durch die CD8+ T-Lymphozyten benötigt neben der Wechselwirkung zwischen dem TZR und dem HLA-Peptidkomplex auf der Zielzelle gleichzeitig Signale kostimulatorischer Moleküle, insbesondere durch den Kontakt von CD80 und CD86 auf einer APC mit CD28 auf der T-Zelle. Die Zerstörung der von den CTLs erkannten Zelle erfolgt über die Freisetzung von Zytotoxinen wie Perforin und Granzymen und auch über den Fas-Liganden. Perforin bildet hierbei durch Polymerisation Löcher in der Membran der Zielzelle,

während Granzyme, eine Gruppe von Serinproteasen, im Zytosol der Zielzelle eine Apoptose auslösende Signalkaskade starten (Shiver et al., 1992). Die Induktion der Apoptose kann ebenfalls durch die Bindung von Fas-Ligand an Fas auf der Zielzelle erfolgen (Suda et al., 1993; Fisher et al., 1995).

1.9 Die T-Zell-Antwort der CD4+ Lymphozyten

Die T-Lymphozyten, die HLA-Klasse II gebundene Peptide erkennen, gehören zur Subpopulation der CD4+ T-Lymphozyten (T-Helfer-Zellen). Erkennt eine CD4+ T-Zelle ein fremdes HLA-Klasse II präsentierte Peptid auf einer professionellen APC (z.B. Makrophagen, dendritische Zellen) und existiert gleichzeitig ein Stresssignal, wird die T-Zelle dazu angeregt Zytokine zu produzieren. Die CD4+ T-Lymphozyten werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Zytokinproduktion in zwei Subgruppen eingeteilt: T-Helfer-1 Zellen (Th1), die als typisches Zytokin Interferon γ (IFN- γ) produzieren und T-Helfer-2 Zellen (Th2), die als Hauptzytokin Interleukin 4 (IL-4) produzieren. Th1-Zellen sind in der Lage, extrazelluläre Parasiten, wie z.B. Leishmania, durch Produktion verschiedener Zytokine und durch Aktivierung von Makrophagen über CD40-Ligand, zu bekämpfen und CTLs zu stimulieren. Th2-Zellen wirken vor allem als Regulator in der humoralen Immunität.

Neben den Th1- und Th2-Zellen existiert eine weitere Subpopulation der CD4+ T-Lymphozyten, die regulatorischen T-Zellen (Treg). Sie zeichnen sich durch eine konstitutive Expression von CD25 aus und regulieren T-Zellantworten.

1.10 Klinische Bedeutung von HLA-Molekülen

Die größte klinische Relevanz der HLA-Moleküle liegt in ihrem Polymorphismus und damit verbunden in ihrer zentralen Rolle bei Abstoßungsreaktionen nach Organ- und Stammzelltransplantationen. Von besonderem Interesse sind sie in der Medizin auch, weil für eine Reihe von HLA-Antigenen eine Assoziation zu bestimmten Krankheiten nachgewiesen ist. Außerdem sind sie bei der Durchführung antigenspezifischer Immuntherapien sowie bei verschiedenen angeborenen oder erworbenen Immundefekten von Bedeutung.

Bei der direkten Fremderkennung nach Transplantation solider Organe reagieren alloreaktive CD4+ oder CD8+ T-Lymphozyten des Rezipienten direkt mit den Allo-MHC-Molekülen des Donorgewebes. Dabei tragen sowohl die präsentierten Peptidliganden als auch AS Polymorphismen der HLA-Moleküle zur Fremderkennung bei (Heath et al., 1991; Bluestone

et al., 1993; Herman et al., 1999; Kranz, 2000; Rudolph et al., 2001). Bei der indirekten Fremderkennung werden Peptidfragmente von Allo-HLA-Molekülen des Donors auf APCs des Rezipienten präsentiert (Benichou, 1999). Diese als Minor Histokompatibilitätsantigene (mHags) bezeichneten Peptidfragmente können unter Vermittlung von HLA-Klasse I Molekülen alloreaktive T-Lymphozyten stimulieren, wodurch erklärt wird, dass es bei Transplantationen trotz HLA-Identität in der Regel zur Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten kommt (Goulmy, 1997; Simpson et al., 2001).

Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen (HSCT) stellt eine potenziell kurative Therapieform für eine Reihe von hämatologischen und nicht-hämatologischen Systemerkrankungen dar. Bei der HSCT kann eine Graft-versus-host Erkrankung (GvHD) auftreten, bei der durch die Transplantation immunkompetenter T-Lymphozyten in einen immunsupprimierten Organismus Allo-HLA-Merkmale im Empfängergewebe erkannt werden und es dadurch im Folgenden zu einer Zerstörung von Organen kommt. Neben einer Zerstörung von gesundem Gewebe kann eine immunologisch vermittelte Anti-Leukämie-Reaktion (Graft versus Leukämie, GvL) ausgelöst werden, die die Rezidivraten bei Leukämiepatienten deutlich verringert und somit eine gewünschte Reaktion bei der allogenen Stammzelltransplantation darstellt (Weiden et al., 1981; Kolb et al., 1990). Aufgrund dieser Mechanismen ist das Abgleichen der HLA-Merkmale von Donor und Rezipient (Matching), insbesondere bei den HLA-Klasse I Genen HLA-A, -B und -C sowie bei den HLA-Klasse II Genen DRB1 und DQB1, für die Prognose von Patienten, die eine Stammzelltransplantation erhalten sollen, von entscheidender Bedeutung (Ottinger et al., 2001).

Für die Durchführung antigenspezifischer Immuntherapien, wie sie bei einigen Tumoren, Infektionen oder Autoimmunerkrankheiten versucht werden, ist die HLA-Typisierung der Patienten eine Grundvoraussetzung. Bei diesen Therapieformen wird erprobt, durch den Einsatz von Peptiden aus spezifischen Antigenen (z.B. Tumor- oder Virusantigene) T-Zellreaktionen zu beeinflussen. Für die Aktivierung der T-Lymphozyten ist dabei die Bindung dieser Peptide an die jeweiligen HLA-Moleküle der Patienten notwendig. Aus diesem Grund ist bei der Auswahl solcher Peptide der HLA-Phänotyp der Patienten zu berücksichtigen.

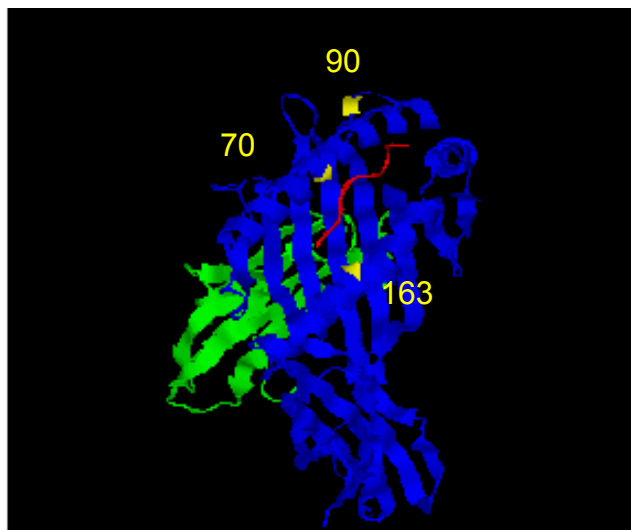
Angeborene Immunstörungen bei Neugeborenen und Kleinkindern können in seltenen Fällen auf Defekte in der Expression von HLA-Antigenen zurückgeführt werden. Diese Immundefekte bezeichnet man dann als „Bare Lymphocyte Syndrome“ (Reith et al., 1988; Steimle et al., 1993; Herrero Sanchez et al., 1992). Erworbene Expressionsdefekte finden sich häufig auf Tumorzellen. Diesen Störungen können genetische Alterationen oder Regulationsstörungen der HLA-Expression zugrunde liegen.

1.11 Die HLA-A*66-Gruppe

Die HLA-A*66-Gruppe ist Teil der weitverbreiteten serologischen HLA-A10 Familie, die aus den Gruppen A*25, A*26, A*34 und A*66 besteht.

Für das Allel HLA-A*6601 wurden Peptidbindungsmotive beschrieben (Seeger et al., 1999). Eine Vorhersage für die Peptidbindung der nicht beschriebenen HLA-A*66 Varianten A*6602 und A*6603 lässt sich jedoch nicht treffen. Die polymorphen AS Positionen (70, 90, 163), durch die sich die Allele unterscheiden (Abb. 1.7, Tab. 1.2), beeinflussen teilweise die maßgeblich für die Peptidbindung von HLA-Klasse I verantwortlichen Pockets. So wurde AS Position 70 als Teil der Pockets B und C beschrieben und AS Position 163 als Teil von Pocket A, AS Position 90 hingegen ist nicht in die Peptidbindung involviert (Saper et al., 1991).

Abbildung 1.7: Polymorphe AS Positionen innerhalb der HLA-A*66 Gruppe



Darstellung der polymorphen AS Positionen, welche die HLA-A*66-Moleküle voneinander unterscheiden. Blau dargestellt ist die schwere Kette des HLA-Moleküls, grün markiert ist das $\beta 2m$, rot dargestellt ist das gebundene Peptid und die gelbe Markierung zeigt die polymorphen AS Positionen (Computersimulation darstellt mit dem Programm RASMOL, Sayle et al., 1995).

Tabelle 1.2: AS Unterschiede zwischen den HLA-A*66-Varianten

Allele	70	90	163
A*6601	Gln	Asp	Arg
A*6602	Gln	Ala	Glu
A*6603	His	Ala	Glu
Einfluß auf Pocket	B, C		A

AS Positionen, durch die sich die HLA-A*66-Allele voneinander unterscheiden. In der unteren Zeile sind die *specificity pockets* aufgezeigt, denen die variablen AS Positionen zugeordnet sind.

Um die Frage der Peptid Selektion innerhalb der HLA-A*66-Gruppe zu beantworten und eine Gewichtung der polymorphen AS Positionen im HLA-Molekül zu ermöglichen, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Peptidmotive der HLA-Allele A*6602 und A*6603 zu bestimmen.

2. Material

2.1 Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
1xTricine-SDS-Laufpuffer	Invitrogen GmbH, Emmy-Noether Strasse 10, 76131 Karlsruhe, Deutschland
1xTris-Glycin-Transferpuffer	Invitrogen GmbH
2xTricine-SDS-Probenpuffer	Invitrogen GmbH
6x Gel Loading Solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim, Deutschland
ABI Prism® 3100 POP 6™ Polymer	Perkin Elmer/Applied Biosystems, Brunnenweg 13, 64331 Weiterstadt, Deutschland
Acetonitril G Chromasolv (20% mit H ₂ O bidest.)	Riedel-de Haën, Seelze GmbH, Wunstorfer Straße 40, 30926 Seelze, Deutschland
Agar	Carl Roth GmbH + CoKG, Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Agarose	SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Str. 1, 69115 Heidelberg, Deutschland
Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Biobrene Plus	Perkin Elmer / Applied Biosystems
BSA	Sigma Aldrich Chemie GmbH
DAKO TMB+	DakoCytomation GmbH, Hamburger Str. 181, 22083 Hamburg, Deutschland
DMSO	Sigma Aldrich Chemie GmbH
dNTP-Mix	Whatman Biometra®, Rudolf-Wissel- Str. 30, 37079 Göttingen, Deutschland
EDTA	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Essigsäure (HAc) (96%)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Ethanol	J.T. Baker, 222 Red School Lane, Phillipsburg, NJ 08865, USA
Ethanolamin (H ₂ NCH ₂ CH ₂ OH x HCl)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + CoKG
Fugene VI Reagenz	Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim, Deutschland
Geneticin	Invitrogen GmbH
Glycerol	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Sigma Aldrich Chemie GmbH

HCl	Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Deutschland
Hefe Extrakt	Carl Roth GmbH + CoKG
Hepes (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Hypoosmolarer Elektroporations Puffer	Eppendorf GmbH, Peter-Henlein-Straße 2, 50389 Wesseling Berzdorf, Deutschland
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Invitrogen GmbH
Isopropanol	J.T. Baker
Methanol	J.T. Baker
Milchpulver (blotting grade)	Carl Roth GmbH + CoKG
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumacetat (NaAc)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumacid (NaN ₃)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Ni-NTA-Agarose	QIAGEN GmbH – Germany, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Deutschland
PBS	Zentralapotheke der Medizinischen Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Deutschland
PTH-Analyser Standards (200 nmol)	Perkin Elmer / Applied Biosystems
R1, Phenylisothiocyanat	Perkin Elmer / Applied Biosystems
R2, N-Methylpiperidine, in Methanol und H ₂ O	Perkin Elmer / Applied Biosystems
R3 TFA	Perkin Elmer / Applied Biosystems
R4A, TFA in H ₂ O (25%)	Perkin Elmer / Applied Biosystems
S2B, Ethylacetat	Perkin Elmer / Applied Biosystems
S3, Butylchlorid	Perkin Elmer / Applied Biosystems
Salzsäure (HCl)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Simply Blue-Lösung	Invitrogen GmbH
SOC-Medium	Invitrogen GmbH
β-Lactoglobulin (25 nmol)	Perkin Elmer / Applied Biosystems
TBE-Puffer	Sigma Aldrich Chemie GmbH
TBST	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Tetrahydrofuran (THF) in H ₂ O (3,5 %)	Perkin Elmer / Applied Biosystems

TMB Blotting Substrat	DakoCytomation GmbH
TRI REAGENT	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Trypsin	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Trypton	Carl Roth GmbH + CoKG
Tween® 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH

2.2 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung / Anmerkung
1 mM HCl Kopplung des Liganden an die NHS-Säule	999 ml H ₂ O bidest. + 1ml HCl (1 M)
Elutions-Puffer, pH 2,7 Affinitätschromatographie 0,1 M Glycin-HCl	3,754 g Glycin add. 500 ml H ₂ O bidest.
Equilibrierungspuffer, pH 7,0 HiTrap Desalting columns 0,1 M NaH ₂ PO ₄ ; 0,15 M NaCl	6,89 g NaH ₂ PO ₄ 4,38 g NaCl add. 500 ml H ₂ O bidest.
Geneticin Stammlösung	25 g Geneticin in 500 ml Hepes (pH 7,3) auflösen, sterilfiltrieren
Hepes Lösung, pH 7,3	Hepes in H ₂ O bidest. aufnehmen
MP/PBST-Blockierungslösung (ELISA)	100 ml PBST 5 g Milchpulver (<i>blotting grade</i>)
PBST (ELISA)	1000 ml PBS 0,5 ml Tween® 20
Standard-Kopplungs-Puffer, pH 8,3 Kopplung des Liganden an die NHS-Säule 0,2 M NaHCO ₃ ; 0,5 M NaCl	14,61 g NaCl 8,401 g NaHCO ₃ add. 500 ml H ₂ O bidest.
Start-Puffer, pH 8,0 Affinitätschromatographie 75 mM Tris-HCL	4,543 g Tris add. 500 ml H ₂ O bidest.
Stopp-Lösung ELISA	60 ml Schwefelsäure (5 M) 10 ml HCl (10 M) 30 ml H ₂ O bidest.
Storage-Puffer, pH 7,0 Affinitätschromatographie 0,05 M Na ₂ HPO ₄ ; 0,1 % NaN ₃	0,5 g NaN ₃ 3,549 g Na ₂ HPO ₄ add. 500 ml H ₂ O bidest.
Trypsin-EDTA-Lösung	0,05% Trypsin EDTA in PBS

0,02%

Waschpuffer A, pH 8,3 Kopplung des Liganden an die NHS-Säule 0,5 M Ethanolamin; 0,5 M NaCl	24,385 g Ethanolamine 14,61 g NaCl add. 500 ml H ₂ O bidest.
Waschpuffer B, pH 4,0 Kopplung des Liganden an die NHS-Säule 0,1 M NaAc; 0,5 M NaCl	14,61 g NaCl 4,102 g NaAc add. 500 ml H ₂ O bidest.

2.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>Cartridge Seals</i> (Edman Sequenzierung)	Perkin Elmer / Applied Biosystems
<i>Cell culture cassette</i> für <i>Tecnomouse</i>	Integra Biosciences GmbH, Ruhberg 4, 35463 Fernwald
Centricon-10-Filter	Millipore GmbH, Am Kronberger Hang 5, 65824 Schwalbach, Deutschland
Cryoröhrchen	Nunc GmbH & Co. KG, Rheingaustraße 32, 65201 Wiesbaden, Deutschland
EDTA-Röhrchen	Eppendorf GmbH
Einmalpipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl, 5000 µl)	Eppendorf GmbH
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Eppendorf GmbH
Filterpapiere	Invitrogen GmbH
HiTrap Desalting Column	Amersham Pharmacia Biotech AB, SE-751 84, Uppsala, Schweden
Lymphotube-1077	c.c.pro GmbH, Nachtweide 8, 67433 Neustadt, Deutschland
MicroAmp® Optical 96-Well Plate	Perkin Elmer/Applied Biosystems
MicroSpin™ G-50 Columns	Amersham Pharmacia Biotech AB
Mikrofugengefäße (1,5 ml)	Eppendorf GmbH
NHS-activated HiTrap Columns	Amersham Pharmacia Biotech AB
Nunc Maxisorp™ Plate C96	Nunc GmbH
Parafilm®	Labor-Brand, Leihgesterner Weg 165, 35392 Gießen, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Perkin Elmer / Applied Biosystems
PD10-Säulenkörper	Amersham Pharmacia Biotech AB
Petrischalen	BD Biosciences, Erembodegem-Dorp 86, 9320 Erembodegem, Belgien
PVDF-Membran	Invitrogen GmbH

Rollerflaschen (Zellkultur)	Integra Biosciences GmbH
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD Biosciences
Sephacryl S-100-Säule	Amersham Pharmacia Biotech AB
Sephadex™ G-50 Fine	Amersham Pharmacia Biotech AB
Spritzen und Spritzenaufsätze (steril)	B. Braun Melsungen AG, Carl-Braun-Straße 1, 34212 Melsungen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter (0, 22 und 0, 45 µm)	Millipore GmbH, Am Kronberger Hang 5, 65824 Schwalbach, Deutschland
Thermopapier für Digitalkamera	Polaroid GmbH, Robert-Bosch-Str. 32, 63303 Dreieich-Sprendlingen, Deutschland
TFA Treated Cartridge Filters (Edman Sequenzierung)	Perkin Elmer / Applied Biosystems
Transfer Pads	Invitrogen GmbH
Tricine-Gele	Invitrogen GmbH
Wattetupfer (steril)	
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ² , 250 cm ²)	Nunc GmbH
Zentrifugengefäße (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences

2.4 Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
140 C-PTH-Analyser (Edman Sequenzierung)	Perkin Elmer / Applied Biosystems
ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Perkin Elmer / Applied Biosystems
Äktaprime	Amersham Pharmacia Biotech AB
Autoklav (5050 EL)	Systec GmbH, Labor-Systemtechnik, Sandusweg 11, 35435 Wettenberg
Automatikpipetten Akku Jet	Brand
Beheizbares Wasserbad	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Schulze-Delitzsch-Straße 4, 30938 Burgwedel, Deutschland
Blot Module Novex® XCell II	Invitrogen GmbH
Chemikalienwaage	Vivascience / Sartorius AG, Weender Landstrasse 94-108, 37075 Goettingen, Deutschland
CO ₂ Inkubator BBD 6620	Thermo Electron / Haereus, Robert-Bosch- StraÙe 1, 63505 Langenselbold, Deutschland
Digitalkamera	Polaroid GmbH

Elektrophoresekammer (Electro 4) (für Agarosegele)	Thermo Electron / Haereus
Elektrophoresekammer (für Novex-Fertiggele)	Invitrogen GmbH
ELISA microplate reader	Anthos / Asys Hitech GmbH, Nordstrasse 4, 5301 Eugendorf, Österreich
ELISA washer	Tecan Deutschland GmbH, Theodor Storm Str. 17, 74564 Crailsheim, Deutschland
Gefrierschrank (- 20°C; -80°C)	Omnilab Laborzentrum, Robert-Hooke-Str. 8, 28359 Bremen, Deutschland
GeneAmp PCR System 9700 Thermocycler	Perkin Elmer / Applied Biosystems
HP 1100 (RP-HPLC)	Agilent Technologies
HPLC Säule: PTH-C 18 (BrownLee)	Perkin Elmer / Applied Biosystems
Inkubator (37°C, Kultivierung von Bakterien)	Thermo Electron / Haereus
Kühlschrank(4°C)	Omnilab Laborzentrum
Magnetrührer MR 2002	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG , Walpersdorfer Str. 12 , 91126 Schwabach, Deutschland
MikrofugeBiofuge Fresco	Thermo Electron / Haereus
Mikroskop	Olympus Deutschland GmbH, Wendenstr. 14-18, 20097 Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	Omnilab Laborzentrum
Multiporator	Eppendorf GmbH
Neubauerzählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht 'Assistent' KG, Stettener Straße 22-24, 97647 Sondheim, Deutschland
pH-Meter	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Dr.-Karl-Slevogt-Straße 1, D-82362 Weilheim, Germany
Photometer GeneQuant (RNA / DNA Calculator)	Amersham Pharmacia Biotech AB
Pipetten (für 10 µl, 100 µl, 1000 µl und 5000 µl Pipettenspitzen)	Eppendorf GmbH
Präzisionsküvette (Schichtdicke 5 mm; Aufnahmekapazität: 10 µl)	Hellma GmbH & Co. KG, Postfach 1163, 79371 Müllheim, Deutschland
Procise 492 (Aminosäuresequencer)	Perkin Elmer / Applied Biosystems
Proteomic analyzer 4700 (MALDI-TOF, MALDI-MS/MS)	Perkin Elmer / Applied Biosystems
Q-Star (ESI-MS, ESI-MS/MS)	MDS Sciex, 1170 Veterans Blvd., Suite 200, South San Francisco, CA, 94080 U.S.A.
Spannungsgeräte (E865)	Consort N.V., Parklaan 36, 2300 Turnhout, Belgien
SpeedVac	Eppendorf GmbH

Sterilbank	Thermo Electron / Haereus
<i>Tecnomouse</i>	Integra Biosciences GmbH
Thermoblock (Blockthermostat BT 100)	Kleinfeld Labortechnik GmbH, Elbingeröder Str. 1, 30989 Gehrden, Deutschland
Thermocycler	Perkin Elmer / Applied Biosystems
Thermomixer comford	Eppendorf GmbH
UV Detektor 785 A (Edman Sequenzierung)	Perkin Elmer / Applied Biosystems
UV-Illuminator	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Florenz- Sartorius- Str. 14, 37079 Göttingen, Deutschland
Vortex	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
XCell SureLock™ Mini-Cell41 Gelelektrophoresekammern	Invitrogen GmbH
Zentrifuge (für 15-50 ml Zentrifugengefäße)	Eppendorf GmbH

2.5 Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle
Anti-β2m-HRP	DakoCytomation GmbH
Anti-V5-HRP-Antikörper	Invitrogen GmbH
LY-5.1-Antikörper	CellSystems, Hummelsbergerstrasse 11, St. Katharinen, 53562, Deutschland
W6/32-Antikörper	Serotec GmbH, Immermannstr. 13, 40210 Düsseldorf

2.6 Software zur Datenverarbeitung und -auswertung

Die Edman-Sequenzanalyse wird unter Verwendung des Programmes *Pulsed Liquid* (Reaktionszyklus, Konvertierungszyklus und Gradientenprogramm für die PTH-Trennung) durchgeführt.

Zur Determinierung der Peptid-Herkunft wurden die Programme MASCOT (Hirosawa et al., 1993) und BLAST (Altschul et al.1990) verwendet.

Für die DNA Sequenzierung wurde die Software *Data Collection Software Version 1.0.1.* sowie die *ABI Prism Sequencing Analysis Software* eingesetzt.

2.7 Organismen

2.7.1 Bakterien

Bezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i>	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)	Invitrogen GmbH
<i>E. coli</i> (Top 10) Zellen	φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	

2.7.2 Humane Zelllinien

Stamm	Beschreibung	Referenz	Bezugsquelle
LCL 721.221	B-lymphoblastoide Zelllinie, y-ray-induzierte Mutation im HLA-Komplex. Keine Expression von HLA-Klasse I Molekülen	Kavathas et al., 1980	LGC Promochem GmbH, Mercatorstr. 51, 46485 Wesel, Germany
HEK293	Embryonale Nierenzelllinie, Adenovirus Typ 5-transformiert, adhärenente fibroblastoide Zellen, Monolayer	Graham et al., 1977	DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Germany

2.8 Nukleinsäuren

2.8.1 DNA

DNA-Nr.	HLA-A Allel	Referenz
997973	A*6602	Institut für Transfusionsmedizin, MHH
951478	A*6603	Institut für Transfusionsmedizin, MHH

2.8.2 Plasmide

Vektor	Beschreibung des Vektors + Genotyp	Referenz + Bezugsquelle
pcDNA3.1/V5-His	Linerisierter Klonierungsvektor des verwendeten Klonierungskits. Expressionsvektor für eukaryote Zellsysteme. CMV-Promotor; V5 Epitop; Polyhistidin-tag	Invitrogen GmbH
pcDNA3.1/6602/2.1	pcDNA3.1 / V5-His-Derivat. Insetiert wurde ein Fragment des HLA-A*-Allels 6602, Exon 1-4 mit Intron-Sequenzen 1-3. Kein Stopp nach Exon 4, Fusion mit V5- und His-tag	diese Arbeit; Institut für Transfusionsmedizin, MHH
pcDNA3.1/6603/2.5	pcDNA3.1 / V5-His-Derivat. Insetiert wurde ein Fragment des HLA-A*-Allels 6603, Exon 1-4 mit Intron-Sequenzen 1-3. Kein Stopp nach Exon 4, Fusion mit V5- und His-tag	diese Arbeit; Institut für Transfusionsmedizin, MHH

2.8.3 Oligonukleotide

Primer für PCR und Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz	T _m	N
HLA-A-TAS	5' gAg ATg gCC gTC ATg gCg 3'	64°C	23
HLA-E4-WAS	5' CCA TCT CAg ggT gAg ggg CT 3'	66°C	20
pcDNA-3.1S	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'	56°C	20
pcDNA3.1 AS	5' TAg AAg gCA CAg TCg Agg 3'	56°C	18

Bezugsquelle der Primer:

TIB MOLBIOL GmbH, Eresburgstrasse 22-23, 12103 Berlin, Deutschland

Legende: Alle Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL (TIB MOLBIOL GmbH, Eresburgstrasse 22-23, 12103 Berlin, Deutschland) synthetisiert.

T_m = Schmelztemperatur, berechnet nach der Formel: $T_m = 4x (\text{Anzahl G} + \text{Anzahl C}) + 2x (\text{Anzahl A} + \text{Anzahl T})$

N = Anzahl der Nukleotide

Weitere für die Sequenzierung verwendete interne Primer wurden von der Firma Protrans (Protrans medizinische diagnostische produkte GmbH, Hohenwiesenweg 51, 68775 Ketsch am Rhein, Deutschland) erworben.

2.9 DNA-Längen- und Molekulargewichtsstandards

Bezeichnung	Bezugsquelle
DNA Molecular Weight Marker VI	Roche Diagnostics GmbH
LMW-Marker	Amersham Pharmacia Biotech AB
Seebblue-Marker	Invitrogen GmbH

2.10 Enzyme

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>Hind</i> III	New England Biolabs GmbH, Brüningstrasse 50, 65926 Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Xba</i> I	New England Biolabs GmbH Whatman Biometra®
Dynazyme EXT	

2.11 Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer/Applied Biosystems
Endo free maxi plasmid kit	Qiagen GmbH
pcDNA3.1V5/His TOPO TA-cloning Kit	Invitrogen GmbH
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH

2.12 Kulturmedien

2.12.1 Medien für Bakterien

2xYT-Ampicillin-Medium (1 Liter)

Zusatz	Menge
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Trypton	10 g

- mit H₂O bidest. auf 1l auffüllen
- pH 7,5
- autoklavieren
- bei 4°C aufbewahren
- Ampicillin zugeben (Endkonzentration: 100 µg/ml)

LB-Ampicillin-Agar (1 Liter)

Zusatz	Menge
Agar	25 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Trypton	10 g

- mit H₂O bidest. auf 1l auffüllen
- pH 7,5
- autoklavieren
- auf ca. 55°C abkühlen lassen
- Ampicillin zugeben (Endkonzentration: 100 µg/ml)
- in Petrischalen gießen (ca. 25 ml/Schale)

SOC-Medium

Bezugsquelle: Invitrogen GmbH

2.12.2 Medien für die Kultivierung von humanen Zelllinien

10% Medium für die Kultivierung von LCL 721.221 Zellen (0,5 Liter)

Zusatz	Menge
RPMI 1640	430 ml
FCS	50 ml
Penicillin/Streptomycin	10 ml
Glutamin	5 ml
Natriumpyruvat	5 ml

10% Medium für die selektive Kultivierung rekombinanter LCL 721.221 Zellen (0,5 Liter)

Zusatz	Menge
RPMI 1640	415 ml
FCS	50 ml
Geneticin*	15 ml
Penicillin/Streptomycin	10 ml
Glutamin	5 ml
Natriumpyruvat	5 ml

5% Medium für die intrakapillare Versorgung von LCL 721.221 Zellen in der *Tecnomouse* (0,5 Liter)

Zusatz	Menge
RPMI 1640	455 ml
FCS	25 ml
Penicillin/Streptomycin	10 ml
Glutamin	5 ml
Natriumpyruvat	5 ml

5% Medium für die intrakapillare Versorgung rekombinanter LCL 721.221 Zellen in der Tecnomouse (0,5 Liter)

Zusatz	Menge
RPMI 1640	440 ml
FCS	25 ml
Geneticin*	15 ml
Penicillin/Streptomycin	10 ml
Glutamin	5 ml
Natriumpyruvat	5 ml

*(Geneticin Stammlösung, s. Kap. 2.2 = Endkonzentration: 1500 µg/ml Geneticin)

10% Medium für die Kultivierung von HEK293 Zellen (0,5 Liter)

Zusatz	Menge
DMEM	435 ml
FCS	50 ml
Penicillin/Streptomycin	10 ml
Glutamin	5 ml

10% Medium für die selektive Kultivierung rekombinanter HEK293 Zellen (0,5 Liter)

Zusatz	Menge
RPMI 1640	425 ml
FCS	50 ml
Geneticin*	10 ml
Penicillin/Streptomycin	10 ml
Glutamin	5 ml

*(Geneticin Stammlösung, s. Kap. 2.2 = Endkonzentration: 1000 µg/ml Geneticin)

3. Methoden

3.1 Amplifikation der DNA für die schwere Kette von HLA-A*6602 und A*6603

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) handelt es sich um eine enzymatische Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente unter Verwendung *template*-homologer Primer, dNTP (Nukleotidmix; 2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphate, dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und einer temperaturstabilen Polymerase. Die Primer werden mit der zuvor denaturierten Ausgangs-DNA hybridisiert, was jeweils antiparallel in 3'-5'-Orientierung an jedem Strang der DNA erfolgt. Die Elongation der Primer wird dabei durch eine hitzestabile DNA-Polymerase katalysiert. Zwischen diesen Oligonukleotiden liegt der zu amplifizierende Bereich. Die Polymerase-Kettenreaktion geht auf Mullis zurück (Mullis and Faloona, 1987; Mullis, 1990) und beruht auf dem im Folgenden dargestellten mehrmals hintereinander geschalteten Zyklus, welcher aus jeweils drei Schritten besteht:

1. Trennung des DNA-Doppelstranges (Denaturierung):

Durch Erhitzen der DNA auf eine Temperatur von 95°C werden die beiden DNA-Stränge durch Lösung der zwischen den komplementären Basen liegenden Wasserstoffbrückenbindungen voneinander getrennt.

2. Anlagerung (Annealing):

Die beiden Primer lagern sich über Wasserstoffbrückenbindungen an die DNA-Einzelstränge an. Die Primer werden dabei so ausgewählt, dass sie komplementär zum 5'- bzw. 3'- Ende der zu amplifizierenden Sequenz sind und so die zu vermehrende Region begrenzen.

Die Anlagerungstemperatur der verwendeten Primer ist abhängig von der Basenzusammensetzung der Primer und der sich daraus ergebenden Schmelztemperatur T_m , die wie folgt berechnet werden kann:

$$T_m = 4x (\text{Anzahl G} + \text{Anzahl C}) + 2x (\text{Anzahl A} + \text{Anzahl T})$$

3. Verlängerung (Elongation):

Die DNA-Polymerase katalysiert die matrizenabhängige Synthese des komplementären zweiten Stranges aus Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTP) von den Primern ausgehend in 5'-3'-Richtung. Die Desoxynukleosid-Triphosphate werden dabei der Reaktionslösung im

Überschuss zugegeben. Für die Elongation werden hitzestabile Polymerasen verwendet, die häufig aus *Thermophilus aquaticus* isoliert werden (Chien et al., 1976). Diese sog. Taq-Polymerase weist ein Temperaturoptimum von 72°C auf.

Dieser Zyklus wird in der Regel 25-30 Mal wiederholt. Die in dieser Arbeit verwendete temperaturstabile *DyNAzyme*-Polymerase ist ein *proof-reading* Enzym und besitzt somit die 5'-3'-Exonukleaseaktivität. *DyNAzyme*-Polymerase ist ein Derivat der Taq-Polymerase, welche die Eigenschaft der „Nicht-Matrizenabhängigen-Polymerisationsaktivität“ besitzt (Clark, 1988), durch die an das 3'-Ende des PCR-Produktes ein Adenin-Nukleotid angehängt wird. Durch die *proof-reading* Aktivität dieses Enzyms erfolgt die Verlängerung des PCR-Produktes jedoch ineffizient, so muß eine finale Extensionszeit von 60 Min unbedingt eingehalten werden, um die anschließende TA-Klonierung des amplifizierten DNA-Bereiches durchführen zu können.

Als Template wurde die gDNA aus dem Institut für Transfusionsmedizin (s. 2.8.1), MHH, eingesetzt, um die A*66 Allele zu amplifizieren.

PCR-Ansatz:

HPLC-H ₂ O	14,0 µl	
DNA	1,0 µl	
Primer 1 (HLA-TAS)	2,5 µl	(Ak.: 5 p/mol; Ek.: 0,5 µM)
Primer 2 (HLA-E4-WAS)	2,5 µl	(Ak.: 5 p/mol; Ek.: 0,5 µM)
dNTP' s	2,0 µl	(Ak.: 10 mM; Ek.: 200 nM)
Puffer (+ MgCl)	2,5 µl	
<i>DyNAzyme</i> -Polymerase	0,5 µl	(Ek.: 1 U/µl)
Gesamt:	25 µl Ansatz	

Primer 1 (HLA-TAS): Sense-Primer, HLA-A-multi, 5' UT/Anfang Exon 1

Primer 2 (HLA-E4-WAS): Antisense-Primer, HLA-A-multi, Ende Exon 4, ohne Stopp-Codon, damit ein Fusionsprodukt HLA-hc-V5-tag entstehen kann

Temperaturprofil für die PCR:

Denat.	Denat.	Annealing	Denat.	Annealing	Extension	Extension	Hold
94 ° C	94 ° C	65 ° C	94 ° C	61 ° C	72 ° C	72 ° C	4 ° C
2 Min	10 Sek.	1 Min	10 Sek	50 Sek	30 Sek	60 Min	
		10 Zyklen		20 Zyklen			

3.1.2 Nachweis der DNA-Fragmente aus der PCR mittels DNA-Gelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht auftrennen. Die Methode beruht darauf, dass DNA Moleküle aufgrund ihrer negativen Ladung in einem Gleichspannungsfeld zur Anode wandern. Dabei zeigt die Mobilität der Nukleinsäuren im elektrischen Feld eine lineare Abhängigkeit zu ihrer Größe (Sambrook et al., 1989).

Die DNA wird bei der Gelelektrophorese mit Hilfe aromatischer Kationen angefärbt. In diesem Fall wird Ethidiumbromid verwendet, welches in die doppelhelikale Struktur der DNA interkaliert (Perbal, 1988). Durch die Zugabe von Ethidiumbromid ist es möglich, auf dem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 302 nm eine intensiv violett-rote Fluoreszenz zu erkennen. Die DNA-Banden sind so erkennbar und mit Hilfe des mitaufgetragenen DNA-Längenstandards ist es möglich, das Molekulargewicht der Fragmente zu bestimmen.

Für die 1%-igen Agarosegele wurde 3 g Agarose in 300 ml 1x TBE-Puffer (100 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA) gelöst und 5 Min bei 1000 W in der Mikrowelle gekocht. Anschließend wurde das flüssige Gel mit 8 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) vorgefärbt und zum Erkalten in Formen gegossen, die mit speziellen Kämmen versehen waren. Bei Entfernung dieser Kämmen nach Aushärtung der Gele blieben Taschen zurück, die für das Einpipettieren der Proben in die Agarosegele notwendig sind.

Nach Anfärben der DNA-Proben mit 6x Gel Loading Solution (je 10 µl PCR Amplifikat 2 µl Gel Loading Solution) und Einpipettieren der DNA-Proben sowie des DNA-Längenstandards (DNA Molecular Weight Marker VI) in die vorbereiteten Geltaschen wurde das Gel in die mit TBE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer eingelegt und die Gelelektrophorese für 30 Min bei einer Spannung von 200 V (300 mA) gestartet.

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die Amplifikate durch UV-Licht in Form von fluoreszierenden Banden sichtbar gemacht und photographisch festgehalten.

3.1.3 Klonierung von PCR Produkten

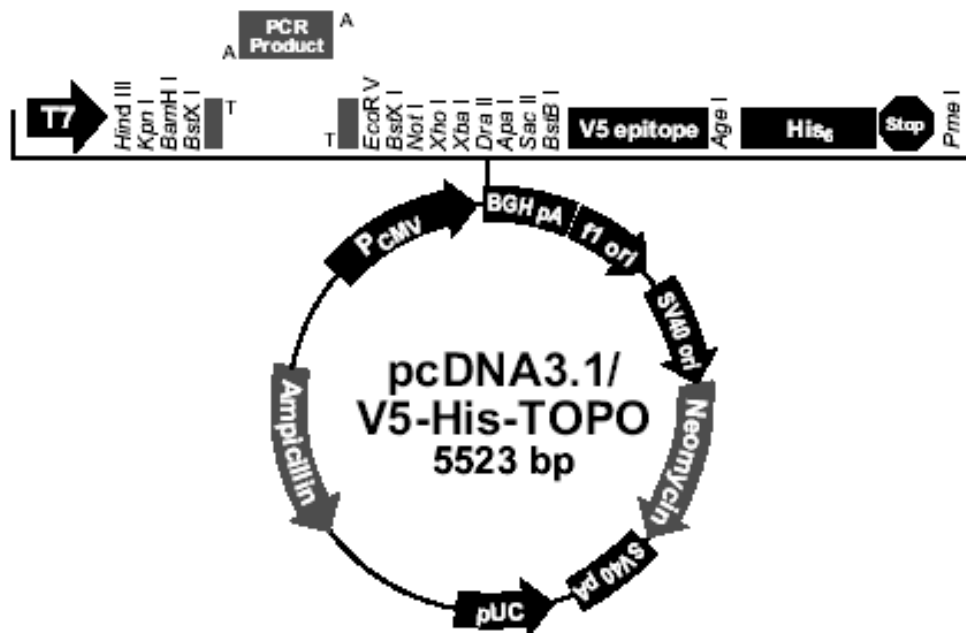
Die Klonierung dient der Vervielfältigung eines selektiv amplifizierten DNA Fragmentes in einer Bakterienzelle (z.B. *E. coli*). Zu diesem Zweck wird der interessierende Abschnitt doppelsträngiger DNA in Form eines PCR Produktes *in vitro* in ein Plasmid integriert, um dann in eine Bakterienzelle eingeschleust zu werden. Anschließend werden die Wirtsbakterien kultiviert, so dass mit jeder Generation auch das rekombinante Plasmid innerhalb der Wirtszelle dupliziert wird. Auf diese Weise werden große Mengen der interessierenden PCR Zielsequenz hergestellt, auf die man auch später durch Rekultivierung eingefrorener Bakterienklone zurückgreifen kann (Übersicht bei Suzuki 1986).

3.1.4 Vektorligation

Die hier angewendete Methode zur Verknüpfung von PCR-Produkt und dem *pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®]TA* Plasmid beruht auf dem Prinzip der „TA-sticky-end“ Verknüpfung von Vektor und zu klonierendem PCR-Produkt. Diese Form der Ligation wird durch die DNA-Matrizen unabhängige terminale Transferase Aktivität der DNA Polymerase ermöglicht, die an jedes generierte PCR-Produkt ein 3'-endständiges Desoxyadenosin (A) addiert. Diese dATPs paaren sich mit den einzelnen Desoxythymidinen (T), die der hier verwendete Vektor an der Ligationsstelle an seinem 3'-Ende aufweist.

Die kovalente Verknüpfung der beiden DNA Moleküle wird dabei durch das Enzym Topoisomerase I katalysiert (Shuman, 1994).

Außerdem wird bei der Ligation in den *pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®]TA* Vektor ein C-terminales V5-Epitop sowie ein C-terminaler 6xHis *tag* an die Amplifikate der PCR angehängt.

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des *pcDNA3.1/V5-His⁶ TOPO[®] TA* Plasmids

Schematische Darstellung des *pcDNA3.1/V5-His⁶ TOPO[®] TA* Plasmids mit CMV promoter, T7 promoter/priming site, multiple cloning site, TOPO[®] Cloning site, V5 epitope, Polyhistidine (6xHis) region, SV40 promoter and origin, Neomycin resistance gene, Ampicillin resistance gene, pUC origin und Restriktionsstellen (www.invitrogen.com)

Für die Vektorligation wurde der *pcDNA3.1/V5-His⁶ TOPO[®] TA Expression Kit* und die entsprechenden Protokolle verwendet.

Sie fand in einem Gesamtvolumen von 6 µl statt, wobei 4 µl des PCR-Produktes zusammen mit 1 µl Salzlösung und 1 µl *pcDNA3.1/V5-His⁶ TOPO[®] TA* Vektor (beides im Kit) vermischt und für 15 Min bei RT inkubiert wurden.

3.1.5 Transformation

Die Transformation ist die Einführung rekombinanter Plasmid-DNA in Wirtszellen, die zusammen ein replikationsfähiges System bilden. Die hier verwendete Methode nach Hanahan (1983) sieht eine Transformation in bereits kompetente, d. h. zur Transformation befähigte *E. coli* Bakterienzellen vor. Die Aufnahme des Plasmids in die Bakterienzelle erfolgt dabei durch einen kurzzeitigen Hitzeschock, der die Passage des Plasmids durch die Zellmembran ermöglicht.

Für die Transformation wurde der *pcDNA3.1/V5-His⁶ TOPO[®] TA Expression Kit* verwendet.

2 µl der Vektorligation (s. 3.1.4) wurden in ein Röhrchen *E. coli* (Top 10 F') Zellen überführt und der Ansatz 30 Min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock des Transformationsansatzes bei 42°C für 30 Sek. Danach wurde der Ansatz für 2 Min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Zellen für 60 Min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf einer LB-Agarplatte (supplementiert mit Amp, s. 2.11.1) ausplattiert.

3.1.6 Selektion und Expansion transformierter Bakterien

Da der hier verwendete Vektor ein Resistenzgen gegen Ampicillin aufweist, besitzen die transfizierten Klone auf ampicillinhaltigen Agarböden einen Selektionsvorteil.

Nach Inkubation der beimpften Agarplatte über Nacht bei 37°C wurden 12 Bakterienkolonien von der Agarplatte gepickt und in je 5 ml 2x YT-Medium (supplementiert mit Amp, s. 2.11.1) gegeben. Die Kulturen wurden UN bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Aus den Übernachtskulturen erfolgte anschließend die Isolation der Plasmid-DNA. Zusätzlich wurde aus jeder Kultur eine Reserve („Glycerolstock“) (800 µl Glycerol; 200 µl Bakterienlösung) angelegt und bei -80°C für eine spätere Rekultivierung aufbewahrt.

3.1.7 Isolierung von Plasmid DNA

Die Gewinnung der Plasmid-DNA mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kit* basiert auf der Methode der alkalischen Lyse von Bakterien (Birnboim et al., 1979) und der anschließenden DNA Isolierung durch Adsorption der freien DNA an Silikat-Matrices (Vogelstein and Gillespie, 1979).

Die Übernachtskulturen (s. 3.1.6) wurden in Mikrofugen-Gefäße überführt und anschließend 3 Min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Eppendorf-Gefäße mit den enthaltenden Sedimenten erneut mit den entsprechenden Übernachtskulturen aufgefüllt und wiederum 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Abgießen der Überstände wurden die sedimentierten Bakterien in je 250 µl gekühltem Puffer P1 (100 µg/µl RNase A, aus dem Kit) resuspendiert und mit 250 µl Puffer P2 (aus dem Kit) lysiert. Danach wurden die Ansätze mehrmals invertiert. Es wurden je 350 µl Puffer N3 (aus dem Kit) zugegeben und die Ansätze vermischt. Anschließend erfolgte eine 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm. Die plasmidhaltigen Überstände wurden auf die *QIAprep*® Säulen gegeben und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Säulen mit je 750 µl Puffer PE (aus dem Kit) gewaschen, 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Durchläufe verworfen. Nach

Wiederholung dieses Waschschrilles wurde die auf den Silica Säulenmembranen zurückgehaltene DNA durch Zugabe von je 100 µl HPLC Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

3.1.8 Restriktionsanalyse

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische DNA-Sequenzen von 4 bis 8 Nukleotiden und spalten die DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung. Um positive Transformanden nachzuweisen, wird die aus den *E. coli* (Top 10 F') Zellen isolierte Plasmid-DNA (s. 3.1.7) einer Restriktionsanalyse unterzogen. Dabei werden durch geeignete Restriktionsendonukleasen die Plasmide spezifisch in Vektor und „Insert“-DNA hydrolysiert. Eine anschließende DNA-Gelelektrophorese weist im Falle korrekter Ligation und Transformation die zur Klonierung eingesetzten DNA-Fragmente nach.

Die Rekombinationsnachweise fanden in 10 µl Restriktionsansätzen statt (je 5 µl Plasmid-DNA-Lösung, 2 µl HPLC-Wasser, 1 µl Enzym Xba I, 1 µl Enzym Hind III und 1 µl Inkubationspuffer), die jeweils für 60 min bei 37°C inkubiert wurden. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente fand in 1% Agarosegelen (s. 3.1.2) bei einer Spannung von 200 V (300 mA) für 30 min statt. Als DNA-Längenstandard diente der „DNA Molecular Weight Marker VI“.

3.1.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung dient der genauen Bestimmung der Nukleotidabfolge in einem DNA-Abschnitt. Die durchgeführten Sequenzierreaktionen im Rahmen dieser Arbeit beruhen auf der Kettenabbruch-(Didesoxy-)Methode (Sanger et al., 1977).

Dabei finden in einer PCR-Sequenzierreaktion Primer-Elongationen an einer einzelsträngigen DNA-Matrize unter Verwendung der im Reaktionsgemisch vorliegenden Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und einer hitzestabilen Polymerase statt. Zusätzlich befinden sich im Reaktionsgemisch fluoreszenzmarkierte 2'-3'-Didesoxynukleotid-5'-Triphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), deren Einbau in die Nukleotidkette zu einem basenspezifischen Abbruch der Sequenzierreaktion führt, da ihnen die notwendige 3'-OH-Gruppe für die weitere Bildung einer 5'-3'-Phosphodiesterbindung fehlt. Der Einbau eines Didesoxynukleotids erfolgt dabei stochastisch entsprechend seiner Konzentration im Sequenzieransatz, die wesentlich geringer als die des vergleichbaren Desoxynukleotids ist.

So entstehen DNA-Fragmente, die sich in ihrer Länge jeweils um ein Basenpaar unterscheiden. Diese DNA-Fragmente lassen sich in einem Polyacrylamidgel auftrennen. Während der Gelelektrophorese detektiert ein Laser die zeitversetzt ankommenden basenspezifisch mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Kettenabbruchprodukte, aus deren konsekutiver Abfolge sich die Matrizensequenz ableiten lässt. Die Fluoreszenz der Didesoxynukleotide wird dabei von einer Kamera aufgenommen. Abschließend können die Elektropherogramme mit Hilfe entsprechender Software ausgewertet werden.

3.1.10 Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierung der HLA-A*6602 / 6603 Gene wurden zwei vektorspezifische und zwei genspezifische Primer (s. 2.8.3) verwendet.

Die verwendeten Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL nach vorgegebener Sequenz synthetisiert. Die Konstruktion der Primer erfolgte anhand der Sequenz des *pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®] TA* Vektors und der publizierten HLA-A Gensequenz (www.anthonynolan.org.uk).

Verwendet wurden für die Sequenzierung in 5'-3'-Richtung der vektorspezifische Primer *pcDNA-3.1S*, für die Sequenzierung in Antisense-Richtung der Primer *pcDNA3.1AS*, welcher hinter dem inserierten DNA Abschnitt im Vektor liegt.

Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem *BigDye[®] Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit* durchgeführt. Das Gesamtvolumen eines Sequenzieransatzes betrug 10 µl und bestand aus 2 µl Plasmid-DNA, 4,5 µl ddH₂O, 2 µl Ready Reaction Mix (aus dem Kit) und 1,5 µl Sequenzierprimer (1 pmol/µl). Anschließend erfolgten die Sequenzierreaktionen in einem GeneAmp PCR System 9700 Thermocycler.

Programm für die Sequenzierung:

Reaktionsschritt	PCR		
		Zeit	Temperatur
Denaturierung	1x	1 min	94°C
Denaturierung	35x	10 sec	96°C
Hybridisierung		5 sec	50°C
Elongation		4 min	60°C
Aufbewahrung			4°C

3.1.11 Aufreinigung der Sequenzierprodukte

Eine Aufreinigung der Sequenzierprodukte ist notwendig, um nicht inkorporierte Dye Terminatoren zu entfernen, die anderenfalls sog. Dye-Blobs hervorrufen können. Als Dye-Blobs werden Artefakte bei der Sequenzierdarstellung bezeichnet, die durch Farbstoffüberlagerungen entstehen.

Nach den PCR-Sequenzierreaktionen wurden die Sequenzierprodukte über mit Sephadex™ G-50 Fine beladene MicroSpin™ G-50 Columns³⁰ aufgereinigt. Dazu wurde 1 g Sephadex™ G-50 Fine Pulver in 12 ml HPLC-Wasser (ausreichend für etwa 15 Säulen) gelöst und nach 15-minütiger Quellzeit auf die MicroSpin™ G-50 Columns verteilt. Anschließend wurden die Säulen durch eine 2 min Zentrifugation bei Raumtemperatur und 2500 rpm von überschüssigem Wasser befreit. Auf die hierbei entstandenen schrägen Auftragsflächen des Sephadex wurden die Sequenzierprodukte aufgetragen und die Säulen 1 min bei Raumtemperatur und 2500 rpm zentrifugiert. Die so aufgereinigten Sequenzierprodukte konnten nun analysiert werden.

3.1.12 Automatische Auftrennung und Analyse der Sequenzierprodukte am ABI Prism 3100 Genetic Analyzer

Der ABI Prism 3100 Genetic Analyzer ist ein Kapillarsequenzierer, dessen 16 mit ABI Prism® 3100 POP-6™ Polymer gefüllte Glaskapillaren die Auftrennung von Sequenzierprodukten nach ihrer Länge ermöglichen. Die Fluoreszenz der Didesoxynukleotide wird bei diesem Verfahren durch einen Argonlaser angeregt und durch eine CCD- (engl.: charge-coupled device) Kamera aufgenommen. Die dabei verwendete Mikrotiterplatte (MicroAmp® Optical 96-Well Plate³¹) erlaubt eine Auftrennung im 96er Maßstab.

Die aufgereinigten Sequenzierprodukte (s. 3.1.11) wurden zur elektrophoretischen Auftrennung und Analyse nach einem definierten Wasserladeprotokoll (18 µl HPLC Wasser und 2 µl Sequenzierprodukt) in eine 96-Well Mikrotiterplatte überführt und in den ABI Prism 3100 Genetic Analyzer eingelegt. Die Elektrophorese und Datensammlung erfolgte durch die Data Collection Software Version 1.0.1. Nach der automatischen Auftrennung wurden die Elektropherogramme mit Hilfe der ABI Prism Sequencing Analysis Software ausgedruckt und manuell ausgewertet. So konnten mögliche Fehler der automatischen Analyse korrigiert werden.

3.2 Herstellen von stabilen sHLA-produzierenden humanen Zell-Linien

3.2.1 Kultivierung humaner Zellen

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% Kohlendioxid und 99% Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen.

Bei den verwendeten HEK293-Zellen handelt es sich um eine adhärente embryonale Nierenzelle. Die lymphoblastoide B-Zelle LCL 721.221 wächst in Suspension.

Zur Vermehrung der Zellkulturen wurden die Zellen einer Flasche entnommen, die Zellzahl bestimmt und die Zellen auf mehrere Gefäße aufgeteilt.

Die adhärenenten HEK293-Zellen mussten zunächst mit einer Trypsinlösung vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst werden. Hierzu wurde das Medium entfernt, die Zellkulturflasche mit PBS gespült und 2 ml Trypsin-EDTA / 75cm² Kulturoberfläche auf die Zellen gegeben. Nach Ablösen der Zellen wurden diese in Medium aufgenommen, durch Zentrifugation für 10 Min bei 1000 g abgetrennt und im Zellkulturmedium resuspendiert.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl unter Verwendung von Trypanblau

Von vitalen Zellen werden bestimmte Farbstoffe wie z.B. Trypanblau nicht aufgenommen. Jedoch ist die Zellwand abgestorbener Zellen für diese Farbstoffe permeabel. Aus einem Aliquot der Zellsuspension wurde ein definiertes Volumen mit 0,2% Trypanblau Lösung gemischt. Die Lebendzahl (Zahl der ungefärbten Zellen) konnte unter einem Phasenkontrastmikroskop in einer Neubauerzählkammer bestimmt werden. Aus der 1:1 Verdünnung der Probe mit der Farbstofflösung und dem Volumen der Neubauerkammer von $0,1 \text{ mm}^3$ ergab sich die Anzahl der Zellen wie folgt:

$$\text{Zellen/ml} = 2 \times 10^4 \times \text{Zellzahl}$$

Die Zellzahl gibt hierbei die durchschnittliche Anzahl der Zellen pro ausgezählter $1,0 \text{ mm} \times 1,0 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}$ Neubauerkammer an, wenn mehrere Kammern ausgezählt werden.

3.2.3 Kryokonservierung humaner Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen über einen Zeitraum von mehreren Jahren wurden $500 \mu\text{l}$ Zellsuspension ($4\text{-}5 \times 10^6/\text{ml}$) mit $500 \mu\text{l}$ Einfriermedium (FCS/10%DMSO) Die Gesamtzellzahl/ml versetzt. Die Suspension wurde langsam in Kryoröhrchen auf -70°C abgekühlt ($1^\circ\text{C}/10 \text{ min}$) und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen der Tiefkühlpräparate erfolgte rasch in einem 37°C Wasserbad.

3.2.4 Bestimmung der letalen Geneticin-Konzentration

Die für die Expression der trunkierten HLA Moleküle eingesetzten Expressionsvektoren vermitteln Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin. Für beide in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zell-Linien wurde die letale Geneticin-Konzentration bestimmt. Die letale Konzentration ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der 50% der Zellen absterben. In einer 24-well-Plate wurde eine Zellzahl von $1,5 \times 10^5/\text{ml}$ Medium eingestellt und eine definierte Menge an Geneticin zugefügt. Es wurde für jede Zell-Linie ein Konzentrationsprofil von $500 \mu\text{g}$ - $1700 \mu\text{g}$ Geneticin/ml Zellkulturmedium eingestellt. Die Zellen wurden regelmäßig 2 x wöchentlich mit frischem, Geneticin-haltigem Medium versorgt. Nach 14 tätiger Inkubation unter Standardbedingungen (3.2.1) wurde die letale Konzentration mikroskopisch durch Auszählen der vitalen Zellen (3.2.2) bestimmt.

3.2.5 Endotoxin-freie Aufreinigung der Expressionsvektoren

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen ist es notwendig, die zu verwendenden Expressionvektoren Endotoxin-frei aufzureinigen, da diese in *E. coli* amplifiziert wurden. Die Aufreinigung erfolgt unter Verwendung des *Endo free maxi plasmid kit*. Die Gewinnung der DNA erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie die Aufreinigung durch den *QIAprep Spin Miniprep Kit* (3.1.7).

250 ml der Übernachtskulturen (s. 3.1.6) wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend 15 Min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das bakterielle Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und mit 10 ml Puffer P2 lysiert. Die gesamte Suspension wurde vorsichtig invertiert und für 5 Min bei RT inkubiert. Zu dem Lysat wurden 10 ml des gekühlten Puffers P3 gegeben und vorsichtig invertiert. Das Lysat wurde in ein vorbereitetes, mit einer dem Kit beigelegte Spezialkappe verschlossenes, *QIAfilter Maxi Cartridge* überführt und bei RT für 10 Min inkubiert. Die Spezialkappe wurde entfernt und der Einsatz vorsichtig in das *QIAfilter Maxi Cartridge* gedreht. Das Zell-Lysat konnte nun in ein 50 ml-Zentrifugengefäß gefiltert werden. 2,5 ml Puffer ER wurden zu dem Filtrat gegeben, die Suspension mehrmals vorsichtig invertiert und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wurde ein *QIAGEN-tip 500* durch Zugabe von 10 ml Puffer QBT equilibriert. Das Lysat konnte nun in das *QIAGEN-tip 500* überführt und mittels Durchfluß filtriert werden. Anschließend wurde das *QIAGEN-tip 500* mit 2 x 30 ml Puffer QC durch Durchfluß gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QN eluiert. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol (RT) wurde die DNA präzipitiert. Nachdem die Suspension gut durchmischt wurde, erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 Min. Die DNA-Pellets wurden mit 5 ml Endotoxin-freiem vorbereitetem 70%-igem Ethanol (RT) gewaschen und für 10 Min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das getrocknete DNA-Pellet konnte nun in einem spezifischen Volumen an Endotoxin-freiem Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert werden.

3.2.6 Elektroporation von LCL 721.221-Zellen unter Verwendung des *Multiporator*

Das Einbringen von DNA (pcDNA3.1_A6602) in die lymphoblastoiden LCL 721.221-Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Hierzu wurde der *Multiporator* verwendet.

Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für 10 Min bei 300 g bei RT zentrifugiert. Nachdem die Zellen in RPMI/10% FCS Medium resuspendiert wurden, erfolgte eine weitere Zentrifugation. Das Zellpellet wurde daraufhin in hypoosmolarem Elektroporationspuffer resuspendiert, hierbei wurde eine Zellzahl von 2×10^7 /ml eingestellt. Bis zu einer Endkonzentration von 25 µg/ml wurde Endotoxin-freie Plasmid-DNA (3.2.5) zugefügt. 800 µl der Zell/DNA Suspension wurden in Elektroporations Küvetten (4 mm) pipettiert und diese in den *Multiporator* überführt. Die Elektroporation fand unter folgenden Bedingungen statt: Modus: eukaryote Zellen, 400 V, 50 µs, 2 Pulse. Nach dem Vorgang der Elektroporation wurden die Zellen für 5 Min bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt. Eine transiente Proteinexpression konnte nach 48 h nachgewiesen werden.

3.2.7 Transfektion von HEK293-Zellen unter Verwendung des *Fugene VI*-Transfektionsreagenz

Zum Einbringen von DNA (pcDNA3.1_A6603) in die HEK293 Zellen erwies sich die Methode der Lipofektion als geeignet. Zur Transfektion der HEK293 Zellen wurden $1-3 \times 10^5$ Zellen in eine 35 mm-Zellkulturschale gegeben und für 16 h unter Standardbedingungen kultiviert (3.2.1). Für die Transfektion wurden 2 µg Endotoxin-freie Plasmid-DNA (3.2.5), 6 µl *Fugene VI*-Transfektionsreagenz sowie 100 µl serumfreies Kulturmedium gemischt und für 20 Min bei RT inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde daraufhin zu den Zellen gegeben. Eine transiente Proteinexpression konnte nach 48 h nachgewiesen werden.

3.2.8 *Limiting dilution Assay* HEK und LCL

Die transfizierten Zellen (s. 3.2.6 und 3.2.7) wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Die zuvor für die jeweilige Zell-Linie bestimmte Geneticin-Konzentration (s. 3.2.4; 1.500 µg/ml für LCL 721.221; 1.000 µg/ml für HEK293) wurde dem Medium zugefügt. Nach ca. 2-3 Wochen war es möglich, stabile rekombinante Zellen nachzuweisen.

Um aus dem Pool dieser rekombinanten Zellen Einzelklone selektieren zu können, welche einen hohen Anteil an sHLA-Molekülen exprimierten, wurde ein LDA durchgeführt. Hierzu wurden die Geneticin-resistenten Zellen in einer Dichte von $1 \times 10^3/\text{ml}$ in 24-well Zellkulturplatten überführt und nach einer Kultivierungsphase von 3-4 Wochen der Zellkulturüberstand von jeder Vertiefung auf sHLA-Produktion mittels des beschriebenen ELISA (s. 3.2.9) überprüft.

3.2.9 Quantitativer Nachweis der sHLA-Moleküle im Zellkulturüberstand

Das Prinzip des ELISA wurde von Engvall et al. (1971) sowie von van Weemann und Schuurs (1976) entwickelt.

Ein ELISA kann einerseits für den Nachweis von Antikörpern und andererseits für den Nachweis von Antigenen eingesetzt werden. An eine feste Phase, oft bestehend aus einer Polystyrol-Mikrotiterplatte, ist einer der beiden Reaktionspartner (Antigen oder Antikörper) gebunden. Wird im darauf folgenden Arbeitsschritt eine Probe, die den anderen Reaktionspartner enthält, auf die feste Phase gegeben, entsteht eine Bindung zwischen Antigen und Antikörper. Dabei ist der Reagent, Antigen bzw. Antikörper, mit einem Enzym gekoppelt, welches eine mit einem Farbumschlag verbundene Reaktion eines farblosen Substrates katalysiert. Nach einem Waschschrift und Substratzugabe kann dieser Farbumschlag anschließend bei einer bestimmten Wellenlänge im Photometer gemessen werden.

Zur quantitativen Verifizierung der sHLA-Moleküle wurde das Prinzip des DAS-ELISA (engl.: Double Antibody Sandwich ELISA) angewendet. Beim DAS-ELISA wird ein Antikörper an eine feste Phase gebunden. An diesen Antikörper bindet dann das gesuchte Antigen. In einem weiteren Schritt ist über die Bindung eines zweiten Antikörpers der Nachweis des Antigens möglich. Dieser sog. Detektionsantikörper ist wie beim direkten ELISA mit einem Enzym gekoppelt, welches eine mit einem Farbumschlag verbundene Reaktion eines farblosen Substrates katalysiert.

Die ELISAs wurden in *96 Well Nunc Maxisorp™*-Platten durchgeführt. Als Beschichtungsantikörper wurden der monoklonale W6/32 sowie der anti-V5 Antikörper eingesetzt. W6/32 ist ein anti-HLA-ABC-Antikörper, welcher mit allen HLA-Klasse I Molekülen reagiert, die mit $\beta 2\text{m}$ assoziiert sind. Die AS Lys an Position 121 der schweren Kette sowie die AS 45 und 89 des $\beta 2\text{m}$ -Moleküls bilden die Bindestellen für den mAB W6/32. Anti-V5 ist ein monoklonaler Antikörper, welcher ein 14 Aminosäuren großes Derivat des P- und V-Proteins des Paramyxovirus erkennt (Southern et al. 1991). Dieser Antikörper wird für

die Detektion der rekombinanten sHLA-Moleküle verwendet, welche das V5-Epitop C-terminal tragen.

Als sekundärer Detektionsantikörper wurde der monoklonale anti- β 2m-HRP verwendet. Dieser Antikörper erkennt Epitope des β 2m. Die Detektion der sHLA-Moleküle über die Antikörper Kombination W6/32- β 2m-HRP bzw. anti-V5- β 2m-HRP gab Aufschluß über die korrekte Faltung sowie die Quantität der trunkierten rekombinanten sHLA-Moleküle im Zellkulturüberstand sowie in den Elutionsfraktionen nach Affinitätschromatographie (s. 3.3.5). Die Beschichtungsantikörper wurden 1:200 mit PBS verdünnt und jede Vertiefung mit je 100 μ l der Ak-Verdünnung bestückt. Es erfolgte eine Inkubation \bar{u} N bei 4°C. Am nächsten Morgen wurden die Mikrotiterplatten in einem ELISA-washer vier Mal mit PBS gewaschen. Jede Vertiefung wurde mit 250 μ l 5%-iger MP/PBST-Blockierungslösung befüllt und die Platten für 60 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Blockierungslösung wurden die Vertiefungen mit dem Standard bzw. der zu quantifizierenden Probe in spezifischer Verdünnung befüllt, die Verdünnung der Proben erfolgte in MP/PBST, Zielvolumen je 100 μ l. Jede Untersuchung wurde hierbei als Doppelbestimmung durchgeführt.

1	2	3	4	5	6	...
Standard 100 ng/ml		Pr 1 1:1		Pr 1 1:1		
Standard 50 ng/ml		Pr 1 1:2		Pr 1 1:2		
Standard 25 ng/ml		Pr 1 1:4		Pr 1 1:4		
Standard 12,5 ng/ml		Pr 1 1:8		Pr 1 1:8		
Standard 6,25 ng/ml		Pr 1 1:16		Pr 1 1:16		
Standard 3,125 ng/ml		Pr 1 1:32		Pr 1 1:32		
Standard 1,5625 ng/ml		Pr 1 1:64		Pr 1 1:64		
Blank (MP/PBST)		Pr 1 1:128		Pr 1 1:128		

Beispiel für die Belegung einer 96-well-Mikrotiterplatte. In Reihe 1 und 2 wurde in Doppelbestimmung der Standard aufgetragen

Als Standard wurde rekombinantes Protein mit His- und V5-tag eingesetzt, dessen Konzentration mit 100 ng/ml eingestellt wurde. Nach einer Inkubation für 120 Min bei RT wurde die Mikrotiterplatte vier Mal mit PBST gewaschen. Je Vertiefung wurden 100 μ l Detektionsantikörper (β 2m-HRP) bei einer Verdünnung von 1:500 in MP/PBST eingesetzt. Die Platten wurden 60 Min bei RT inkubiert und anschließend sechs Mal mit PBST gewaschen. Zu den Vertiefungen wurden je 100 μ l DAKO TMB+ pipettiert, die Platten für 10 min inkubiert und die Farbreaktionen mit 100 μ l saurer Stopplösung/Vertiefung abgestoppt. Die Messung der Farbreaktionen fand in einem ELISA-reader bei 450 nm statt.

Abschließend wurde die Standardkurve überprüft und die Konzentrationen der Proben durch die Software errechnet.

3.3 Large scale Produktion und Isolierung von sHLA-Molekülen

3.3.1 3-D Kultivierung von LCL 721.221-Zellen

Die größten Zelldichten und damit auch die größte Menge an Zellprodukt erhält man durch dreidimensionales Zellwachstum. Durch die Anwendung der Hohlfasertechnologie in dem modular aufgebauten (bis zu fünf Zellkulturkassetten / System), kompartimentierten Zellkultursystem *Tecnomouse*, in welchem Gas-, Kultivierungs-, (Extrikapillarraum = EC) und Nährstoffversorgungsraum (Intrakapillarraum = IC) durch gasdurchlässige Silikonmembranen bzw. durch die für niedermolekulare Komponenten permeablen Cuprophankapillaren (NMGT = 10 kDa) getrennt sind, konnte eine large scale Kultivierung von LCL 721.221_A6602-Zellen etabliert werden.

Dazu wurden 10^8 LCL 721.221_A6602-Zellen aus konventioneller Zellkultivierung in 10 ml 5%-igem Medium (s. 2.12.2) suspendiert und in den EC-Raum einer Kulturkassette inokuliert. Die Zufuhr von Nährstoffen bzw. die Abfuhr von niedermolekularen Stoffwechselendprodukten erfolgte über die den EC-Raum durchspannenden Hohlfasern (IC) durch Rezirkulation von 2 l Medium (s. 2.12.2). Die Durchflussgeschwindigkeit wurde auf 150 ml / h eingestellt. Eine homogene O₂- bzw. CO₂-Versorgung der Zellen wurde durch aktive Begasung des Kultivierungsraums mit H₂O gesättigtem 5%-igem CO₂/95% Luftgemisch über gasdurchlässigen Silikonmembranen, die apikal und basal den Zellen angelagert waren, sichergestellt. Die Zellkultivierung erfolgte bei 37°C.

Das rezirkulierende Medium im IC-Raum wurde wöchentlich gewechselt. Zur Entnahme der rekombinanten löslichen HLA-Moleküle wurde mit einer Kanüle einer leeren 10 ml Einwegspritze das Septum eines der drei Ernteports der Kulturkassette durchstoßen und die Spritze so langsam aufgezogen, daß sich ein Druckausgleich über langsames Nachströmen des Mediums durch die permeablen Kapillaren einstellen konnte. Die rekombinanten sHLA Moleküle wurden dreimal wöchentlich geerntet. Die Aufbewahrung des Überstandes erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C. Eine Kontrolle des Expressionsniveaus erfolgte regelmäßig mittels DAS-ELISA (s. 3.2.9).

3.3.2 Rollerflaschenkultivierung von HEK293-Zellen

Für die *large scale* Kultivierung von HEK293_A6603-Zellen wurden Rollerflaschen mit einer Wachstumsfläche von 900 cm² verwendet. In die Rollerflaschen wurden jeweils 300 ml Zellkulturmedium (s. 2.12.2) eingefüllt. Pro cm² Wachstumsfläche wurden ca. 2×10^4 HEK293_A6603-Zellen eingesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen (3.2.1) und bei einer Rollgeschwindigkeit von 1,5 Umdrehungen / Min. Zweimal wöchentlich wurde der Zellkulturüberstand geerntet. Die Aufbewahrung erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C. Eine Kontrolle des Expressionsniveaus erfolgte regelmäßig mittels DAS-ELISA (s. 3.2.9).

3.3.3 Aufbereitung der Zellkulturüberstände für die Affinitätschromatographie

Die gepoolten Zellkulturüberstände aus 3.3.1 und 3.3.2 wurden direkt vor Beginn der Affinitätschromatographie für 10 Min bei 1200 rpm zentrifugiert um Zellfragment-Rückstände zu entfernen, durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm filtriert und mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

3.3.4 Beladung der NHS-aktivierten *HiTrap* Säule mit einem Liganden

Der Einsatz von NHS (N-hydroxysuccinimid)-aktivierter Sepharose als Kopplungsreagenz bei Affinitätschromatographien wurde von Cuatrecasas et al. (1972) beschrieben.

NHS-activated HiTrap columns sind fertig gepackte Säulen mit NHS-aktivierter Sepharose zum Aufreinigen von Proteinproben mittels Affinitätschromatographie.

Durch Epichlorhydrin (3-Chlor-propylenoxid) sind an die Matrix der Sepharose-Kügelchen *Spacer* von 6-Atomen gebunden. Diese *Spacer* werden durch N-Hydroxy-succinimid aktiviert. Die primären Aminogruppen des Antikörpers werden kovalent an die aktivierten *Spacer* der Sepharose gebunden.

Vor der ersten Verwendung einer *NHS-activated HiTrap column* wurde ein Ligand (hier W6/32) an die Säule gekoppelt.

Die Effizienz der Ligandenkopplung sowie die optimale Ligandendichte werden gemessen und berechnet. Eine so hergestellte Affinitätssäule kann bis zu 1500mal zur Aufreinigung von z.B. rekombinanten Proteinen verwendet werden. In der anschließenden Affinitätschromatographie wird ein Substanzgemisch mit der zu isolierenden Komponente (hier sHLA-Moleküle) über die Affinitätsmatrix gegeben, wobei die zu reinigende Substanz

hochspezifisch an den immobilisierten Liganden bindet. Nach Durchführung eines oder mehrerer Waschschriffe zum Entfernen von Verunreinigungen wird die gewünschte Substanz durch eine Säureelution wieder vom Liganden getrennt.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit *NHS activated HiTrap columns* mit einem Volumen von 5 ml gearbeitet.

Vor der Kopplung des W6/32-Antikörpers (Mouse Anti Human HLA-ABC-Antikörper, Konzentration 1 mg/ml) an die Säulenmatrix (Säulenkapazität: 3 mg Ak pro ml Säulenmaterial) wurde dieser 1:1 mit Standard-Kopplungspuffer verdünnt und von dieser Ligandenlösung ein Aliquot für die Bestimmung der Kopplungseffizienz entnommen. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde anschließend die obere Kappe der Säule entfernt und ein Tropfen eiskalter 1 mM HCl auf die Säule gegeben. Das in der Säule befindliche Isopropanol wurde mit eiskalter 1 mM HCl ausgewaschen. Hierzu wurde eine 10 ml Spritze mit 1 mM HCl gefüllt und auf die obere Öffnung der Säule aufgeschraubt. Die untere Kappe wurde entfernt und die HCl-Lösung mit einer Flussrate von 5 ml / min auf die Säule aufgegeben. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nun wurden für die Kopplung des W6/32-Antikörpers 30 ml Ligandenlösung (15 ml Ak + 15 ml Standard-Kopplungspuffer) mit einer frischen 50 ml Spritze auf die Säule gegeben und der Durchlauf verworfen. Die Säule wurde an der oberen und unteren Öffnung mit den mitgelieferten Schraubverschlüssen verschlossen und für 30 Min bei 25°C inkubiert. Danach wurde die Säule durch Aufgabe von 15 ml Standard-Kopplungspuffer gewaschen und der Durchfluss für die Berechnung der Kopplungseffizienz gesammelt.

Im Folgenden wurde die Säule in mehreren Schritten gewaschen und dabei unspezifische Bindungen deaktiviert. Hierzu wurden hintereinander jeweils 30 ml Waschpuffer A, 30 ml Waschpuffer B und wiederum 30 ml Waschpuffer A mittels einer 50 ml Spritze bei einer Flussrate von 5 ml/min auf die Säule gegeben und die Durchläufe verworfen. Nach einer Inkubation von 30 Min bei RT wurde die Säule noch einmal durch Aufgabe von 30 ml Waschpuffer B, 30 ml Waschpuffer A und 30 ml Waschpuffer B mittels einer 50 ml Spritze bei einer Flussrate von 5 ml/min gewaschen. Abschließend wurden 10 ml Storage-Puffer (mittels einer 10 ml Spritze) bei einer Flussrate von 5 ml/min auf die Säule gegeben und der Durchlauf verworfen. Danach wurde die Säule in der Affinitätschromatographie eingesetzt.

Für die Bestimmung der Kopplungseffizienz des W6/32-Antikörpers an die *NHS aktivierte HiTrap Säule* wurde eine *HiTrap Desalting Column* mit einem Volumen von 5 ml verwendet. Die *HiTrap Desalting* Säule wurde mit 25 ml Equilibrierungspuffer bei einer Flussrate von 5 ml/min equilibriert. 0,5 ml des Durchflusses, der beim Waschen mit 15 ml Standard-Kopplungspuffer im Anschluss an die Ligandenkopplung aufgefangen worden war, wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die *HiTrap Desalting* Säule gegeben und der Durchlauf verworfen. Nun wurde die Säule mit 2 ml Equilibrierungspuffer beladen und der Durchlauf

erneut verworfen. Anschließend wurde der W6/32-Antikörper mit 1,5 ml Elutionspuffer von der *HiTrap Desalting* Säule eluiert, der Durchlauf aufbewahrt und die Extinktion bei 280 nm gemessen.

Die *HiTrap Desalting* Säule wurde nach einer Equilibrierung mit 25 ml 20%-igem Ethanol bei 4°C aufbewahrt.

Die Kopplungseffizienz des W6/32-Antikörpers wurde wie folgt berechnet:

aufgetragene Kopplungslösung:

A = A₂₈₀ (Ligandenlösung) x **Vol.** (aufgetragene Ligandenlösung)

Menge, die nicht gebunden hat:

B = A₂₈₀ (Eluat) x **Vol.** (Eluat) x **Vol.** (Waschpuffer nach Kopplung) / **Vol.** (auf *Desalting* Säule
gegebener Durchfluss)

Kopplungseffizienz (%) = (A-B) / A x 100

A₂₈₀ = Absorption bei 280 nm, Vol. = Volumen in ml

3.3.5 Aufreinigung der rekombinanten sHLA-Moleküle an immobilisiertem Antikörper

Die mit dem Antikörper W6/32 beladene Säule (s. 3.3.4) wurde mit bei einer Flussrate von 5 ml/Min mit 50 ml Start-Puffer und 50 ml Elutions-Puffer gewaschen. Nach einer Equilibrierung mit 50 ml Start-Puffer wurde der Zellkulturüberstand (s. 3.3.3) auf die Säule gegeben. Es erfolgte ein Waschschrift der Säule mit 50 ml Start-Puffer und danach die Elution der rekombinanten sHLA-Moleküle mit ca. 1-3 Säulen-Volumen Elutions-Puffer (5-15 ml), hierbei wurden Fraktionen von 1-2 ml Volumen gesammelt.

Eine quantitative Analyse der affinitätschromatographisch aufgereinigten Proben erfolgte durch den in Kap. 3.2.9 beschriebenen DAS-ELISA.

Zum Aufbewahren der *NHS-activated HiTrap* Säule nach der Probenelution wurde die Säule nach jeder Chromatographie mit 50 ml Start-Puffer, 50 ml Elutions-Puffer und 100 ml Start-Puffer gewaschen und danach mit 50 ml Storage-Puffer equilibriert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

3.4 Elektrochemische Verfahren zur Analyse der sHLA-Moleküle

3.4.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Das Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese geht auf Laemmli (1970) zurück.

Bei der Hitzdenaturierung von Proteinen in Gegenwart eines Überschusses an SDS und DTT bildet sich ein Komplex aus SDS (Dodecylsulfat-Natriumsalz) und denaturiertem Protein, dessen stark negative Ladung der Masse des Proteins in etwa proportional ist. Im elektrischen Feld trennt der Molekularsiebeffekt einer Polyacrylamidmatrix solche SDS-Proteinkomplexe nach ihrem Stokes-Radius auf, wobei deren Wanderungsgeschwindigkeit logarithmisch von der Molekülgröße abhängt.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen erfolgten mit Hilfe des *Novex® Pre-Cast Gel Electrophoresis Guide*.

Die Probenauftragsmengen betragen 20 µl und bestanden aus den zu analysierenden Proben, welche 1:2 mit 2xTricine-SDS-Probenpuffer versetzt waren. Vor den Gelelektrophoresen wurden sämtliche Proben 5 Min bei 95°C denaturiert und 5 Min zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in 10-20% Tricine-Gele pipettiert. Die Elektrophoresen erfolgten in *XCell SureLock™ Mini-Cell* Gelelektrophoresekammern, die mit 1xTricine-SDS-Laufpuffer befüllt waren. Als Molekulargewichtsstandard wurde der „LMW-Marker“ verwendet. Die Auftrennung der Proteine fand bei einer Spannung von 125 V statt und wurde zu dem Zeitpunkt gestoppt, als die Bromphenolblau-Fronten die unteren Ränder der Gele erreichten (nach ca. 1 h). Die Gele wurden mit H₂O bidest. gewaschen und 20 Min mit *Simply Blue*-Lösung gefärbt. Mittels Coomassie-Färbung können ca. 2 µg Protein in einem Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden (Sedmark and Grossberg, 1977). Nach Entfärbung mit H₂O bidest. konnten die Gele analysiert und fotografiert werden.

3.4.2 Western-Blot und Immundetektion der sHLA-Moleküle

Das Prinzip des Western Blots geht auf Towbin et al. 1979 zurück.

Der Western Blot ist eine Methode, die den Transfer elektrophoretisch fraktionierter Proteine aus einer Gelmatrix auf eine PVDF-Membran ermöglicht. Das Produkt ist ein exaktes Replik der im Gel aufgetrennten Moleküle. Dabei bleibt unter geeigneten Bedingungen die Immunreaktivität der Proteine teilweise erhalten. Mit spezifischen Antikörpern lassen sich anschließend die Proteine direkt auf der Membran detektieren (Vaessen et al., 1981).

Die Durchführung der Western Blots erfolgte mit Hilfe des *Novex® Pre-Cast Gel Electrophoresis Guide*.

Anstatt des LMW-Markers wurde bei den SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen, die zur Vorbereitung der Western Blots durchgeführt wurden, der „Seebblue“-Marker verwendet.

Zunächst wurde die PVDF-Membran mit Methanol gewaschen und danach zusammen mit den *Transfer Pads* und den Filterpapieren in 1xTris-Glycin-Transferpuffer equilibriert. Nach der SDS-Gelelektrophorese erfolgte der Zusammenbau der *Blotting*-Apparatur entsprechend dem Protokoll. Der Proteintransfer auf die Membran fand in einer *XCell II™ Blot Module* Blotapparatur in 1xTris-Glycin-Transferpuffer für 60 Min. bei RT und einer Spannung von 25 V statt. Anschließend wurde die PVDF-Membran aus der Blotapparatur entnommen und über Nacht in 5% MP/TBST bei 4°C blockiert. Die Blockierungslösung wurde abgossen und die PVDF-Membran mit TBST gewaschen.

Zum Nachweis von der rekombinanten sHLA-Moleküle wurde die Membran mit dem jeweiligen Detektionsantikörper (1:5000 in 5% MP/TBST verdünnt) für 60 Min. inkubiert. Danach wurden die Membranen viermal mit TBST gewaschen. Die Entwicklung der Banden fand unter Zugabe von *TMB Blotting* Substrat statt. Abschließend wurde die Färbelösung abgossen, die Membran mit H₂O gewaschen und zwischen Papiertüchern getrocknet. Die Blots wurden analysiert und für die Datensammlung eingescannt.

3.4.3 Native isoelektrische Fokussierung

Zur biochemischen Typisierung von HLA-Varianten wird die isoelektrische Fokussierung eingesetzt. Diese Methode kam zur Anwendung, um die Reinheit und Qualität der rekombinanten HLA-A*66-Varianten zu detektieren. Durch die isoelektrische Fokussierung der rekombinanten, an W6/32 aufgereinigten Moleküle konnte sichergestellt werden, dass keine Verunreinigung mit nativen HLA-Molekülen aus den Zellen vorlag.

Diese Methode erlaubt die Trennung von Proteinen gemäß ihrem isoelektrischen Punkt. Hierbei wandert das zuvor solubilisierte Protein in einem immobilisierten pH-Gradienten im

elektrischen Feld bis zu der Stelle an dem seine Nettoladung gleich Null ist (isoelektrischer Punkt, pI). (Der pI hängt wesentlich vom Gehalt basischer und saurer Aminosäuren eines Proteins ab und kann bei ansonsten massengleichen Proteinen sehr unterschiedlich sein.)

Zur Ausbildung des notwendigen pH-Gradienten werden sogenannte lösliche Ampholine eingesetzt. Die Ampholine sind heterogene Synthesegemische aus niedermolekularen, aliphatischen Oligoamino-oligocarbonsäuren. Diese haben aufgrund ihres zwitterionischen Charakters die Fähigkeit, Proteine in Lösung zu halten. Der pH-Gradient richtet sich durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus, wobei die Trägerampholytmoleküle mit niedrigerem pI bis an das anodische, die mit höherem pI an das kathodische Ende des Gels wandern. Die anderen Trägerampholytmoleküle ordnen sich dazwischen in der Reihenfolge ihres pI an.

(Die im Rahmen dieser Arbeit vorliegenden Analysen der an W6/32 aufgereinigten sHLA-Moleküle wurden vom Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Der genaue Verfahrensablauf soll daher in der vorliegenden Promotionsschrift nicht weiter dargestellt werden.)

3.5 Sequenzierung und massenspektrometrische Charakterisierung der Liganden

3.5.1 Isolierung der Peptide aus den MHC-Molekülen

Die an W6/32 gereinigten MHC-Moleküle wurden in 0,1%-iger TFA aufgenommen, mit 10 %-iger TFA wurde der pH-Wert auf 2,0 eingestellt und für 10 Min. vorsichtig geschüttelt. Über Centricon-10-Filter mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa wurden die schwere Kette, β_2m und die Peptide durch Ultrafiltration bei 3600 g voneinander getrennt und in einer SpeedVac Zentrifuge auf 100-250 μ l aufkonzentriert.

3.5.2 RP-HPLC-Trennung der Liganden

Die Liganden mussten nach der Säure-Elution (s. 3.5.1) für die weitere Bearbeitung von Lösungsmitteln getrennt werden und zudem für die Einzelpeptidsequenzierung isoliert werden.

Die Trennung der Liganden erfolgte durch Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC). Die RP-HPLC wurde an einer PTH-C18-Säule (octadecylsilanisiertes Silicagel) durchgeführt.

Die stationäre Phase zur Durchführung einer RP-HPLC wird hergestellt, indem man Silane, welche mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituiert wurden, mit Silicagel reagieren lässt. Dabei wird die polare Oberfläche der Silicagel-Partikel mit einer unpolaren Schicht aus Alkanen überzogen und somit die Polarität umgekehrt (engl.: "reversed"). Als mobile Phase werden meist Mischungen aus Wasser oder Puffer und Acetonitril, Tetrahydrofuran (THF) oder Methanol als organische *Modifier* eingesetzt.

Zur Sequenzierung der fraktionierten Peptide kamen massenspektrometrische Methoden zur Anwendung.

Die RP-HPLC-Trennung der Liganden wurde von der Proteomics Abteilung der TopLab GmbH, Martiensried, durchgeführt.

3.5.3 N-terminale Pool Sequenzierung

Um Ankerpositionen der Liganden bestimmen zu können, bedient man sich der Methode der Pool-Sequenzierung. Ein Peptid-Pool einer definierten Subtypenvariante (hier HLA-A*6602 bzw. A*6603) wird N-terminal sequenziert. Aus den Angaben der Häufigkeit einer definierten Aminosäure an bestimmten Positionen in den Peptiden lassen sich Anker bzw. Hilfsanker errechnen. Die Anker werden definiert durch ein Vorkommen von 100 % aller vorhandenen Aminosäuren an einer spezifischen Position im Peptid, Hilfsanker weisen mindestens 50 % einer Aminosäure an dieser spezifischen Position auf (Falk et al., 1991).

Die N-terminale Pool-Sequenzierung eines Peptidgemisches wurde nach der von Falk et al. (1991) beschriebenen Methode durchgeführt.

Die Aminosäuresequenzanalyse bestimmt die Anzahl, Art und Reihenfolge der Aminosäurereste in einem Peptid. Die N-terminale Sequenzierung wird heute u. a. mit dem Verfahren des schrittweisen Edman-Abbaues in einer Modifikation nach Hunkapiller durchgeführt (Hunkapiller et al., 1983).

Im Edman-Abbau wird das Reagenz Phenylisothiocyanat (PITC) unter alkalischen Bedingungen an die freie N-terminale Aminogruppe eines Peptides gekoppelt, wodurch sich ein Phenylthiocarbamyl-(PTC-) Addukt bildet. Durch Waschschrte mit Ethylacetat werden überschüssiges Reagenz und Nebenprodukte der Reaktion entfernt. Nach Trocknung wird mit wasserfreier Säure ein nucleophiler Angriff des Schwefels des PTC-Adduktes an der Carbonylkomponente der ersten Peptidbindung induziert und so selektiv die N-terminale Aminosäure als heterocyclisches Derivat (Anilinothiazolinon) vom Peptid abgespalten. Das abgespaltene Aminosäurederivat wird vom Restpeptid mit Chlorbutan oder Ethylacetat durch Extraktion abgetrennt und dann in einem eigenen Kompartiment des Sequencers (der "conversion flask") zu einem stabileren Isomer, der PTH-Aminosäure umgelagert. Diese

PTH-Aminosäure wird online zu einem Narrow-bore HPLC System, dem PTH-Analyser, transferiert und dort in einem geeigneten *Reversed-Phase-System* in Anlehnung an die Vorschrift des Herstellers analysiert. Ein Detektionslimit für die meisten PTH-Aminosäuren beträgt ca. 500 Femtomol.

Die um eine Aminosäure kürzere Peptidkette kann dann weiteren Zyklen von Kopplung und Abspaltung unterworfen werden. Die Identifizierung der jeweils abgespaltenen Aminosäuren führte dann zu der Erstellung der Aminosäuresequenz. Eine eventuell vorhandene Amidierung der C-terminalen Aminosäure konnte beim Edman-Abbau nicht erkannt werden. Underivatisierte Cysteine oder Cystine, die in Disulfidbrücken involviert sind, werden fast vollständig beim Edman-Abbau zerstört und können nur in großen Mengen an Hand geringer, aber typischer Abbauprodukte identifiziert werden.

Zur Sequenzierung wurden 10 bis 100 pmol der auf Immobilon geblotteten Probe in die Reaktionskammer eines Protein Sequencers eingebracht und nach den Vorschriften des Herstellers sequenziert. Die Trennung der Phenylthiohydantion-Aminosäuren erfolgte "On-Line" in einem 140 C-PTH-Analyser.

Die Edman-Pool-Sequenzierung wurde von der Proteomics Abteilung der TopLab GmbH, Martiensried, durchgeführt.

3.5.4 Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)

Die Massenspektrometrie ist eine Analysetechnik zur Bestimmung der Masse freier Ionen im Hochvakuum. Ein Massenspektrometer besteht im einfachsten Fall aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Die MALDI-TOF-MS kann als spektrometrisches Verfahren zur Identifizierung von Proteinen bzw. Peptiden mit Hilfe der Bestimmung der Protein- bzw. Peptidmasse der daraus erzeugbaren Fragmente dienen. In der vorliegenden Arbeit kommt diese Methode zur Anwendung, um die mittels RP-HPLC (s. 3.5.2) getrennten Liganden aus den rekombinanten HLA-A*66 Molekülen zu fragmentieren und Einzelsequenzen zu bestimmen.

Die zu analysierenden Moleküle werden in einer UV-absorbierenden Matrix kokristallisiert. Diese Matrix wird durch einen Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm beschossen und absorbiert dessen Energie. Durch Übertragung der Energie von der Matrix auf die Probenmoleküle werden diese besonders schonend und ohne signifikante Fragmentierung ionisiert. Diese Ionen werden nun durch ein elektrostatisches Feld in Abhängigkeit ihrer Masse in Richtung eines Detektors beschleunigt, wo das eintreffende Ion registriert wird. Die Ionen-Quelle kann mit diversen Massenanalysatoren und Detektoren gekoppelt werden. Die

gängige Kombination der MALDI-Quelle ist der TOF (Time-Of-Flight) Analysator. Die Zeit, welche die Ionen benötigen, um ein feldfreies Hochvakuum ($p = 3 \times 10^{-8}$ mbar) bis zum Detektor zurückzulegen, wird gemessen und ist von der Beschleunigung des Ions und damit von dessen Molekülmasse abhängig. Mit dieser Zeit kann der TOF-Analysator die Ionenmasse/Ladung (m/z) bestimmen, welche dem Quadrat der Flugzeit proportional ist. Die MALDI-TOF-Analyse wurde von der Proteomics Abteilung der TopLab GmbH, Martiensried, durchgeführt.

4. Ergebnisse

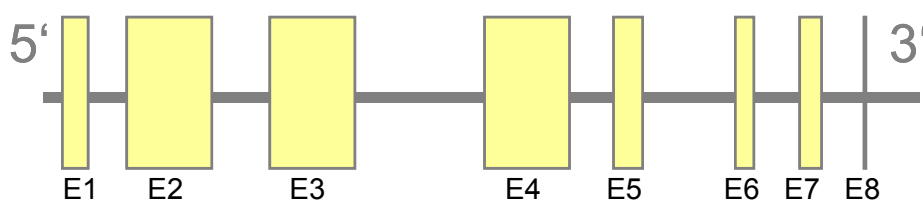
4.1 Klonierung der sHLA Moleküle

Als Expressionsvektoren für die trunkierten HLA Moleküle wurden Derivate des Plasmides pcDNA3.1V5/His eingesetzt, welche lösliches HLA-A*6602 sowie lösliches HLA-A*6603 synthetisieren. Hierzu wurde die entsprechende gDNA aus dem Blut typisierter Spender isoliert, mittels PCR amplifiziert und in den eukaryoten Expressionsvektor pcDNA3.1V5/His kloniert.

4.1.1 Amplifikation der A*6602- und A*6603-gDNA

gDNA wurde aus Vollblut isoliert und in eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt. Zur Amplifikation der gDNA wurden die Primer HLA-TAS und HLA-WAS eingesetzt. Hierdurch wurde der kodierende sowie der nicht-kodierende Bereich des HLA-Genabschnittes, Exon 1 bis Exon 4 amplifiziert (Abb. 4.1). Der zur Amplifikation des Genes verwendete Antisense Primer fügt kein Stopp-Codon ein, so dass Fusionsprodukte mit dem V5- und His-tag des Vektors am C-terminalen Ende der trunkierten HLA-A Moleküle entstanden.

Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des HLA-A Gens



Darstellung der Exon/Intron-Organisation von HLA-Klasse I Genen

4.1.2 Klonierung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte mit einer Größe von je 1.200 bp (Abb. 4.1) wurden direkt in eine *TOPO-TA* Ligationsreaktion eingesetzt und in *Top 10* Zellen transformiert, welche auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen wurden. Die Analyse der Platten erfolgte nach einer 16h Inkubation. Einige der Klone wurden direkt von den Transformationsplatten in Flüssigkulturen

beimpft und nach 24 Std. eine Isolierung der Plasmide durchgeführt. Die Verifizierung der isolierten Plasmide erfolgte mittels Restriktionsspaltung unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Hind* III und *Xba* I. Plasmide mit einer Insertion der erwarteten Größe wurden mit den vektorspezifischen Primern pcDNA3.1S und pcDNA3.1AS sequenziert.

4.2 Herstellen von stabilen sHLA-produzierenden Zelllinien

Zur Determination von Peptidsequenzen wurden trunkierte Varianten der Allele HLA-A*6602 und A*6603 hergestellt, welchen der cytoplasmatische Anteil fehlte, so dass die MHC-Moleküle in löslicher Form in den Zellkulturüberstand sezerniert wurden. Zur Expression der trunkierten HLA-Moleküle wurden zwei Zelltypen gewählt, die HLA-Klasse I defiziente lymphoblastoide Zelllinie LCL 721.221 und eine embryonale Nieren Zelllinie HEK293. Der Expressionsvektor pcDNA3.1 V5/His trägt das G418-Gen, womit den transfizierten Zellen eine Resistenz gegen Geneticin vermittelt wurde. Die transfizierten Zellen konnten 48 Std. nach der Transfektion durch Zugabe spezifischer Geneticin Konzentrationen selektioniert werden.

4.2.1 Endotoxin-freie Aufreinigung der Expressionsvektoren

Die Expressionvektoren mit sequenziertem Insert, pcDNA3.1V5/HisA*6602 und pcDNA3.1V5/HisA*6603, wurden für die Transfektion der humanen Zellen Endotoxin-frei aufgereinigt. Anschließend wurden die Plasmide mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung ein weiteres Mal untersucht, um gewährleisten zu können, daß durch die Kultivierung der Plasmide in *E.coli* keine Mutationen oder Deletionen auf DNA-Ebene entstanden waren.

4.2.2 Bestimmung der letalen Geneticin-Konzentration für die LCL 721.221-Zellen

Um eine Selektion der mit den Expressionsvektoren transfizierten LCL 721.221-Zellen mittels Geneticin durchführen zu können, mußte die letale Konzentration an Geneticin ermittelt werden. Für die LCL 721.221-Zellen ergab sich ein Wert von 1.500 µg Geneticin/ml Zellkulturmedium.

4.2.3 Elektroporation der LCL 721.221-Zellen

Die lymphoblastoide Zelllinie LCL 721.221 wurde mit den Endotoxin-freien Expressionsvektoren mittels Elektroporation transfiziert. Nach einer Inkubation von 48 Std. wurden die transfizierten Zellen in Vollmedium mit Zusatz von 1.500 µg/ml Geneticin aufgenommen und weitere drei Wochen inkubiert. Ein Mediumwechsel fand ein- bis zweimal wöchentlich statt. Nachdem die Zellen die Resistenzen entwickelt hatten, wurde ein *limiting dilution assay* (LDA) durchgeführt (s. Kap. 3.2.8).

4.2.4 Bestimmung der letalen Geneticin-Konzentration für die HEK293-Zellen

Um eine Selektion der mit den Expressionsvektoren transfizierten HEK293-Zellen mittels Geneticin durchführen zu können, mußte die letale Konzentration an Geneticin ermittelt werden. Für die HEK293-Zellen ergab sich ein Wert von 1.000 µg Geneticin/ml Zellkulturmedium.

4.2.5 *Fugene VI*-Transfektion der HEK293-Zellen

Die embryonale Nierenzelllinie HEK293 wurde mit den Endotoxin-freien Expressionsvektoren mittels *Fugene VI*-Transfektion transfiziert. Nach einer Inkubation von 48 Std. wurden die transfizierten Zellen in Vollmedium mit Zusatz von 1.000 µg/ml Geneticin aufgenommen und weitere drei Wochen inkubiert. Ein Mediumwechsel fand ein- bis zweimal wöchentlich statt. Nachdem die Zellen die Resistenzen entwickelt hatten, wurde ein LDA durchgeführt (s. Kap. 3.2.8).

4.2.6 Etablierung eines ELISA zur quantitativen Analyse sHLA-produzierender Zellen

Zum quantitativen Nachweis löslicher HLA-Moleküle im Zellkulturüberstand wurde ein Sandwich-ELISA etabliert, bei dem die Mikrotiter Platten mit dem mAk anti-HLA-A-B-C W6/32 beschichtet wurden. Der HRP konjugierte anti- β 2m mAk wurde als Detektionsantikörper eingesetzt. Da der konformelle Antikörper W6/32 den intakten trimeren HLA-Komplex aus *heavy chain* (hc), β 2 Mikroglobulin (β 2m) und gebundenes Peptid erkennt und mit dem zweiten Antikörper das β 2m detektiert werden konnte, war es in dieser Konstellation möglich, die korrekt gefalteten und funktionellen (Peptid-tragenden) Moleküle quantitativ zu erfassen.

Um spezifisch die rekombinanten sHLA-produzierenden Klone verifizierenden zu können, wurde ein weiterer ELISA etabliert. Da die rekombinanten HLA-Moleküle einen V5-tag trugen, war es möglich, eine quantitative Analyse der tHLA_A6602_V5- und tHLA_A6603_V5-Moleküle durchzuführen, indem der mAk anti-V5 als Beschichtungsantikörper vorgelegt und der HRP konjugierte anti- β 2m als Detektionsantikörper verwendet wurde.

Die Absorption der Proben wurde nach Testdurchführung mit einem Mikroplatten ELISA-reader bei 490 nm gemessen. Der LCL 721.221- beziehungsweise HEK293-Klon, welcher den höchsten Expressionswert an löslichem HLA (μ g/ml) aufwies, wurde zur weiteren Proteinproduktion eingesetzt.

4.2.7 Scale-up der sHLA-Produktion

Die kontrollierte Massenproduktion von sekretorischen Proteinen durch eukaryote Zellen ist wegen der hohen Anforderungen, die diese Zellen an Nährstoffe und Kultivierungsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur und Sauerstoffversorgung stellen, wegen des hohen Kontaminationsrisikos sowie der Empfindlichkeit der Zellen gegen Scherkräfte und toxische Stoffwechselprodukte schwierig. Um Zellkulturüberstand mit möglichst hoher Konzentration an rekombinanten sHLA-Molekülen zu erhalten, wurde ein LCL 721.22-Klon mit einer Konzentration von ca. 30 μ g tHLA_A6602_V5/ml ZKÜ in das Hohlfaserbioreaktor-System *Tecnomouse* überführt. Im Bioreaktor verdoppelte sich die tHLA_A6602_V5-Konzentration auf 70 μ g/ml.

Der höchste Expressionswert in HEK293 konnte bei einer Konzentration von ca. 40 µg tHLA_A6603_V5/ml ZKÜ ermittelt werden. Die HEK293-Zellen wurden erfolgreich in Zellkulturflaschen zur Proteinproduktion kultiviert.

4.2.8 Produktion von tHLA_A6602_V5-Molekülen in der Tecnomouse

Die *Large scale* Produktion der tHLA_A6602_V5-Moleküle wurde im Bioreaktor System *Tecnomouse* durchgeführt. Die LCL 721.221_A6602-Zellen wurden in *Tecnomouse Cell culture cassettes* überführt (3-5 x 10⁷ Zellen/*cell culture cassette*). Eine optimale Zell Vitalität sowie rekombinante Protein Produktion wurde durch Supplementation des Zellkulturmediums mit 10 % FCS im extrakapillaren Raum und mit 5 % FCS im intrakapillaren Raum des Hohlfaserreaktors erreicht. Die Flussrate des Mediums im intrakapillaren Raum, welcher mit einer 2 Liter Medium Flasche verbunden war, wurde auf 1,5 ml/Min. im Rezirkulation Modus eingestellt. Das Medium für den intrakapillaren Raum wurde wöchentlich ersetzt. Der tHLA_A6602_V5-haltige Überstand (10 ml/*cell culture cassette*) konnte zweimal je Woche geerntet werden. Die Produktion der tHLA_A6602_V5-Moleküle wurde regelmäßig mittels des beschriebenen DAS-ELISA überprüft (s. Kap. 3.2.9). Desweiteren wurde das Zellkulturmedium alle vier Wochen mit der spezifischen Konzentration an Geneticin (s. Kap. 4.2.2) versetzt, um Kontaminationen mit nicht Geneticin-resistenten, beziehungsweise nicht-tHLA_A6602_V5-produzierenden Zellen zu vermeiden. Sechs *Tecnomouse* Cassetten wurden verwendet, und der Zellkulturüberstand über einen Zeitraum von 6 ½ Monaten gesammelt.

4.2.9. Kultivierung von HEK293 / tHLA_A6603_V5-Zellen in Zellkulturflaschen

Die Produktion der tHLA_A6603_V5-Moleküle in HEK293 Zellen wurde in Zellkulturflaschen durchgeführt. Hierzu wurden 150 cm² Flaschen verwendet. Die Zellen wurden mit DMEM supplementiert mit 10% FCS kultiviert. Zweimal je Woche wurde der tHLA_A6603_V5-haltige Zellkulturüberstand (30 ml/Zellkulturflasche) geerntet und durch frisches Medium ersetzt. Die Produktion der tHLA_A6603_V5-Moleküle wurde regelmäßig mittels des beschriebenen DAS-ELISA überprüft (s. Kap. 3.2.9). Desweiteren wurde das Zellkulturmedium alle vier Wochen mit der spezifischen Konzentration an Geneticin (s. Kap. 4.2.4) versetzt, um Kontaminationen mit nicht Geneticin-resistenten, beziehungsweise nicht tHLA_A6603_V5-produzierenden Zellen zu vermeiden. Über einen Zeitraum von 3 Monaten wurden parallel 6 Zellkulturflaschen verwendet, welche 14-tägig ausgetauscht wurden.

4.3 Affinitätschromatographie zur Isolierung der sHLA-Moleküle aus dem Zellkulturüberstand

Zu Aufreinigung der sHLA-Moleküle wurde eine Affinitätschromatographie etabliert, die es ermöglichte, die rekombinanten Moleküle direkt aus dem Zellkulturüberstand zu isolieren. Drei Liter tHLA_A6602_V5-haltiger Zellkulturüberstand (aus LCL 721.221) sowie zwei Liter tHLA_A6603_V5-haltiger Zellkulturüberstand (aus HEK293) wurden unter Verwendung von NHS (N-Hydroxy-succinimid)-aktivierten *HiTrap* Säulen, an welche der mAk W6/32 gekoppelt wurde, chromatographisch aufgereinigt. Hierzu wurden die Überstände auf den pH Wert 8,0 eingestellt und über die Antikörpersäule geleitet. Die Elution der trimeren MHC-Komplexe von der Säule erfolgte durch Säure-Elution mit einem 0,1 M Glycin/HCl Puffer (pH 2,7).

4.3.1 Messung der Kopplungseffizienz des mAk W6/32 an die NHS-aktivierte *HiTrap* Säule

Die primären Aminogruppen des Antikörpers werden kovalent an die aktivierten *Spacer* der Sepharose gebunden. Es wurden 15 mg Antikörper an die Säule gebunden, die Kopplungseffizienz betrug 83,2%.

Die Kopplungseffizienz wurde wie folgt berechnet:

$$A = A_{280} \text{ (Ligandenlösung: Wert aus Punkt A.1.)} \times V \text{ (aufgetragenes Vol. Ligandenlösung: ml siehe Punkt A.1.)}$$

$$B = A_{280} \text{ (Adsorptionswert aus Punkt B.5.)} \times 1,5 \text{ (Elutionsvolumen, siehe B.5.)} \times 3 \text{ (Volumen des Koppl.-Puffers, siehe B.1.)}$$

$$0,5 \text{ (Volumen, mit dem die } HiTrap \text{ Desalting Säule beladen wurde, siehe B.3.)}$$

$$\text{Kopplungseffizienz (\%)} = A - B / A \times 100$$

Für die vorliegende Säule ergab sich eine Kopplungseffizienz von:

$$A = 6 \times 1 = 6$$

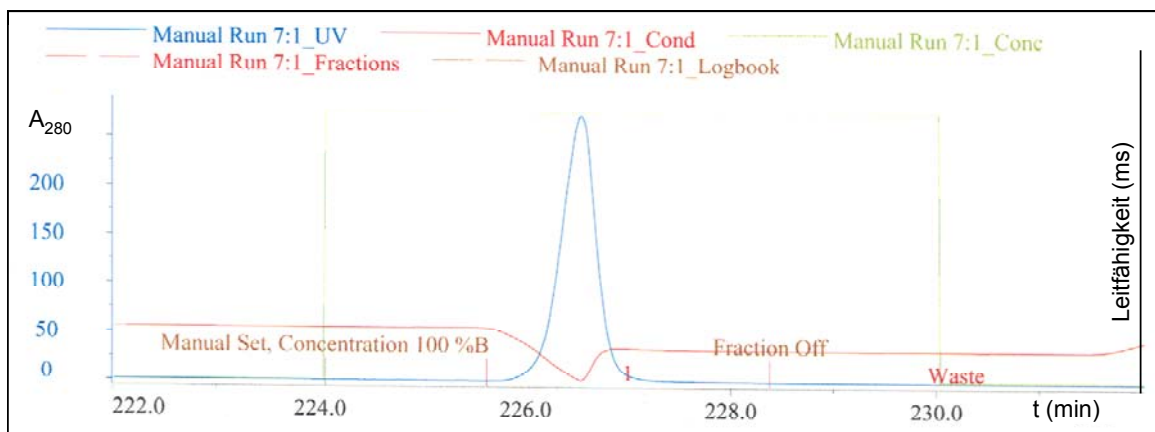
$$B = \frac{0,112 \times 1,5 \times 3}{0,5} = 1,008$$

$$\frac{6 - 1,008}{6} \times 100 = 83,2 \text{ \% Kopplungseffizienz des Liganden an die Säule}$$

4.3.2 Affinitätschromatographie unter Verwendung von NHS-aktivierten *HiTrap* Säulen

Die Affinitätschromatographie wurde wie beschrieben am *Äktaprime* Gerät durchgeführt (Abb. 4.3). Die Endkonzentration der aufgereinigten Proteinfractionen betragen 200 mg aufgereinigtes tHLA_A6602_V5 sowie 40 mg gereinigtes tHLA_A6603_V5.

Abbildung 4.2: Elutionsprofil der Affinitätschromatographie



Elutionsprofil der Affinitätschromatographie an immobilisiertem mAb W6/32. Aufreinigung von tHLA_A6602_V5-Molekülen.

Die UV-Absorption bei 280 nm (blaue Linie) zeigt einen Peak zwischen 226 und 227 Min., die Leitfähigkeit ist in mS (rote Linie) gezeigt.

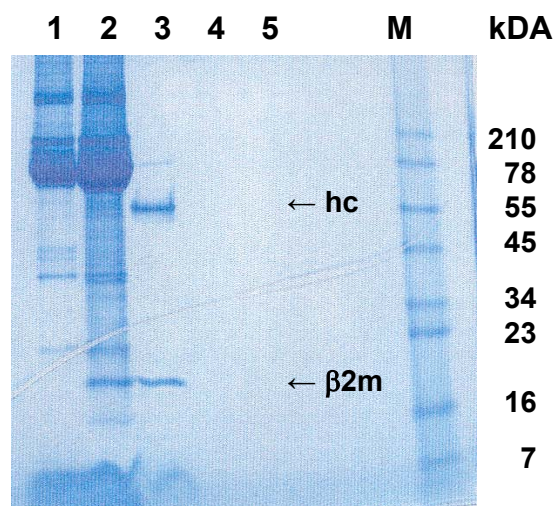
4.4 Analyse der sHLA-Moleküle nach Affinitätschromatographie

Die affinitätschromatographisch aufgereinigten tHLA_A6602_V5- und tHLA_A6603_V5-Proteine wurden einer Reinheitskontrolle unterzogen, um sicherstellen zu können, dass bei keiner der Elutionsfraktionen eine Kontamination mit nativem HLA aus den verwendeten Zellen vorlag. Hierzu wurde zur Kontrolle der tHLA_A6602_V5-Moleküle eine isoelektrische Fokussierung durchgeführt, zur Reinheitskontrolle der tHLA_A6603_V5-Moleküle wurde ein *Peptide-mass-fingerprint* gewählt.

4.4.1 SDS-PAGE zur qualitativen Analyse der sHLA-Moleküle

Die Reinheit der sHLA-Moleküle kann semiquantitativ mit Hilfe einer SDS-PAGE bestimmt werden. Durch die Färbung eines Polyacrylamidgeles mit *Coomassie Blue* lassen sich 1-50 µg Protein pro Bande nachweisen. Es war somit möglich Verunreinigungen wie zum Beispiel FCS (bzw. andere Proteine) aus dem Zellkulturüberstand in den Elutionsfraktionen zu detektieren. Durch die Aufreinigung an W6/32 gelang es, reine HLA-Fractionen zu erhalten, welche direkt für die Peptidisolierung eingesetzt werden konnten.

Abbildung 4.3: SDS-Polyacrylamidgel der affinitätschromatographisch an W6/32 aufgereinigten Fraktionen



Spur 1: ZKÜ nicht transfizierter LCL 721.221 Zellen

Spur 2: ZKÜ tHLA_A6602_V5 produzierender LCL 721.221-Zellen

Spur 3: Elutionsfraktion tHLA_A6602_V5

Spur 4: an W6/32 aufgereinigter ZKÜ aus nicht transfizierten LCL 721.22- Zellen (Neg. Kontr.)

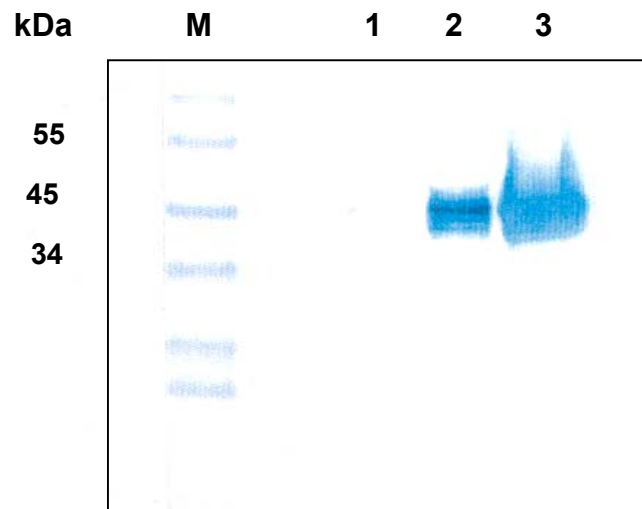
Spur 5: an W6/32 aufgereinigter ZKÜ aus nicht transfizierten HEK293-Zellen (Neg. Kontr.)

M: Proteinmarker

4.4.2 Immunoblot zur qualitativen Analyse der sHLA-Moleküle

Zur genaueren Analyse der Ergebnisse wurden Immunoblots durchgeführt.

Abbildung 4.4: Immunoblot der durch Affinitätschromatographie gereinigten sHLA-Moleküle unter Verwendung des monoklonalen Antikörper Ly5.1



Die Proteindetektion erfolgte durch den monoklonalen Antikörper Ly5.1, der die denaturierte hc des MHC-Moleküls erkennt.

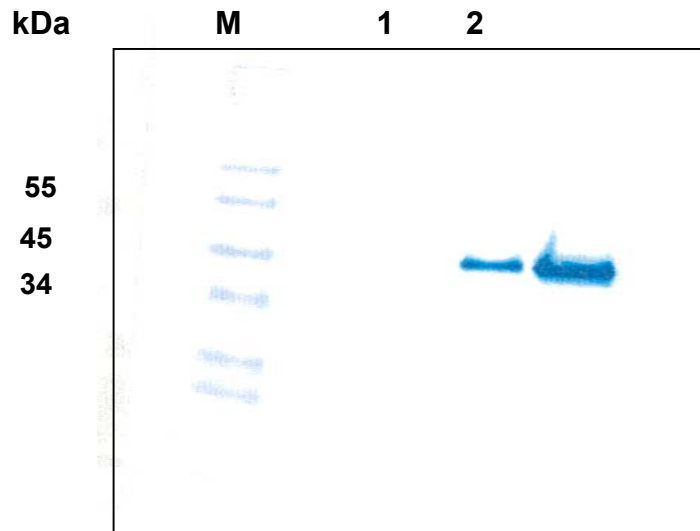
1 = LCL 721.221 Zellkulturüberstand (Neg. Kontrolle)

2 = gereinigtes tHLA_A6603_V5

3 = gereinigtes tHLA_A6602_V5

M= Proteinmarker

Abbildung 4.5: Immunoblot der durch Affinitätschromatographie gereinigten sHLA-Moleküle unter Verwendung des monoklonalen Antikörper anti-V5 HRP



Die Proteindetektion erfolgte durch den monoklonalen Antikörper anti-V5 HRP, der den C-terminalen V5-tag an der hc des MHC-Moleküls erkennt.

1 = LCL 721.221 Zellkulturüberstand (Neg. Kontrolle)

2 = gereinigtes tHLA_A6603_V5

3 = gereinigtes tHLA_A6602_V5

M= Proteinmarker

Abbildung 4.6: Immunoblot der durch Affinitätschromatographie gereinigten sHLA-Moleküle unter Verwendung des monoklonalen Antikörper anti-β2m HRP

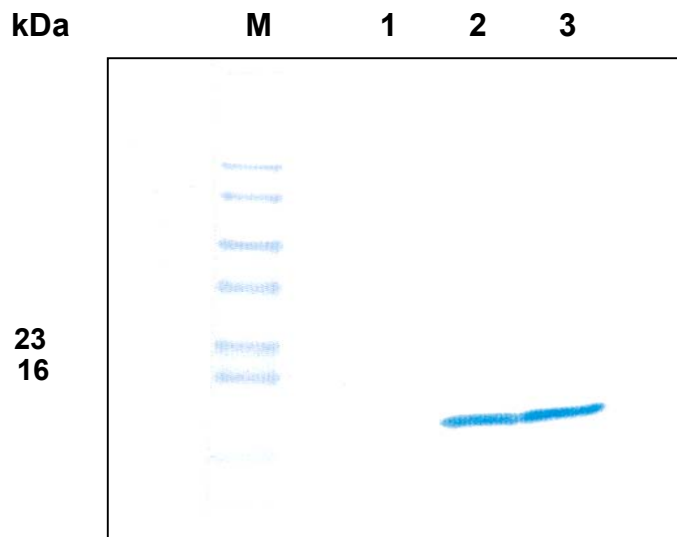


Abb. 4.6 Immunoblot der gereinigten sHLA-Moleküle nach Affinitätschromatographie. Die Proteindetektion erfolgte durch den monoklonalen Antikörper anti-β2m HRP, der das β2m erkennt.

1 = LCL 721.221 Zellkulturüberstand (Neg. Kontrolle)

2 = β2m des gereinigten tHLA_A6603_V5

3 = β2m des gereinigten tHLA_A6602_V5

M= Proteinmarker

4.4.3 Sandwich-ELISA zur quantitativen Analyse der sHLA-Moleküle

Eine quantitative Analyse der sHLA-Moleküle wurde mittels des beschriebenen ELISA durchgeführt (s. Kap. 3.2.9).

4.4.4 *Peptide-mass-fingerprint* zur qualitativen Analyse der tHLA_A6603_V5 Moleküle

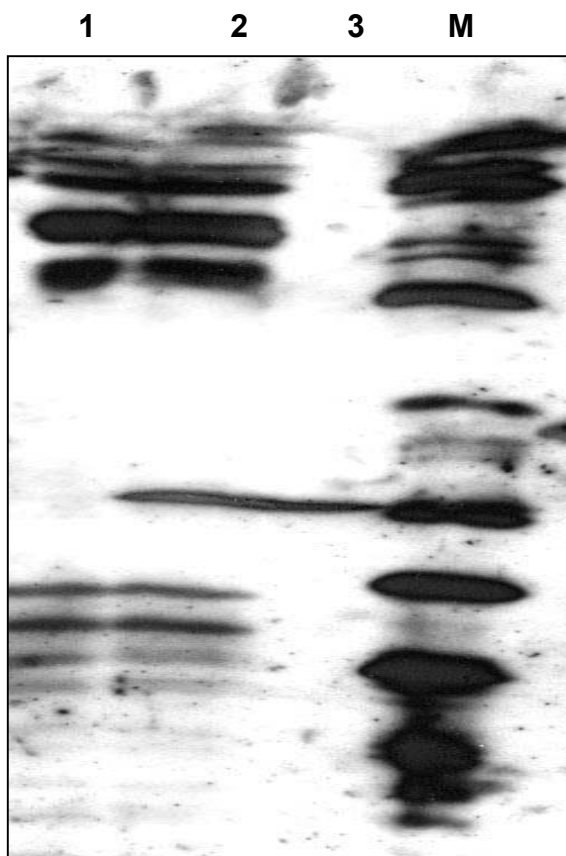
Die Möglichkeit einer schnellen Protein Identifikation einer Proteinprobe bietet die Methode des *Peptide-mass-fingerprint* unter Verwendung der MALDI-TOF/MS Methode. Die Proteine wurden dafür tryptisch verdaut und das erhaltene Peptid-Massenspektrum einer Datenbankanalyse unterzogen.

HEK293-Zellen weisen eine membranständige native MHC-Klasse I Expression auf. Da eine Kontamination des Zellkulturüberstandes mit nativen MHC-Klasse I Molekülen nicht auszuschließen war, wurde von den mit dem HLA-ABC Antikörper W6/32 isolierten tHLA_A6603_V5-Proteinen ein PMF durchgeführt. Hierbei konnten ausschließlich Fragmente von HLA-A*6603-Molekülen festgestellt werden.

4.4.5 Isoelektrische Fokussierung zur qualitativen Analyse der tHLA_A6602_V5-Moleküle

Die MHC-Klasse I defiziente Zelllinie LCL 721.221 zeigt auf mRNA Ebene eine HLA-C Transkription (Shimizu et al. 1989). Um eine Kontamination der unter Verwendung des HLA-ABC Antikörpers W6/32 isolierten tHLA_A6602_V5-Proteinen mit HLA-C Molekülen ausschließen zu können, wurde eine IEF der gereinigten Fraktionen durchgeführt. Die IEF wurde in Kooperation mit Frau Dr. Vera Rebmann, Institut für Immunologie, Essen, durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein hoher Reinheitsgrad der Fraktionen, HLA-C Moleküle konnten nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 4.7: Isoelektrische Fokussierung der tHLA_A6602_V5-Moleküle



Die aufgereinigten Proteine weisen keine Kontamination mit anderen HLA-Molekülen auf.

1 = LCL 721.221 Zellkulturüberstand (Neg. Kontrolle)

2 = LCL / tHLA_A6602_V5 Zellkulturüberstand

3 = gereinigtes tHLA_A6602_V5

M = Marker Zell-Linie

4.5 Isolierung und Analyse der Peptide aus den sHLA-Molekülen

Die Peptide konnten mittels Säureelution von den sHLA-Molekül Komplexen getrennt werden. Für die Evaluierung der Peptidmotive wurde eine Edman Sequenzierung durchgeführt. Einzelpeptiddaten wurden durch massenspektrometrische Analysen generiert und anschließend eine Datenbankabfrage zur Ermittlung der Proteinherkunft durchgeführt.

Die Edman-Sequenzierung, die massenspektrometrischen Analysen sowie die Datenbanksuche wurden in Kooperation mit Dr. Friedrich Lottspeich und Dr. Thomas Halder, Toplab GmbH, Martinsried, durchgeführt.

4.5.1 Denaturierung des trimeren sHLA-Komplexes

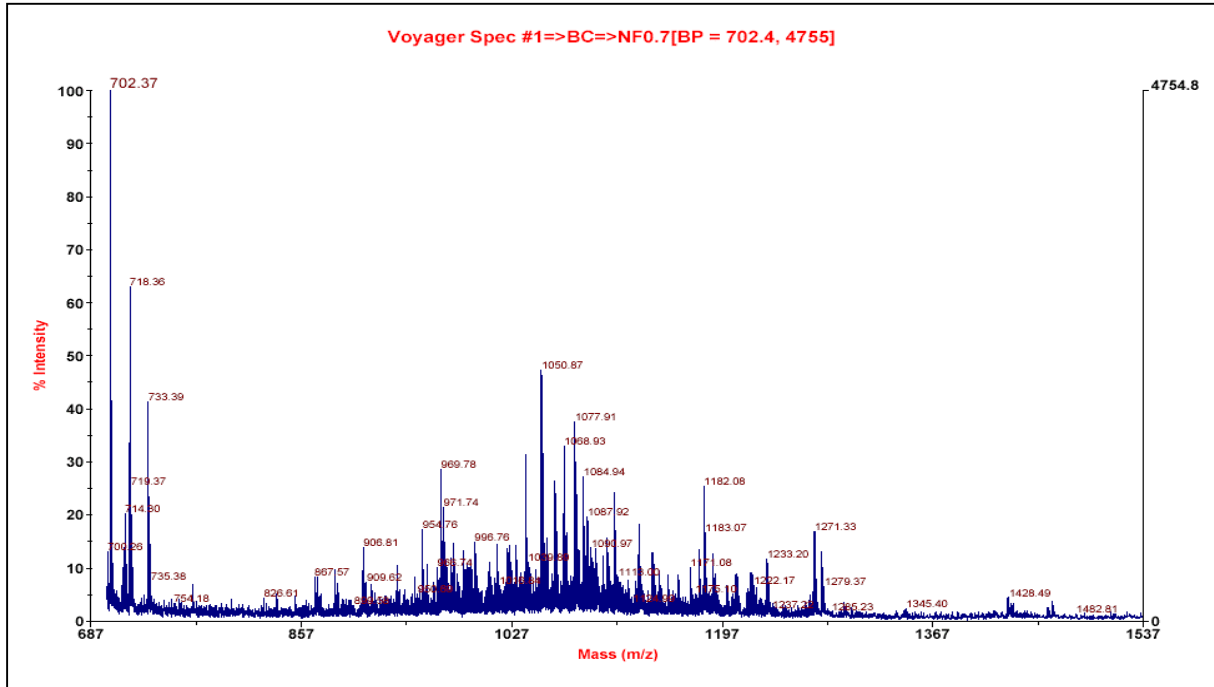
Die Peptide wurden eluiert, indem die aus der affinitätschromatographischen Aufreinigung erhaltenen tHLA_A6602_V5- beziehungsweise die tHLA_A6603_V5-Elutionsfraktionen mit 10% Eisessig versetzt und anschließend 10 Min. auf Eis inkubiert wurden. Die Isolierung der Peptide von β 2m und hc wurde mittels Filtration durch eine YM Membran mit einer 10 kD Ausschlußgrenze durchgeführt. Die Peptide befanden sich im Durchlauf.

4.5.2 RP-Chromatographische Trennung des Peptid-Gemisches

Da die Essigsäure zu Störungen bei der Massenspektrometrie sowie bei der Edman-Sequenzierung führen kann, wurden eine RP-HPLC durchgeführt.

4.5.3 Massenspektrometrische Auftrennung der Peptidfraktionen

Abbildung 4.8: Spektrum der MALDI TOF Analyse des Peptidpools aus tHLA_A6602_V5-Molekülen



MALDI TOF Spektrum. Jeder Peak zeigt eines oder mehrere Peptide (s. Tab. 4.1, Abb. 4.9). Die Daten wurden aus 60 µl Peptidpool generiert. Ausgangsmaterial für die Peptide waren 200 mg MHC-Protein.

Abbildung 4.9: MALDI TOF TOF Spektrum eines Liganden des humanen Hsp70 Proteins aus tHLA_A6602_V5-Molekülen

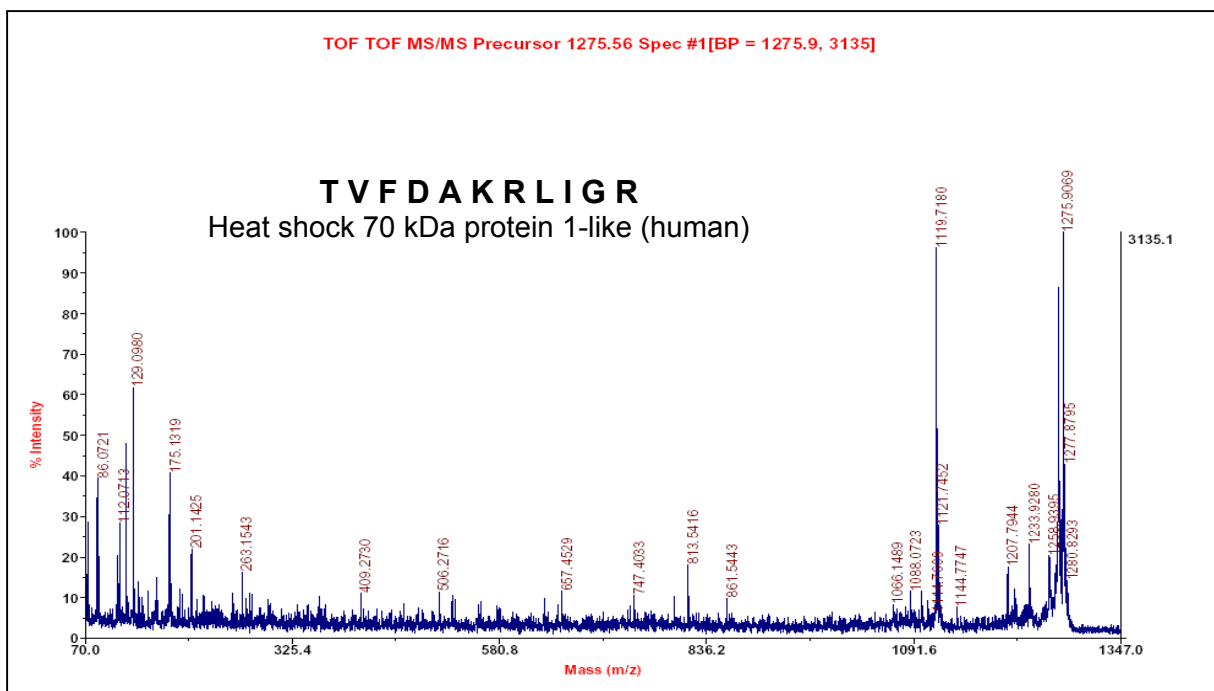
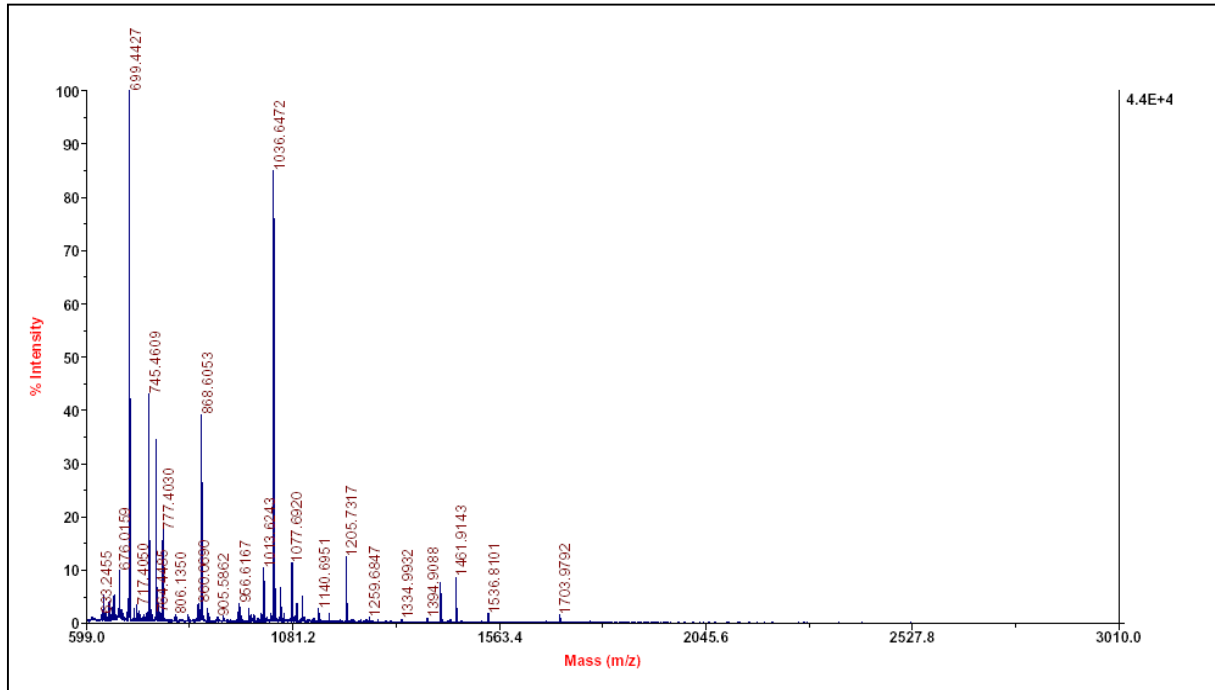
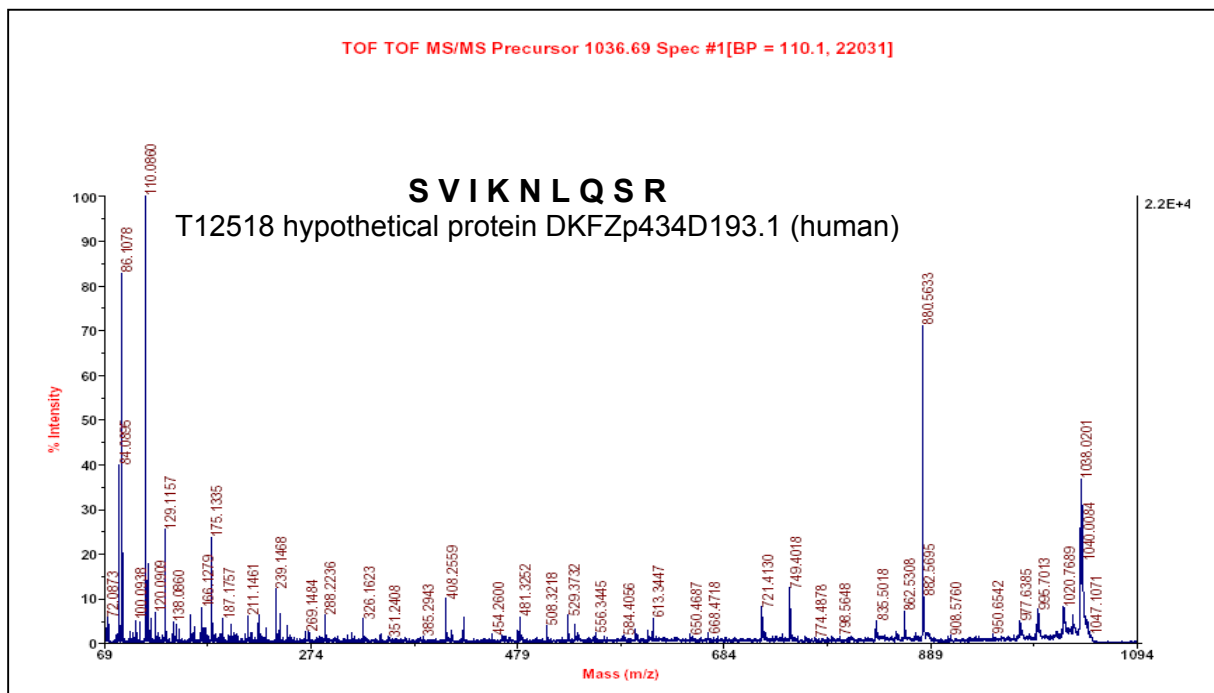


Abbildung 4.10: Spektrum der MALDI TOF Analyse des Peptidpools aus tHLA_A6603_V5-Molekülen



MALDI TOF Spektrum. Jeder Peak zeigt eines oder mehrere Peptide (s. Tab. 4.2, Abb. 4.11). Die Daten wurden aus 60 µl Peptidpool generiert. Ausgangsmaterial für die Peptide waren 40 mg MHC-Protein.

Abbildung 4.11: MALDI TOF TOF Spektrum eines Liganden des humanen DKFZp434D193.1 Proteins aus tHLA_A6603_V5-Molekülen



4.5.4 Analyse des erhaltenen Peptid-Spektrums aus tHLA_A6602_V5-Molekülen

Tabelle 4.1: Darstellung der MALDI TOF TOF sequenzierten Einzelliganden aus tHLA_A6602_V5-Molekülen

Liganden	Herkunft der Peptide	Accession #
R N L P M H L R	diff. expr. prot. in adenocarcinoma of lung, hum.	
L L I L L V Y C S	prob. G protein coupl. receptor GPR 61, hum.	21263687
K T K G S G F F V	Ig ε chain C region, hum.	119512
F L G H A P R N R	unknown	
L G G L L L N C C	monocarboxylattransporter 1, hum.	1082597
G T Y V S S V P R	MHC-DO-α cell glycoprotein, hum.	2135701
T V I P P G L T R	slicing factor SF1, hum.	2463198
S V K F G A T L R	ornithine decarboxylase	1910012
S S M F G T L P R	36.3 K zipper-containing protein, hum.	
F P S I V G R P R	β actin, hum.	
R P P G F S P F R	kininogen, hum.	4504893
E V A F P H H P R	hypothetical protein DKFZp434L2027.1, hum.	7512651
S A A H L F G Y R	human Acyl-CoA desaturase	2141730
S T I E Y V I Q R	sec23 protein, hum.	1296666
S T I G F K L P N H	erythrocyte protein 4.1 band	
S T V G I I G L G R	D-2-hydroxy-acid-dehydrogenase, hum.	
S T V G G W V S T R	alkylglycerone phosphate synthase precursor, hum.	4501993
G T I F I I K G V R	MHC, class II	AAP80750
S T Y Y G S F V T R	translation initiation factor eIF3 p40, hum.	3986482
S T F N F H P N V R	U5 snRNP-specific protein, 200-KD, hum.	
T T I S K Y F S E R	proteasome activator PA28 β chain, hum.	2136005
G S H S M R Y F Y T	MHC class I antigen, hum.	8977868
H V Y D G K F L A R	cholinesterase (alcylocholine acylhydrolase)	416795
E V V T G V I G Q R	guanylate cyclase=alternatively spliced, hum., 176aa	236895
S V V A V P C P L H R	α h11 Glycoprotein, bov.	2780675
A V F P S I V G R P R	T669 kinase, hum.	1362991
S T I G F K L P S Y R	chain A, 4.1r membrane binding protein	140903
S T I G F K L P N H R	putative lung tumor suppressor, hum.	3929114
T V F D A K R L I G R	heat shock 70 kDa protein 1-like, hum.	27436929
S T I T S R E I Q T A V R	H2B histone family, member F, hum.	10800140
S N F G P M K G G N F G G R	bA438F9.2, hum.	10697011

Zur Identifizierung Proteine aus den erhaltenen Peptidspektren wurde eine Datenbankanalyse unter Verwendung der Programme MASCOT (Hirosawa et al. 1993) und BLAST (Altschul et al. 1990) durchgeführt.

4.5.5 Analyse des erhaltenen Peptid-Spektrums aus tHLA_A6603_V5-Molekülen

Tabelle 4.2: Darstellung der MALDI TOF TOF sequenzierten Einzelliganden aus tHLA_A6603_V5-Molekülen

Liganden	Herkunft der Peptide	Accession #
G T Y V S S V P R	MHC-DO- α cell glycoprotein, hum.	2135701
N V A D L T S L R	PSE2_hum. proteasome activator complex subunit 2	
S V I K N L Q S R	T12518 hypothetical protein DKFZp434D193.1-hum.	
S T I E Y V I Q R	Sec23 protein, hum.	1296666
G T I F I I K G V R	MHC, class II, hum.	AAP80750
S V I N S V S T S R	transcription factor AP-4	

Zur Identifizierung Proteine aus den erhaltenen Peptidspektren wurde eine Datenbankanalyse unter Verwendung der Programme MASCOT (Hirosawa et al. 1993) und BLAST (Altschul et al. 1990) durchgeführt.

4.5.6 Edman-Pool-Sequenzierung der Peptide

Die PTH Aminosäuren werden quantitativ durch RP-HPLC erfaßt und über Retentionszeitvergleich mit einem vor der Sequenzanalyse erstellten Standardchromatogramm identifiziert.

Der Peptid-haltige Durchfluß (s. Kap. 4.5.1) wurde mit Hilfe von RP-HPLC gereinigt, die Peptide gepoolt und eine Edman-Sequenzierung des Peptidgemisches durchgeführt (Falk et. al 1991). Da die Pool-Sequenzierung eine statistische Aussage über Aminosäuren an spezifischen Positionen im Liganden ermöglicht, konnten anhand dieser Methode die präferentiellen Aminosäuren an Anker-Positionen ermittelt und Peptidmotive für das jeweilige Allel definiert werden.

4.5.7 Ergebnisse der Edman-Pool-Sequenzierung der Peptide aus tHLA_A6602_V5-Molekülen

Tabelle 4.3: Darstellung der Peptidmotive aus tHLA_A6602_V5-Molekülen

	Position								
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Anchors	<u>S</u>	V							R
		T							
Preferred	E	L	I	P	L	R	A	P	
	M	A	F	D	V	K	L	Q	
	F		K	N	P	T	M	E	
	G		Y	G	I		N		
	N		A	E	M		Y		
	A								

Es wurden neun Edman Zyklen durchgeführt, wobei hier P1 bis P9 Aminosäurepositionen im jeweiligen Liganden repräsentieren. Die Definition der Motive wurde wie beschrieben durchgeführt (Falk et. al 1991). **Fett:** Ankeraminosäuren, d.h. diese Aminosäuren sind an der jeweiligen Position bis zu 100 % vorhanden. Unterstrichen: Hilfsankeraminosäuren, definiert durch ein Vorkommen in der Pool-Sequenzierung an der spezifischen Position im Liganden von > 50 %.

4.5.8 Ergebnisse der Edman-Pool-Sequenzierung der Peptide aus tHLA_A6603_V5-Molekülen

Tabelle 4.4: Darstellung der Peptidmotive aus tHLA_A6603_V5-Molekülen

	Position								
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Anchors	<u>S</u>	V T							R
Preferred	M E	S A	I A F V	S A R F	L S P	R L	G R A L	G R S L	

Es wurden neun Edman Zyklen durchgeführt, wobei hier P1 bis P9 Aminosäurepositionen im jeweiligen Liganden repräsentieren. Die Definition der Motive wurde wie beschrieben durchgeführt (Falk et. al 1991). **Fett**: Ankeramino-säuren, d.h. diese Aminosäuren sind an der jeweiligen Position bis zu 100 % vorhanden. Unterstrichen: Hilfsankeramino-säuren, definiert durch ein Vorkommen in der Pool-Sequenzierung an der spezifischen Position im Liganden von > 50 %.

5. Diskussion

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) stellt eine potenziell kurative Therapieform für eine Reihe von hämatologischen und nicht-hämatologischen Systemerkrankungen dar und kann durch Matching der Humanen Leukozyten Antigene (HLA) Klasse I und II Allele von Spender und Patient deutlich optimiert werden. In Westeuropa und den USA ist jedoch nur für ca. 30% der für eine Stammzelltransplantation in Frage kommenden Patienten ein HLA genotypisch identischer Geschwisterspender verfügbar. Aus diesem Grunde besteht die Notwendigkeit, Blutstammzellen von HLA gematchten Fremd Spendern zu transplantieren, wobei insbesondere eine Übereinstimmung an den HLA-Klasse I Genorten HLA-A, B und C und an den Klasse II Genorten DRB1 und DQB1 für die Prognose der Patienten von großer Bedeutung ist.

Fortschritte bei der molekulargenetischen Charakterisierung von HLA haben zur Entdeckung einer ständig wachsenden Zahl von neuen HLA-Allelen geführt. Somit ist ein großer Donor-Pool notwendig, um die Wahrscheinlichkeit zu steigern, einen HLA-gematchten, unverwandten Spender zu finden. Stehen mehrere Spender mit jeweils unterschiedlichen HLA Einzel-Mismatches zur Verfügung, wird die vermutliche Allogenetität des Mismatches jedoch bei der Auswahl des endgültigen Spenders bisher nicht berücksichtigt, da dazu weder systematische in vitro- noch klinische Studien vorliegen. Ein wesentliches Problem bei der allogenen Blutstammzelltransplantation stellt die GVHD (Graft versus Host Erkrankung) dar, bei welcher Donor T-Lymphozyten Allo-HLA Merkmale des Empfängergewebes erkennen. Insbesondere die akute schwere GVHD ist mit einer hohen Mortalität verbunden. Es konnte gezeigt werden, dass HLA-Klasse I Mismatches starke Risikofaktoren für die Entstehung einer schweren akuten GVHD darstellen, wobei die Allogenetität einzelner definierter HLA-Mismatches jedoch bisher nicht spezifiziert werden konnte. Dadurch müssen „akzeptable“ Mismatches in Kauf genommen werden. Immunologische Abstoßungsreaktionen nach Transplantation können vermindert bzw. therapeutisch beherrscht werden, wenn zwischen Spender und Empfänger bestmögliche Kompatibilität besteht.

HLA-Klasse I Moleküle sind Rezeptoren für Peptide aus endogen prozessierten Proteinen. Der HLA-Peptid-Komplex wird vom TZR CD8+ T-Lymphozyten erkannt. Der Polymorphismus in den für die Peptid-Bindung verantwortlichen Regionen ist größtenteils für die serologischen HLA Typisierungstechniken nicht zugänglich. Innerhalb der serologischen Gruppen unterscheiden sich die Varianten durch Austausch von ein oder mehreren AS, welche überwiegend die PBR betreffen. Durch die AS-Austausche, welche oftmals auch Pocket B und F betreffen, ändert sich das Spektrum und die Konformation der zu bindenden Peptide.

Die Sequenzierung eluierter Peptide aus HLA-Molekülen hat es möglich gemacht, Gesetzmäßigkeiten hinsichtlich der Art konservierter Aminosäuren an Schlüsselpositionen der präsentierten Peptide zu erfassen.

Die Einschätzung von alloenen Epitopen, welche als potentielle Zielstrukturen für Host-versus-Graft (HvG), Graft-versus-Host (GvH) oder Graft-versus-Tumor (GvT) Reaktionen fungieren können, ist ein komplexes Problem. Ein Ligand muß bis zur Präsentation in einem HLA-Klasse I Molekül viele Filterstufen passieren. Das individuelle *single nucleotide profile* (SNP) bildet hier den wichtigsten alloenen Faktor. Die in der Zielzelle exprimierten Gene werden intrazellulär prozessiert, der letzte limitierende Filter für die Präsentation der Peptide ist das individuelle HLA-Profil.

In mehreren Studien konnten alloreaktive T-Zell Antworten zwischen HLA-Klasse I Subtypen nachgewiesen werden, sobald den T-Zellen ein verändertes Peptidspektrum präsentiert wurde. Dieses ist besonders dann der Fall, wenn AS Änderungen an dominanten Positionen im HLA-Molekül lokalisiert sind, wie in Pocket B oder F. Die Verankerung der Peptide erfolgt insbesondere über die AS Positionen P2 und die C-terminale Position (PQ), welche in den *specificity pockets* B und F gebunden werden. Je nach Zusammensetzung dieser Pockets werden dabei bestimmte AS präferentiell gebunden. Aus diesem Grund ist es von besonderer Bedeutung, die subtypenspezifischen Peptidbindungsmotive zu ermitteln. Ein Mismatch zwischen zwei Allelen an einer Position, welche für die Bildung einer Pocket verantwortlich ist, stellt somit vermutlich einen großen alloenen Faktor dar.

Auch konnten in Untersuchungen an B*44 Subtypen (HLA-B*4402 vs. HLA-B*4403), welche sich durch ein Asp156Leu Mismatch unterscheiden, alloreaktive T-Zellantworten nachgewiesen werden (Fleischhauer et al. 1994, Herman et al. 1999), obwohl beide Allele ein identisches Peptidbindungsmuster aufweisen. Die Alloreaktivität der T-Zellen entstand durch eine Änderung der $\alpha 2$ Helix-Konformation der schweren Kette des HLA-Moleküls. Mittels röntgenkristallographischer Analysen konnte gezeigt werden, daß der Asp156Leu Austausch in B*4403 die Öffnung der PBR leicht vergrößert und somit die Flexibilität zur Liganden-Selektion im Vergleich zu B*4402 erhöht hat.

Was hier jedoch als klinische Relevanz im Vordergrund steht, ist die Möglichkeit zur Spender-Empfänger-Auswahl über Peptidmotive und Pocketstrukturen. Zur Verifizierung des Peptid-Ursprungs ist dessen Sequenzierung unerlässlich.

Für die HLA-A*66 Subtypen, welche der serologischen A10 Gruppe zugeordnet werden, sind wenige Daten bezüglich Peptidbindungspräferenzen bekannt. Für das Allel A*6601 wurden Peptidmotive und -sequenzen (Seeger et al. 1999) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde die HLA-Klasse I defiziente Zelllinie LCL 721.221 mit der trunkieren Form des A*6602-Moleküls und die Nierenzelllinie HEK293 mit der trunkieren Form des A*6603 transfiziert. Die löslichen im Zellkulturüberstand befindlichen HLA-Moleküle konnten mittels Affinitätschromatographie isoliert werden. Aus den trimeren Komplexen wurden die Peptide

isoliert und mittels massenspektrometrischer Methoden charakterisiert. Durch eine Edman-Sequenzierung des jeweiligen Peptidpools war eine spezifische Definition von Peptidbindungsmotiven möglich.

Da sich die Polymorphismen der A*66-Varianten an Pocket-bildenden Positionen befinden, liefert die Untersuchung der Peptidbindungsmotive von A*66-Allelen wichtige Daten für die Gewichtung von allelischen Polymorphismen. Die ermittelten Peptidmotive der HLA-A*6602- und HLA-A*6603-Moleküle werden mit publizierten Daten für HLA-A*6601 (Seeger et al. 1999) verglichen.

Einfluß von AS Unterschieden zwischen HLA-A*66-Varianten auf die Peptidbindungsregion

Die Moleküle A*6601 und A*6602 unterscheiden sich durch zwei AS Polymorphismen (A*6601 Asp⁹⁰ → A*6602 Ala⁹⁰; A*6601 Arg¹⁶³ → A*6602 Glu¹⁶³). Position 90 ist außerhalb der PBR in der α 1 Domäne lokalisiert und nimmt somit auf die Peptidbindung keinen Einfluß. AS Position 163 hingegen ist in der α 2 Domäne lokalisiert und als Teil von Pocket A beschrieben worden (Garrett et al. 1989; Saper et al. 1991). A*6603 unterscheidet sich von A*6601 und A*6602 durch einen AS Austausch an AS Position 70, welche als Teil der Pockets B und C beschrieben wurde (A*6603 His⁷⁰ → A*6601/A*6602 Gln⁷⁰) (s. Tab. 2.2).

Als Resultat der Vielzahl allelischer Varianten im HLA System existiert eine große Menge Subtyp-spezifischer Peptidbindungsmotive. Vorhersagen für den Einfluß bestimmter AS im HLA Molekül auf die Peptidbindung sind somit Subtypenspezifisch und lassen sich nicht von einer allelischen Gruppe auf eine andere übertragen. Die Auswirkung der AS Austausche 70 und 163 auf die Ligandenbindung innerhalb der A*66-Gruppe konnte in der vorliegenden Arbeit verdeutlicht werden. Es stellte sich durch die Evaluierung der Peptidbindungsmuster heraus, dass insbesondere AS Position 163 maßgeblich an der Bindung beteiligt ist. Der Einfluß des Arg163Glu Austausches zwischen A*6601 und A*6602/A*6603 auf Pocket A und somit auf die N-terminale AS (P1) der in der PBR dieser Allele gebundenen Peptide konnte eindeutig gezeigt werden. Der Gln70His Austausch zwischen A*6601/A*6602 und A*6603 hingegen, welcher Pocket B zugeordnet ist, hatte innerhalb dieser Allel Gruppe keine Auswirkung auf die Anker Position P2 im korrespondierenden Peptid.

Funktionelle Studien in Zusammenhang mit Analysen aus Edman-Pool-Sequenzierungen eluierter Peptide haben gezeigt, daß die Positionen P2 und die C-terminale Position des Peptides, welche mit den Pockets B beziehungsweise F der PBR interagieren, von besonderer Bedeutung für die Bindung der Peptide sind (Falk et al. 1991; Parker et al. 1992).

Anhand der erhaltenen Peptidbindungsspektren konnten die Bindungsmotive für A*6602 und A*6603 verifiziert werden.

HLA-A*66 Peptidbindungsmotive

Die beschriebenen Peptidmotive für A*6601 lauten P2 Val/Thr und P Ω Arg/Lys (Seeger et al. 1999). Die A*66-Allele zeichnen sich durch eine zusätzliche Verankerung an der N-terminalen AS des Peptides (P1) aus. Hierbei handelt es sich definitionsgemäß um einen Hilfsanker, d.h. ein Vorkommen von mind. 50% der an P1 detektierten AS. Für A*6601 wurden an dieser Position Asp/Glu beschrieben.

Für A*6602 sowie für A*6603 wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls P2 Val/Thr und P Ω Arg als Peptid-Anker detektiert. Bei beiden hier untersuchten Allelen konnte jedoch Lys sowohl in der Edman-Pool-Sequenzierung als auch bei der massenspektrometrischen Einzel-Peptid Fragmentierung nicht als Anker an P Ω gefunden werden. Da Arg und Lys sehr ähnliche Eigenschaften (polar, alkalisch) aufweisen und die AS Unterschiede zwischen den A*66 Allelen keinen Einfluss auf Pocket F nehmen, besteht die wahrscheinlichste Erklärung darin, dass keine Peptide mit Lys an der C-terminalen Position generiert wurden.

Die Varianten A*6602 und A*6603 unterscheiden sich ausschließlich durch den AS Austausch Gln70His, welcher durch die Beteiligung an Pocket B und C, die Peptidbindung für P2 bzw. P3 potentiell beeinflusst.

Die ebenfalls zur serologischen A10 Gruppe gehörenden A*26-Varianten teilen mit den A*66-Varianten die gleiche AS Zusammensetzung für das Pocket B. Der einzige Unterschied besteht an AS Position 70. Hier weisen die A*26-Allele ebenso wie A*6603 ein His⁷⁰, A*6601 und A*6602 jedoch ein Gln⁷⁰ auf. Das P2 Peptidbindungsmotiv für A*2601, A*2602, A*2603 (Dumrese et al. 1998), A*6601 (Seeger et al., 1999), A*6602 und A*6603 ist identisch. Auch für die A*26-Varianten wurden Val/Thr als Anker definiert (Dumrese et al. 1998). Somit kann geschlossen werden, dass die Änderung His70Gln in Pocket B bei diesen Subtypen keinen Einfluß auf die Peptidbindung an P2 hat.

Eine starke Änderung des Peptidbindungsspektrums konnte jedoch für die N-terminale Peptid Position festgestellt werden, welche in Pocket A gebunden wird. Für P1 von A*6601 wurden Asp/Glu als Hilfs-Anker beschrieben, wobei beide saure Seitenketten besitzen (Seeger et al. 1999). Auch für A*6602 und A*6603 wurde an P1 ein Hilfs-Anker detektiert. Jedoch konnte hier Ser, welches eine polare neutrale Seitenkette besitzt, detektiert werden.

Die starke Änderung in den physikalischen und chemischen Eigenschaften der P1 Hilfs-Anker läßt sich eindeutig durch den Polymorphismus A*6601 Arg¹⁶³ → A*6602/A*6603 Glu¹⁶³ erklären. Änderungen an AS 163 beeinflussen maßgeblich die Bindungseigenschaften von Pocket A; der Austausch von Arg (polar, alkalisch) gegen Glu (polar, sauer) führte zu einer

Säuerung von Pocket A, dieses resultierte in einem Verlust der Präferenz saurer AS an P1 von A*6602/A*6603, was zur Präferenz der neutralen AS Ser führte.

Darüberhinaus spielen Wasserstoffbrücken-Bindungen eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen P1 und Pocket A, da Ser polar und damit hydrophil ist.

Klinische Anwendung

Die Änderung des Hilfs-Anker an Peptid Position P1 hat starke Auswirkungen auf das Spektrum der gebundenen Liganden der A*66-Allele. Dies sollte bei der Abschätzung der Allogentität zwischen A*6601 und A*6602/A*6603 berücksichtigt werden. Der Austausch von A*6602 vs. A*6603 (Gln70His) scheint keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten der korrespondierenden Liganden zu haben. Somit könnte die Kombination A*6602 vs. A*6603 einen permissiven Mismatch in der HSCT darstellen. Der A*6601 vs. A*6602 Austausch (Asp90Ala; Arg163Glu) stellt ebenso wie die A*6601 vs. A*6603 Variante (Gln70His; Asp90Ala; Arg163Glu) einen nicht-permissiven Mismatch in der HSCT dar.

Zur Evaluierung der klinischen Transplantationsrelevanz von Subtypenvarianten und zur Identifizierung akzeptabler HLA Antigendifferenzen wurden Algorithmen entwickelt, die auf der dreidimensionalen Struktur der HLA-Antigene, der Definition funktioneller Kompartimente des HLA Moleküls und deren Interaktion mit Antikörpern, antigenen Peptiden und dem T-Zell-Rezeptor (TZR) beruhen. Das als *Sequence Similarity Matching* bezeichnete Konzept (Elsner and Blasczyk, 2002) wurde in eine Software *HistoCheck* (Elsner et al. 2003) umgesetzt. Die detaillierte Kenntnis subtypenspezifischer Peptidbindungsmotive kann dazu beitragen, einzelne AS im HLA-Molekül unterschiedlich zu gewichten, um *HistoCheck* zu erweitern. Das mittelfristige Ziel ist die Erweiterung der Peptidmotiv-Datenbank von Schlüssel-Allelen, um

1. Vorhersagen für Peptidmotive treffen zu können, von Allelen für die noch keine experimentellen Daten zur Verfügung stehen.
2. Permissive und nicht-permissive Mismatches für die HSCT besser einschätzen zu können.
3. Grundlagen für gezielte Immuntherapien (Stammzelltransplantationen, therapeutische Ansätze mit Tetrameren und individuelle Vaccinierungen) bieten zu können.

6. Literaturverzeichnis

Aguado B, Milner CM, Campbell RD (1996) Genes of the MHC class III region and the functions of the proteins they encode. In HLA and MHC: genes, molecules and function. Edited by Browning M and McMichael A. Bios Scientific Publishers, Oxford: 39-75

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410

Ayyoub M, Stevanovic S, Sahin U, Guillaume P, Servis C, Rimoldi D, Valmori D, Romero P, Cerottini JC, Rammensee HG, Pfreundschuh M, Speiser D, Levy F (2002) Proteasome-assisted identification of a SSX-2-derived epitope recognized by tumor-reactive CTL infiltrating metastatic melanoma. *J. Immunol.* 168:1717-1722

Barnea E, Beer I, Patoka R, Ziv T, Kessler O, Tzevoval E, Eisenbach L, Zavazava N, Admon A. (2002) Analysis of endogenous peptides bound by soluble MHC class I molecules: a novel approach for identifying tumor-specific antigens. *Eur. J. Immunol.* 32:213-222

Barouch D, Friede T, Stevanovic S, Tussey L, Smith K, Rowland-Jones S, Braud V, McMichael A, Rammensee HG (1995) HLA-A2 subtypes are functionally distinct in peptide binding and presentation. *J Exp Med* 182:1847-1856

Benichou G (1999) Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci.* 4:D476-480

Beninga J, Rock KL, Goldberg AL (1998) Interferon-gamma can stimulate postproteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 273:18734-18742

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513

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

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

Bjorkmann PJ, Parham P (1990) Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem.* 59:253-288

Blasczyk R, Huhn D (1998) New diagnostic methods in oncology and hematology. Springer, Berlin. 143-184

Bluestone JA, Kaliyaperumal A, Jameson S, Miller S, Dick R 2nd (1993) Peptide-induced changes in class I heavy chains alter allorecognition. *J Immunol.* 151:3943-3953

Bouvier M, Wiley DC (1994) Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science* 265:398-402

Bowness P, Allen RL, McMichael AJ (1994) Identification of T cell receptor recognition residues for a viral peptide presented by HLA B27. *Eur J Immunol* 24:2357-2363

- Bowness P, Zaccai N, Bird L, Jones EY (1999) HLA-B27 and disease pathogenesis: new structural and functional insights. *Mol Med*
- Brusic V, Petrovsky N, Zhang G, Bajic VB (2002) Prediction of promiscuous peptides that bind HLA class I molecules. *Immunol Cell Biol* 80:280-285
- Brusic V, Rudy G, Harrison LC (1998) MHCPEP, a database of MHC-binding peptides: update 1997. *Nucleic Acids Res.* 26:368-371
- Buus S, Lauemøller SL, Worning P, Kesmir C, Frimurer T, Corbet S, Fomsgaard A, Hilden J, Holm A, Brunak S (2003) Sensitive quantitative predictions of peptide-MHC binding by a 'Query by Committee' artificial neural network approach. *Tissue Antigens.* 62:378-384
- Campbell RD, Trowsdale J (1993) Map of the human MHC. *Immunology Today* 14:349-352
- Celis E, Tsai V, Crimi C, DeMars R, Wentworth PA, Chesnut RW, Grey HM, Sette A, Serra HM (1994) Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:2105-2109
- Cerundolo V, Braud V (1996) Cell biology of MHC class I molecules. In *HLA and MHC: genes, molecules and function*. Edited by Browning M and McMichael A. Bios Scientific Publishers, Oxford: 193-223
- Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127:1550-1557
- Clark JM (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 16:9677-9686
- Cuatrecasas P, Parikh I (1972) Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose. *Biochemistry* 11:2291-2299
- Dick TP, Ruppert T, Groettrup M, Kloetzel PM, Kuehn L, Koszinowski UH, Stevanovic S, Schild H, Rammensee HG. (1996) Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86:253-262
- Dumrese T, Stevanovic S, Seeger FH, Yamada N, Ishikawa Y, Tokunaga K, Takiguchi M, Rammensee HG (1998) HLA-A26 subtype A pockets accommodate acidic N-termini of ligands. *Immunogenetics* 48:350-353
- Ehring B, Meyer TH, Eckerskorn C, Lottspeich F, Tampe R (1996) Effects of majorhistocompatibility-complex-encoded subunits on the peptidase and proteolytic activities of human 20S proteasomes. Cleavage of proteins and antigenic peptides. *Eur. J. Biochem.* 235:404-415
- Elsner HA, Blasczyk R (2002) Sequence similarity matching: proposal of a structure-based rating system for bone marrow transplantation. *Eur. J. Immunogenet.* 29:229-236
- Elsner HA, DeLuca D, Strub J, Blasczyk R (2004) HistoCheck: rating of HLA class I and II mismatches by an internet-based software tool. *Bone Marrow Transplant* 33:165-169
- Elsner HA, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, Bade-Doeding C (2005) Allele-specific peptide presentation of Human Leukocyte Antigens: Implications for tumor immunotherapy. *Anticancer Research*

- Engvall E, Jonsson K, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta* 251:427-434
- Falk K, Rotzschke O, Rammensee HG (1990) Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 348:248-251
- Falk K, Röttschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG (1991) Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290-296
- Falk K, Röttschke O, Takiguchi M, Grahovac B, Gnau V, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG (1994) Peptide motifs of HLA-A1, -A11, -A31, and -A33 molecules. *Immunogenetics* 40:238-241
- Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM (1995) Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81 :935-946
- Fleischhauer K, Avila D, Vilbois F, Traversari C, Bordignon C, Wallny HJ (1994) Characterization of natural peptide ligands for HLA-B*4402 and HLA-B*4403: implications for peptide involvement in allorecognition of a single amino acid change in the HLA-B44 heavy chain. *Tissue Antigens* 44:311-317
- Garrett TP, Saper MA, Bjorkman PJ, Strominger JL, Wiley DC (1989) Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 342:692-696
- Geier E, Pfeifer G, Wilm M, Lucchiari-Hartz M, Baumeister W, Eichmann K, Niedermann G (1999) A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* 283:978-981
- Geraghty DE (1993) Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. *Curr Opin Immunol* 5:3-7
- Goulmy E (1997) Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol Rev.* 157:125-140
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:36:59-74
- Groettrup M, Soza A, Kuckelkorn U, Kloetzel PM (1996) Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol. Today* 17:429-435
- Grommé M, Neefjes J (2002) Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 39:81-202
- Guan P, Doytchinova IA, Zygouri C, Flower DR (2003) MHCpred: A server for quantitative prediction of peptide-MHC binding. *Nucleic Acids Res* 31:3621-3624
- Güssow D, Rein RS, Ginjaar I, Hochstenbach F, Seemann GH, Kottmann A, Ploegh HL (1987) The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J Immunol.* 139:3132-3138
- Güssow D, Rein RS, Meijer I, de Hoog W, Seemann GH, Hochstenbach FM, Ploegh HL (1987) Isolation, expression and the primary structure of HLA-Cw1 and HLA-Cw2 genes: evolutionary aspects. *Immunogenetics.* 25:313-322

- Guillaudeux T, Rodriguez AM, Girr M, Mallet V, Ellis SA, Sargent IL, Fauchet R, Alsat E, Le Bouteiller P (1995) Methylation status and transcriptional expression of the MHC class I loci in human trophoblast cells from term placenta. *J Immunol.* 154:3283-3299
- Hammond C, Helenius A (1995) Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 7:523-529
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- Heath WR, Kane KP, Mescher MF, Sherman LA (1991) Alloreactive T cells discriminate among a diverse set of endogenous peptides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:5101-5105
- Herman J, Jongeneel V, Kuznetsov D, Coulie PG (1999) Differences in the recognition by CTL of peptides presented by the HLA-B*4402 and the HLA-B*4403 molecules which differ by a single amino acid. *Tissue Antigens.* 53:111-121
- Herrero Sanchez C, Reith W, Silacci P, Mach B (1992) The DNA-binding defect observed in major histocompatibility complex class II regulatory mutants concerns only one member of a family of complexes binding to X boxes of class II promoters. *Mol Cell Biol.* 12:4076-4083
- Hirosawa M, Hoshida M, Ishikawa M, Toya T (1993) MASCOT: multiple alignment system for protein sequences based on three-way dynamic programming. *Comput Appl Biosci* 9:161-167
- Hunkapiller MW, Hewick RM, Dreyer WJ, Hood LE (1983) High sensitivity sequencing with a gas phase sequencer. *Meth.Enzymol* 91:399-413
- Kavathas P, Bach FH, DeMars R (1980) Gamma ray-induced loss of expression of HLA and glyoxalase I alleles in lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4251-4255
- Kawakami Y, Robbins PF, Rosenberg SA (1996) Human melanoma antigens recognized by T lymphocytes. *Keio J. Med.* 45:100-108
- Kelly A, Powis SH, Glynn R, Radley E, Beck S, Trowsdale J (1991) Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* 353:667-668
- Kelly A, Powis SH, Kerr LA, Mockridge I, Elliott T, Bastin J, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Trowsdale J, Townsend A (1992) Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* 355:641-644
- Kern F, Surel IP, Brock C, Freistedt B, Radtke H, Scheffold A, Blasczyk R, Reinke P, Schneider-Mergener J, Radbruch A, Walden P, Volk HD (1998) T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat Med.* 4:975-978
- Kessler JH, Beekman NJ, Bres-Vloemans SA, Verdijk P, van Veelen PA, Kloosterman-Joosten AM, Vissers DC, ten Bosch GJ, Kester MG, Sijts A, Wouter Drijfhout J, Ossendorp F, Offringa R, Melief CJ (2001) Efficient identification of novel HLA-A(*0201)-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J. Exp. Med.* 193:73-88
- Kisselev AF, Akopian TN, Goldberg AL (1998) Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.* 273:1982-1989
- Klein J. (2000) Review. *N. Engl. J. Med.*

- Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W (1990) Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 76:2462-2465
- Kranz DM (2000) Incompatible differences: view of an allogeneic pMHC-TCR complex. *Nat Immunol*. 1:277-278
- Krausa P, Münz C, Keilholz W, Stevanovic S, Jones EY, Browning M, Bunce M, Rammensee HG, McMichael A (2000) Definition of peptide binding motifs amongst the HLA-A*30 allelic group. *Tissue Antigens*. 56:10-18
- Kuby J (1997) *Immunology*. Third Edition edited W. H. Freeman and Company. New York
- Kuhlmann D, Dohr G, Pusch HH, Scherbaum W, Schieferstein G, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A (1986) Absence of HLA class I and class II antigens as well as beta 2-microglobulin from normal and pathological human spermatozoa. *Tissue Antigens* 27:179-184
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lopez-Botet M, Bellon T, Llano M, Navarro F, Garcia P, de Miguel M (2000) Paired inhibitory and triggering NK cell receptors for HLA class I molecules. *Hum. Immunol*. 61:7-17
- Macdonald WA, Purcell AW, Mifsud NA, Ely LK, Williams DS, Chang L, Gorman JJ, Clements CS, Kjer-Nielsen L, Koelle DM, Burrows SR, Tait BD, Holdsworth R, Brooks AG, Lovrecz GO, Lu L, Rossjohn J, McCluskey J (2003) A naturally selected dimorphism within the HLA-B44 supertype alters class I structure, peptide repertoire, and T cell recognition. *J Exp Med* 198:679-691
- Marsh, SGE: The IMGT/HLA Sequence Database. 2005. <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>
- Momburg F, Hammerling GJ (1998) Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv. Immunol*. 68:191-256
- Mullis KB, Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155:335-350
- Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* April:36-43
- Natarajan K, Li H, Mariuzza RA, Margulies DH (1999) MHC class I molecules, structure and function. *Rev Immunogenet* 1:32-46
- Nussbaum AK, Kuttler C, Hadelers KP, Rammensee HG, Schild H (2001) PProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. *Immunogenetics* 53:87-94
- Orr HT, Lopez de Castro JA, Lancet D, Strominger JL (1979) Complete amino acid sequence of a papain-solubilized human histocompatibility antigen, HLA-B7. 2. Sequence determination and search for homologies. *Biochemistry*. 18:5711-5720
- Orr HT, Lancet D, Robb RJ, Lopez de Castro JA, Strominger JL (1979) The heavy chain of human histocompatibility antigen HLA-B7 contains an immunoglobulin-like region. *Nature*. 282:266-270

- Ottinger HD, Muller CR, Goldmann SF, Albert E, Arnold R, Beelen DW, Blasczyk R, Bunjes D, Casper J, Ebell W, Ehninger G, Eiermann T, Einsele H, Fauser A, Ferencik S, Finke J, Hertenstein B, Heyll A, Klingebiel T, Knipper A, Kremens B, Kolb HJ, Kolbe K, Lenartz E, Lindemann M, Muller CA, Mytilineos J, Niederwieser D, Runde V, Sayer H, Schaefer UW, Schmitz N, Schroder S, Schulze-Rath R, Schwerdtfeger R, Siegert W, Thiele B, Zander AR, Grosse-Wilde H (2001) Second German consensus on immunogenetic donor search for allotransplantation of hematopoietic stem cells. *Ann Hematol.* 80:706-714
- Pamer EG, Harty JT, Bevan MJ (1991) Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature.* 353:852-855
- Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE (1994) Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* 152:163-175
- Parker KC, Bednarek MA, Hull LK, Utz U, Cunningham B, Zweerink HJ, Biddison WE, Coligan JE (1992) Sequence motifs important for peptide binding to the human MHC class I molecule, HLA-A2. *J Immunol* 149:3580-3587
- Pascolo S, Schirle M, Guckel B, Dumrese T, Stumm S, Kayser S, Moris A, Wallwiener D, Rammensee HG, Stevanovic S (2001) A MAGE-A1 HLA-A A*0201 epitope identified by mass spectrometry. *Cancer Res.* 61:4072-4077
- Perbal B (1988) A practical guide to molecular cloning. 2nd ed., New York, John Wiley & Sons Inc.
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50:213-219. Review.
- Rammensee HG, Falk K, Rötzschke O (1993) Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol.* 11:213-244
- Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995) MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41:178-228
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50:213-219
- Rammensee HG, Falk K, Rötzschke O (1993) Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 11:213-244
- Raghava GP. nHLAPred: Not published. <http://www.imtech.res.in/raghava/nhlapred/>.
- Reith W, Satola S, Sanchez CH, Amaldi I, Lisowska-Grospierre B, Griscelli C, Hadam MR, Mach B (1988) Congenital immunodeficiency with a regulatory defect in MHC class II gene expression lack a specific HLA-DR promoter binding protein. *RF-X. Cell.* 53(6): 897-906
- Rötzschke O, Falk K, Deres K, Schild H, Norda M, Metzger J, Jung G, Rammensee HG (1990) Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* 348: 252-254
- Rötzschke O, Falk K, Stevanovic S, Jung G, Walden P, Rammensee HG (1991) Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.* 21 :2891-2894

- Rötzschke O, Falk K, Stevanovic S, Gnau V, Jung G, Rammensee HG (1994) Dominant aromatic / aliphatic C-terminal anchor in HLA-B*2702 and B*2705 peptide motifs. *Immunogenetics* 39:74-77
- Rudolph MG, Speir JA, Brunmark A, Mattsson N, Jackson MR, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA (2001) The crystal structures of K(bm1) and K(bm8) reveal that subtle changes in the peptide environment impact thermostability and alloreactivity. *Immunity*. 14:231-242
- Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, 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
- Salter RD, Benjamin RJ, Wesley PK, Buxton SE, Garrett TP, Clayberger C, Krensky AM, Norment AM, Littman DR, Parham P (1990) A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature* 345:41-46
- Salter RD, Norment AM, Chen BP, Clayberger C, Krensky AM, Littmann DR, Parham P (1989) Polymorphism in the alpha 3 domain of HLA-A molecules affects binding to CD8. *Nature* 338:345-347
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition 1989. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463
- Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC (1991) Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 219:277-319
- Saric T, Chang SC, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, Tsujimoto M, Goldberg AL (2002) An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol*. 3:1169-1176
- Sayle R, Milner-White EJ (1995) RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends. Biochem. Sci.* 20:374
- Schirle M, Keilholz W, Weber B, Gouttefangeas C, Dumrese T, Becker HD, Stevanovic S, Rammensee HG (2000) Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur. J. Immunol.* 30:2216-2225
- Schmitz M, Diestelkoetter P, Weigle B, Schmachtenberg F, Stevanovic S, Ockert D, Rammensee HG, Rieber EP (2000) Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* 60:4845-4849
- Schultz ES, Chapiro J, Lurquin C, Claverol S, Burlet-Schiltz O, Warnier G, Russo V, Morel S, Levy F, Boon T, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P (2002) The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *J. Exp. Med.* 195:391-399
- Sedmark JJ, Grossberg SE (1977) A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G-250. *Anal Biochem* 79:544-552
- Seeger FH, Schirle M, Gatfield J, Arnold D, Keilholz W, Nickolaus P, Rammensee HG, Stevanovic S (1999) The HLA-A*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis. *Immunogenetics* 49:571-576

- Seliger B, Ritz U, Abele R, Bock M, Tampe R, Sutter G, Drexler I, Huber C, Ferrone S (2001) Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res.* 61:8647-8650
- Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N (2002) ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419 :480-483
- Shepherd JC, Schumacher TN, Ashton-Rickardt PG, Imaeda S, Ploegh HL, Janeway CA Jr, Tonegawa (1993) TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell* 74:577-584
- Shimizu Y, De Mars R (1989) Production of human cells expressing individual transferred HLA-A, -B, -C genes using an HLA-A, -B, -C null human cell line. *J Immunol* 142:3320-3328
- Shiver JW, Su L, Henkart PA (1992) Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. *Cell* 71:315-322
- Shuman S (1994) Recombination mediated by Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *J Biol Chem* 269:32678-32684
- Simpson E, Scott D, James E, Lombardi G, Cwynarski K, Dazzi F, Millrain JM, Dyson PJ (2001) Minor H antigens: genes and peptides. *Eur J Immunogenet.* 28:505-513
- Solheim BG, Thorsby E (1974) Beta-2-microglobulin is part of the HL-A molecules in the lymphocyte membrane. *Nature.* 249:36-38
- Srinivasan KN, Zhang GL, Khan AM, August JT, Brusica V (2004) Prediction of class I T-cell epitopes: evidence of presence of immunological hot spots inside antigens. *Bioinformatics* 20:I297-I302
- Steimle V, Otten LA, Zufferey M, Mach B (1993) Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell.* 75:135-46
- Stevanovic S, Jung G (1993) Multiple sequence analysis: pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries. *Anal. Biochem.* 212:212-220
- Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schroter C, Thompson MW, Hersh LB, Kalbacher H, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H (2000) Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol.* 1:413-418
- Stoltze L, Dick TP, Deeg M, Pommerl B, Rammensee HG, Schild H. (1998) Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities. *Eur. J. Immunol.* 28:4029-4036
- Strachan T, Sodoyer R, Damotte M, Jordan BR (1984) Complete nucleotide sequence of a functional class I HLA gene, HLA-A3: implications for the evolution of HLA genes. *Embo J.* 3:887-894
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75:1169-1178
- Sun Y, Song M, Stevanovic S, Jankowiak C, Paschen A, Rammensee HG, Schadendorf D (2000) Identification of a new HLA-A(*)0201-restricted T-cell epitope from the tyrosinase-related protein 2 (TRP2) melanoma antigen. *Int. J. Cancer* 87:399-404

- Suzuki DT (1986) Manipulation of DNA. In An introduction to genetic. Edited by Suzuki DT, Griffiths AJF, Miller JH and Lewontin RC 1986: W. H. Freeman and Company, New York: 296-332
- Tanaka K, Kasahara M (1998) The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol. Rev.* 163:161-76
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354
- Trowsdale J (1996) Molecular genetics of HLA class I and class II regions. In HLA and MHC: genes, molecules and function. Edited by Browning M and McMichael A. Bios Scientific Publishers, Oxford: 23-38
- Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A (1990) Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 348:741-744
- Tysoe-Calnon VA, Grundy JE, Perkins SJ (1991) Molecular comparisons of the beta 2-microglobulin-binding site in class I major-histocompatibility-complex alpha-chains and proteins of related sequences. *Biochem. J.* 277:359-69
- Uebel S, Kraas W, Kienle S, Wiesmuller KH, Jung G, Tampe R (1997) Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8976-8981
- Vaessen RT, Kreike J, Groot GS (1981) Protein transfer to nitrocellulose filters. A simple method for quantitation of single proteins in complex mixtures. *FEBS Lett* 124:193-196
- van Endert PM (1999) Genes regulating MHC class I processing of antigen. *Curr. Opin. Immunol.* 11:82-88
- van Weemen BK, Schuurs AH (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett* 15:232-236
- Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from Agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:615-619
- Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM (1999) The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.* 10:673-679
- Waßmuth R (1995). Einführung in das HLA System. Ecomed
- Ways JP, Coppin HL, Parham P (1985) The complete primary structure of HLA-Bw58. *J Biol. Chem.* 260:11924-11933
- Wei XH, Orr HT (1990) Differential expression of HLA-E, HLA-F and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum Immunol* 29:131-142
- Weide H, Aurich H (1979) Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag

Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED (1981) Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med.* 304:1529-1533

Wenzel T, Eckerskorn C, Lottspeich F, Baumeister W (1994) Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett.* 349:205-209

York IA, Chang SC, Saric T, Keys JA, Favreau JM, Goldberg AL, Rock KL (2002) The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol.* 3:1177-1184

Yu K, Petrovsky N, Schonbach C, Koh JY, Brusic V (2002) Methods for prediction of peptide binding to MHC molecules: a comparative study. *Mol Med* 8:137-48

(Zhao et al., Compression of functional space in HLA-A sequence diversity, *Human Immunology*, 2003)

Zinkernagel RM, Doherty PC (1974) Restriction of in vitro T cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248:701-702

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

Abkürzung	Vollständige Bezeichnung
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
2xYT-Medium	Flüssigmedium für Bakterien
Abb.	Abbildung
add.	zufügen (addieren)
Ak	Ausgangskonzentration
Amp	Ampicillin
Amp ^r	Ampicillin Resistenz
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ds-DNA	doppelsträngige DNA
<i>E.coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ek	Endkonzentration
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI-MS	<i>Electrospray ionisation mass spectrometry</i>
et al.	und andere (lat.: <i>et altera</i>)
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Gramm / Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
GvH	<i>graft versus host</i>
GvL	<i>graft versus leukaemia</i>
h	Stunde (engl.: <i>hour</i>)
H ₂ O bidest.	zweifach destilliertes Wasser (lat.: <i>Aqua bidestillata</i>)
hc	<i>heavy chain</i> (schwere Kette der MHC Moleküle)
HLA	<i>human leucocyte antigens</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatographie</i>

HRP	<i>horse raddish peroxidase</i>
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HvG	<i>host versus graft</i>
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen
kD	kilo Dalton (1 kD = 1 000 Dalton)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LDA	<i>limiting dilution assay</i>
M	Molar (mol/l)
MA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption / ionisation-time of flight mass spectrometry</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
NHS	N-hydroxysuccimide
Nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 Nanometern
PBR	Peptidbindungsregion
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMF	<i>peptide-mass-fingerprint</i>
RP-HPLC	<i>reverse phase HPLC</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rounds per minutes</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacryamidelektrophorese
Sek	Sekunden
sHLA	trunkierte HLA Moelküle (engl.: <i>soluble HLA</i>)
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

TZR	<i>T-Zell-Rezeptor</i>
U	Einheit der Enzymaktivität (engl.: <i>unit</i>)
üN	Über Nacht
UV	ultraviolettes Licht (hier 320 nm)
V	Volt
ZKÜ	Zellkulturüberstand

7.2 Abkürzungen für Aminosäuren

Vollständige Bezeichnung	1-Buchstaben-Code	3-Buchstaben-Code
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asp
Asparaginsäure	D	Asn
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

7.3. Abkürzungen für Basen

Abkürzung	Vollständige Bezeichnung
A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

7.4 Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1.1 Schematische Darstellung des humanen MHC-Komplexes
- Abb. 1.2 Struktur eines MHC-Klasse I Moleküls
- Abb. 1.3 Darstellung der hypervariablen Bereiche der PBR im HLA-Molekül
- Abb. 1.4 Darstellung der Pockets
- Abb. 1.5 Prozessierung von Peptiden
- Abb. 1.6 HLA-Klasse I Molekül mit gebundenem T-Zellrezeptor
- Abb. 1.7 Polymorphe AS Positionen innerhalb der HLA-A*66 Gruppe
- Abb. 3.1 Schematische Darstellung des pcDNA3.1/V5-His© TOPO® TA Plasmids
- Abb. 4.1 Schematische Darstellung des HLA-A Gens
- Abb. 4.2 Elutionsprofil der Affinitätschromatographie
- Abb. 4.3 SDS-Polyacrylamidgel der affinitätschromatographisch an W6/32 aufgereinigten Fraktionen
- Abb. 4.4 Immunoblot der durch Affinitätschromatographie gereinigten sHLA-Moleküle unter Verwendung des monoklonalen Antikörper Ly5.1
- Abb. 4.5 Immunoblot der durch Affinitätschromatographie gereinigten sHLA-Moleküle unter Verwendung des monoklonalen Antikörper anti-V5 HRP
- Abb. 4.6 Immunoblot der durch Affinitätschromatographie gereinigten sHLA-Moleküle unter Verwendung des monoklonalen Antikörper anti-b2m HRP
- Abb. 4.7 Isoelektrische Fokussierung der tHLA_A6602_V5-Moleküle
- Abb. 4.8 Spektrum der MALDI TOF Analyse des Peptidpools aus tHLA_A6602_V5-Molekülen
- Abb. 4.9 MALDI TOF TOF Spektrum eines Liganden des humanen Hsp70 Proteins aus tHLA_A6602_V5-Molekülen

- Abb. 4.10 Spektrum der MALDI TOF Analyse des Peptidpools aus tHLA_A6603_V5-Molekülen
- Abb. 4.11 MALDI TOF TOF Spektrum eines Liganden des humanen DKFZp434D193.1 Proteins aus tHLA_A6603_V5-Molekülen

7.5 Verzeichnis der Tabellen

- Tab. 1.1 MHC-Epitop-Vorhersagen im Internet
- Tab. 1.2 AS Unterschiede zwischen den HLA-A*66-Varianten
- Tab. 4.1 Darstellung der MALDI TOF TOF sequenzierten Einzelliganden aus tHLA_A6602_V5-Molekülen
- Tab. 4.2 Darstellung der MALDI TOF TOF sequenzierten Einzelliganden aus tHLA_A6603_V5-Molekülen
- Tab. 4.3 Darstellung der Peptidmotive aus tHLA_A6602_V5-Molekülen
- Tab. 4.4 Darstellung der Peptidmotive aus tHLA_A6603_V5-Molekülen

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel sowie eventuelle zu Hilfeleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, 13.03.2007

Christina Bade-Döding

Curriculum vitae

Name: Christina Bade-Döding, geb. Bade
Geburtsdatum: 21.11.1972
Geburtsort: Minden
Eltern: Wilfried Bade
Annemonika Bade, geb. Schulz-Ruhtenberg

Schulbildung:

1979-1983 Grundschule Dützen/Haddenhausen
1983-1992 Herder-Gymnasium Minden, Abitur

Hochschulbildung:

10/1993-04/1999 Studiengang Biologie, Universität Bielefeld
07/1997-04/1999 Diplomarbeit am Herz- und Diabeteszentrum NRW
(Ruhr Universität Bochum)
Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin
Bad Oeynhausen
(Leiter: Prof. Dr. med. K. Kleesiek)

Beruflicher Werdegang:

05/1999-12/1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Universität Bielefeld
Abteilung für Molekularbiologie und Gentechnologie
(Leiter: Prof. Dr. rer. nat. R. Eichenlaub)
seit 01/2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Medizinische Hochschule Hannover
Institut für Transfusionsmedizin
(Leiter: Prof. Dr. med. R. Blasczyk)

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

1. **Bade-Doeding C**, DeLuca DS, Seltsam A, Blasczyk R, Eiz-Vesper B. Amino acid 95 causes strong alteration of peptide position P Ω in HLA-B*41 variants. *Immunogenetics* 2007; 59:253-259.
2. Seltsam A, Strigens S, Levene C, Yahalom V, Moulds M, Moulds JJ, Hustinx H, Weisbach V, Figueroa D, **Bade-Doeding C**, DeLuca DS, Blasczyk R. The molecular diversity of Sema7A, the semaphorin that carries the JMH blood group antigens. *Transfusion* 2007; 47:133-146.
3. Seltsam A, Das Gupta C, **Bade-Doeding C**, Blasczyk R. A weak blood group phenotype caused by a translation-initiator mutation in the ABO gene. *Transfusion* 2006; 46:434-440
4. Elsner HA, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, **Bade-Doeding C**. Allele-specific peptide presentation of Human Leukocyte Antigens: Implications for tumor immunotherapy. *Anticancer Res* 2007; *in press*
5. **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, Figueiredo C, Seltsam A, Elsner HA, Blasczyk R. Peptide-binding motif of HLA-A*6603. *Immunogenetics* 2005; 56:769-772
6. **Bade-Doeding C**, Elsner HA, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Holtkamp U, Blasczyk R. A single amino acid polymorphism in pocket A of HLA-A*6602 alters the auxiliary anchors compared to HLA-A*6601 ligands. *Immunogenetics* 2004; 56:83-88

Abstracts und Kongressbeiträge

1. DeLuca DS, Eiz-Vesper B, **Bade-Doeding C**, Ladas N, Blasczyk R. High throughput minor histocompatibility antigen prediction.
Vortrag, Australasian Society for Immunology Conference (ASI) 2006, Auckland, New Zealand, 03. – 07.12.2006.
2. **Bade-Doeding C**, DeLuca DS, Eiz-Vesper B, Blasczyk R. New HLA class I peptide binding motifs confirm modern pocket definitions over the classical A-F system.
Vortrag, Australasian Society for Immunology Conference (ASI) 2006, Auckland, New Zealand, 03. – 07.12.2006.
3. **Bade-Doeding C**, Elsner HA, Figueiredo C, Seltsam A, DeLuca DS, Blasczyk R, Eiz-Vesper B. Characterization of permissive mismatches by lentiviral transduction of single HLA class I alleles.
Poster, Australasian Society for Immunology Conference (ASI) 2006, Auckland, New Zealand, 03. – 07.12.2006.
4. **Bade-Doeding C**, DeLuca DS, Eiz-Vesper B, Blasczyk R. New HLA class I peptide binding motifs confirm modern pocket definitions over the classical A-F system. Abstract 182.
Vortrag, 32nd Annual Meeting of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), San Diego, California, USA, 16. – 20.10.2006.
5. **Bade-Doeding C**, Elsner HA, Figueiredo C, Eiz-Vesper B, Blasczyk R. Identification of permissive mismatches by lentiviral transduction of single HLA class I alleles. Abstract 175.
Vortrag, 32nd Annual Meeting of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), San Diego, California, USA, 16. – 20.10.2006.
6. **Bade-Doeding C**, Seltsam A, Blasczyk R, Eiz-Vesper B. Ranking of mismatches within the B*41 group by peptide motif characteristics.
Poster, 32nd Annual Meeting of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), San Diego, California, USA, 16. – 20.10.2006.
7. DeLuca DS, Eiz-Vesper B, **Bade-Doeding C**, Blasczyk R. High throughput minor histocompatibility antigen prediction. Abstract 171.
Vortrag, 32nd Annual Meeting of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), San Diego, California, USA, 16. – 20.10.2006.
8. **Bade-Doeding C**, Elsner HA, Figueiredo C, Eiz-Vesper B, Blasczyk R. Identification of permissive mismatches by lentiviral transduction of single HLA class I alleles.
Vortrag, 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunogenetik (DGI), Innsbruck, Österreich, 12.-14.10.2006
9. **Bade-Doeding C**, DeLuca DS, Seltsam A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R. New HLA class I peptide binding motifs confirm modern pocket definitions over the classical A-F system.
Vortrag, 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunogenetik (DGI), Innsbruck, Österreich, 12.-14.10.2006

10. DeLuca DS, Eiz-Vesper B, Ladas N, **Bade-Doeding C**, Blasczyk R. High throughput minor histocompatibility antigen prediction. *Poster, 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunogenetik (DGI), Innsbruck, Österreich, 12.-14.10.2006*
11. **Bade-Doeding C**, Seltsam A, Blasczyk R, Eiz-Vesper B. Ranking of mismatches within the B*41 group by peptide motif characteristics. Abstract 7.4. *Poster, 39th Annual Congress of the German Society for Transfusion Medicine and Immunohematology (DGTI), Frankfurt, Germany, 19. – 22.09.2006.*
12. DeLuca DS, Eiz-Vesper B, **Bade-Doeding C**, Blasczyk R. High throughput minor histocompatibility antigen prediction. Abstract 1.14. *Vortrag, 39th Annual Congress of the German Society for Transfusion Medicine and Immunohematology (DGTI), Frankfurt, Germany, 19. – 22.09.2006.*
13. **Bade-Doeding C**, Elsner HA, Figueiredo C, Horn PA, Blasczyk R, Eiz-Vesper B. Rating the impact of single HLA mismatches in an artificial allogeneic system evading the mHAG effect. Your Abstract Preliminary Number : 2440.00 *Poster, 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology - 16th European Congress of Immunology (EFIS), Paris, France, 06. - 09.09.2006.*
14. Plote J, **Bade-Doeding C**, Elsner HA, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Blasczyk R. Antibodies directed against eukaryotic but not prokaryotic recombinant MICA proteins mediate kidney rejection. *Tissue Antigens 2006, 67 (Issue 6) Abstract 073.* *Poster, 20th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI), Oslo, Norway, 08. - 11.06.2006.*
15. DeLuca DS, **Bade-Doeding C**, Blasczyk R. High throughput minor histocompatibility antigen prediction. *Tissue Antigens 2006, 67 (Issue 6) Abstract 15.* *Vortrag, 20th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI), Oslo, Norway, 08. - 11.06.2006.*
16. **Bade-Doeding C**, Elsner HA, Figueiredo C, Eiz-Vesper B, Horn PA, Blasczyk R. Assessing the Allogenicity of Selected HLA Class I Mismatches in an Artificial Allogeneic System. *Tissue Antigens 2006, 67 (Issue 6) Abstract 002.* *Poster, 20th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI), Oslo, Norway, 08. - 11.06.2006.*
17. **Bade-Doeding C**, Seltsam A, Blasczyk R, Eiz-Vesper B. Ranking of mismatches within the B*41 group by peptide motif characteristics. *Tissue Antigens 2006, 67 (Issue 6) Abstract 049.* *Poster, 20th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI), Oslo, Norway, 08. - 11.06.2006.*
18. **Bade-Doeding C**, DeLuca DS, Eiz-Vesper B, Blasczyk R. New HLA class I peptide binding motifs confirm modern pocket definitions over the classical A-F system. *Tissue Antigens 2006, 67 (Issue 6) Abstract 13.* *Vortrag, 20th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI), Oslo, Norway, 08. - 11.06.2006.*

19. **Bade-Döding C**, Blasczyk R, Eiz-Vesper B. The comparative analysis of the A*3203 peptide binding motif provides data about biological properties of individual amino acids. *Tissue Antigens* 2006, 67 (Issue 6) Abstract 010.
Poster, 20th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI), Oslo, Norway, 08. - 11.06.2006.
20. Eiz-Vesper B, Horn PA, **Bade-Doeding C**, Hiller O, Blasczyk R. Cloning and expression of soluble β 2M-HLA-heavy chain fusion proteins for high-throughput peptide binding assays. *Tissue Antigens* 2005, 66 (Issue 5) Abstract 285.
Poster, Genetics and The Immune Response, 35th Annual Scientific Meeting of the Australasian Society for Immunology (ASI), Melbourne, Australia, 4. - 8.12.2005.
21. Eiz-Vesper B, Horn PA, Khattab B, **Bade-Doeding C**, Seltsam A, Blasczyk R. HA-1H specific cytotoxic T cells are efficiently induced from PBMC by Tetanus Toxoid induced helper effect. *Tissue Antigens* 2005, 66 (Issue 5) Abstract 283.
Poster, Genetics and The Immune Response, 35th Annual Scientific Meeting of the Australasian Society for Immunology (ASI), Melbourne, Australia, 4. - 8.12.2005.
22. **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, DeLuca DS, Seltsam A, Horn PA, Blasczyk R. HLA-B*4103 preferentially binds peptides of extraordinary length. *Tissue Antigens* 2005, 66 (Issue 5) Abstract 031.
Poster, Genetics and The Immune Response, 35th Annual Scientific Meeting of the Australasian Society for Immunology (ASI), Melbourne, Australia, 4. - 8.12.2005.
23. Plote J, Elsner HA, **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Blasczyk R. Prevalence of MICA*008 antibodies in patients awaiting kidney transplantation. *Tissue Antigens* 2005, 66 (Issue 5) Abstract 030.
Poster, Genetics and The Immune Response, 35th Annual Scientific Meeting of the Australasian Society for Immunology (ASI), Melbourne, Australia, 4. - 8.12.2005.
24. **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Blasczyk R. Definition of allele-specific peptide motifs to estimate the severity of HLA mismatches. *Tissue Antigens* 2005, 66 (Issue 5) Abstract 029.
Poster, Genetics and The Immune Response, 35th Annual Scientific Meeting of the Australasian Society for Immunology (ASI), Melbourne, Australia, 4. - 8.12.2005.
25. Eiz-Vesper B, Horn PA, **Bade-Doeding C**, Hiller O, Blasczyk R. Cloning and expression of soluble β 2M-HLA-heavy chain fusion proteins for high-throughput peptide binding assays. *Tissue Antigens* 2005, 66 (Issue 5) Abstract 285.
Poster, 14th International HLA and Immunogenetics Workshop (IHWS), Melbourne, Australia, 29.11. – 3.12.2005.
26. Eiz-Vesper B, Horn PA, Khattab B, **Bade-Doeding C**, Seltsam A, Blasczyk R. HA-1H specific cytotoxic T cells are efficiently induced from PBMC by Tetanus Toxoid induced helper effect. *Tissue Antigens* 2005, 66 (Issue 5) Abstract 283.
Poster, 14th International HLA and Immunogenetics Workshop (IHWS), Melbourne, Australia, 29.11. – 3.12.2005.

27. **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, DeLuca DS, Seltsam A, Horn PA, Blasczyk R. HLA-B*4103 preferentially binds peptides of extraordinary length. *Tissue Antigens* 2005, 66 (Issue 5) Abstract 31.
Vortrag, 14th International HLA and Immunogenetics Workshop (IHWS), Melbourne, Australia, 29.11. – 3.12.2005.
28. **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Blasczyk R. Definition of allele-specific peptide motifs to estimate the severity of HLA mismatches. *Tissue Antigens* 2005, 66 (Issue 5) Abstract 29.
Vortrag, 14th International HLA and Immunogenetics Workshop (IHWS), Melbourne, Australia, 29.11. – 3.12.2005.
29. Elsner HA, Blasczyk R, **Bade-Doeding C**. Allele-specific peptide presentation by Human Leukocyte Antigens: Implications for tumor immunotherapy. *Anticancer Res* 2005; 6D: 4835 Abstract 129.
Vortrag, 13th International Hamburg Symposium on Tumor Markers, Hamburg, Germany, 27. - 29.11.2005.
30. **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, DeLuca DS, Seltsam A, Horn PA, Blasczyk R. HLA-B*4103 preferentially binds peptides of extraordinary length. *Hum Immunol* 2005; 66 (suppl. 1): S103.
Poster, 31st Annual Meeting of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), Washington, USA, 17. - 21.10.2005.
31. Eiz-Vesper B, Horn PA, Daubert C, Neumann N, **Bade-Döding C**, Seltsam A, Blasczyk R. Requirement of helper effect on induction of HA-1H cytotoxic T cells from naïve precursors. *Hum Immunol* 2005; 66 (suppl. 1): S102.
Poster, 31st Annual Meeting of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), Washington, USA, 17. - 21.10.2005.
32. Eiz-Vesper B, Horn PA, Daubert C, Neumann N, **Bade-Döding C**, Seltsam A, Blasczyk R. Requirement of helper effect on induction of HA-1H cytotoxic T cells from naïve precursors. *Onkologie* 2005; 28 (suppl 3): 64.
Poster, Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Hannover, Germany, 01. - 05.10.2005.
33. Eiz-Vesper B, Horn PA, Daubert C, Neumann N, **Bade-Döding C**, Seltsam A, Blasczyk R. Requirement of helper effect on induction of HA-1H cytotoxic T cells from naïve precursors. *Transfus Med Hemother* 2005; 32.
Poster, 13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunogenetik (DGI) e.V., Hamburg, Germany, 15. - 17.09.2005.
34. **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, DeLuca DS, Seltsam A, Horn PA, Blasczyk R. HLA-B*4103 preferentially binds peptides of extraordinary length. *Transfus Med Hemother* 2005; 32.
Vortrag, 13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunogenetik (DGI) e.V., Hamburg, Germany, 15. - 17.09.2005.
35. **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, DeLuca DS, Seltsam A, Horn PA, Blasczyk R. HLA-B*4103 preferentially binds peptides of extraordinary length. *Transfus Med Hemother* 2005; 32 (suppl 1):15.
Vortrag, 38. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) e.V., Erfurt, Germany, 06. - 09.09.2005.

36. Plote J, Elsner HA, **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Blasczyk R. Prevalence of MICA*008 antibodies in patients awaiting kidney transplantation. *Transfus Med Hemother* 2005; 32 (suppl 1):11.
Vortrag, 38. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) e.V., Erfurt, Germany, 06.-09.09.2005.
37. **Bade-Doeding C**. The characterization of peptides presented in HLA allelic variants to determine functional similarities.
Vortrag, 2nd International Summer school on Immunogenetics, San Miguel Allende. Guanajuato, México, 6. - 10.08. 2005.
38. Eiz-Vesper B, Daubert C, Neumann N, Khattab B, **Bade-Doeding C**, Seltsam A, Blasczyk R. Requirement of helper effect on induction of HA-1H cytotoxic T cells from naïve precursors. *Genes and Immunity* 2005; 6 (suppl); Abstract 45.
Vortrag, 19th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI), Istanbul, Turkey, 23. - 26.04.2005.
39. Plote J, Elsner HA, **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Blasczyk R. Prevalence of MIC*008 antibodies in patients awaiting kidney transplantation. *Genes and Immunity* 2005; 6 (suppl); Abstract 193.
Poster, 19th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI), Istanbul, Turkey, 23. - 26.04.2005.
40. Eiz-Vesper B, Daubert C, Neumann N, Khattab B, **Bade-Doeding C**, Seltsam A, Blasczyk R. Requirement of helper effect on induction of HA-1H cytotoxic T cells from naïve precursors.
Poster, 3rd International Symposium on the Clinical Use of Cellular Products (Cellular Therapy), Regensburg, Germany, 17. - 18.03.2005.
41. Plote J, Elsner HA, **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Blasczyk R. Prevalence of MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation.
Poster, 13. Jahrestagung der Deutschen Transplantations Gesellschaft (DTG), Kiel, Germany, 21. - 23.10.2004.
42. **Bade-Doeding C**, Elsner HA, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Holtkamp U, Blasczyk R. Definition of allele-specific peptide motifs to estimate the severity of HLA mismatches. Abstract A1.2.
Vortrag, 12. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunogenetik (DGI), Dresden, Germany 14. - 16.10.2004.
43. Plote J, Elsner HA, **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Blasczyk R. Prevalence of MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation. Abstract A2.5.
Vortrag, 12. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunogenetik (DGI), Dresden, Germany, 14. - 16.10.2004.
44. **Bade-Doeding C**, Elsner HA, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Holtkamp U, Blasczyk R. Definition of allele-specific peptide motifs to estimate the severity of HLA mismatches. *Hum Immunol* 2004; 65 (suppl 1): S69.
Poster, 30th Annual Meeting American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) San Antonio, Texas, USA, 02 - 06.10.2004.

45. Plote J, Elsner HA, Holtkamp U, **Bade-Doeding C**, Blasczyk R. Prevalence of MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation. *Hum Immunol* 2004; 65 (suppl 1).
Vortrag, 30th Annual Meeting American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) San Antonio, Texas, USA, 02. - 06.10.2004.
46. **Bade-Doeding C**, Elsner HA, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Holtkamp U, Blasczyk R. Definition of allele-specific peptide motifs to estimate the severity of HLA mismatches. *Transfus Med Haemo Ther* 2004; 31 (suppl 3):36.
Vortrag, 37. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), Mannheim, Germany, 21. - 24.09.2004.
47. **Bade-Doeding C**, Elsner HA, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Holtkamp U, Blasczyk R. Differential impact of amino acid polymorphisms in pockets A and B on allele-specific peptide motifs of HLA-A*66 variants. *Genes and Immunity* 2004; 5 (suppl):7.
Vortrag, 18th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI), Sofia, Bulgaria, 08. - 11.05. 2004.
48. **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, Elsner HA, Seltsam A, Kuhn J, Blasczyk R. Nature of peptide binding in HLA-A*66 allelic variants. *Hum Immunol* 2003, 64 (suppl: S54)
Poster, 29th Annual Meeting American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), Miami Beach, Florida, USA, 28.10. - 01.11.2003.
49. **Bade-Doeding C**, Eiz-Vesper B, Hallensleben K, Elsner HA, Kuhn J, Blasczyk R. Comparative peptide binding characteristics of HLA-A*66 allelic variants.
Vortrag, 17th European Histocompatibility Conference / 11th Annual Meeting German Society of Immunogenetics /EFI / DGI), Baden-Baden, Germany, 06.05. – 09.05.2003.

Förderung

1. Bursary der American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), European Federation for Immunogenetics (EFI) und Australasian and South East Asian Tissue Typing Association (ASEATTA).
2nd International Summer school on Immunogenetics, San Miguel Allende, Guanajuato, México, 2005.
2. Bursary der European Federation for Immunogenetics (EFI).
18th European Histocompatibility Conference; Sofia, Bulgarien, 2004.