

**Expression und immunmodulatorische
Funktion von HLA-G und seinen
verkürzten Isoformen
in Tumorzelllinien**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften an der
Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Valeska Hofmeister

Dissertation eingereicht am 17.2.04

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. H. Weiß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Weiher

Tag der mündlichen Prüfung: 23.4.04

*Darin besteht das Wesen der Wissenschaft.
Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein
könnte. Dann sieht man nach, ob es der Fall
ist und im allgemeinen ist es nicht der Fall.*

Bertrand Russel (1872-1970)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	MHC-Moleküle der Klassen I und II	1
1.1.1	Struktur der MHC-Moleküle der Klasse I.....	2
1.1.2	MHC-Klasse-I-restringierte Antigenprozessierung.....	3
1.1.3	Einteilung der Moleküle der MHC-Klasse-I	6
1.1.3.1	HLA-E.....	6
1.1.3.2	HLA-G	6
1.2	HLA-G Interaktionen mit Zellen des Immunsystems und Funktionen von HLA-G	12
1.2.1	Mit HLA-G interagierende Rezeptoren.....	12
1.2.1.1	Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie.....	14
1.2.1.2	Rezeptoren der C-Typ Lektin-Superfamilie: CD94/NKG2.....	18
1.2.2	Funktionen von HLA-G.....	19
2	Zielsetzung der Arbeit	23
3	Material	24
3.1	Abkürzungen	24
3.2	Chemikalien und Enzyme	25
3.3	Allgemeine Puffer und Lösungen	26
3.4	Antikörper und sekundäre Reagentien.....	26
3.5	Bakterienstämme	28
3.6	Eukaryontische Zellen und Transfektanten.....	28
3.7	Oligonukleotide	30
3.8	Vektoren und Plasmide.....	31
3.9	Sonden.....	33
3.10	Peptide und Proteine.....	33
4	Methoden	34
4.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren	34
4.1.1	Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren.....	34
4.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	34
4.1.3	Isolierung von Nukleinsäuren.....	34
4.1.3.1	Isolierung genomischer DNA nach der Aussalzmethode.....	34
4.1.3.2	Plasmidisolierung	35
4.1.3.3	Isolierung von RNA	36
4.1.4	Restriktionsverdau von DNA.....	36
4.1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
4.1.6	Reverse Transkription und PCR (RT-PCR)	37
4.1.7	Reinigung von PCR-Produkten	37
4.1.8	Klonierung von PCR-Produkten	37
4.1.9	Nachweis einer Insertion in rekombinanten Bakterien mittels PCR	38
4.1.10	Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden mittels PCR.....	38
4.1.11	Sequenzierung	38
4.1.12	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	39

4.1.12.1	Auftrennung von DNA auf Agarosegelen	39
4.1.12.2	Agarosegelelektrophorese von RNA	39
4.1.12.3	Northernblot	39
4.1.13	Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden und Detektion	39
4.1.14	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
4.1.15	Subklonierung von DNA-Fragmenten	40
4.2	Arbeiten mit Bakterien	40
4.2.1	Lagerung	40
4.2.2	Transformation kompetenter Bakterien	41
4.3	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	41
4.3.1	Allgemeine Zellkultur	41
4.3.2	Transfektion von eukaryontischen Zellen	41
4.3.3	Stabilisierung der Oberflächenexpression durch Inkubation bei 26°C und Zugabe von Peptid oder huβ2m	42
4.3.4	Hemmung des intrazellulären Transports durch Behandlung mit Brefeldin A	42
4.3.5	FACS-Analyse	43
4.3.5.1	Zelloberflächenfärbung	43
4.3.5.2	Intrazelluläre Färbung	43
4.3.6	Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), NK-Zellen und γδ T-Zellen	44
4.3.7	Sortieren von Zellen mittels FACS	45
4.4	Proteinchemische Methoden	45
4.4.1	Herstellung von Zellysaten	45
4.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	45
4.4.3	Abspaltung von Oligosacchariden mit Endoglykosidase H	46
4.4.4	Immunpräzipitation	46
4.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot	46
4.4.6	Silber- und Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen	47
4.4.7	"Enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA)	48
4.4.8	Aufreinigung von Proteinen	48
4.5.	Funktionelle Tests	49
4.5.1	Zytotoxizitätstest	49
4.5.2	Proliferationstest	50
5	Ergebnisse	51
5.1	Expression und Funktion der HLA-G-Isoformen in der HLA-I-negativen Zelllinie K-562	51
5.1.1	Expression der HLA-G-Spleißvarianten in Transfektanten der Zelllinie K-562	52
5.1.2	Assoziation der HLA-G-Isoformen mit β2m und TAP	60
5.1.2.1	Assoziation der HLA-G-Isoformen mit β2m	61
5.1.2.2	Assoziation der HLA-G-Isoformen mit TAP	62
5.1.3	Fehlende funktionelle Expression der verkürzten HLA-G-Isoformen in der HLA-I-negativen Zelllinie K-562	63
5.2	Expression von HLA-G1 in Abwesenheit von β2m in der Zelllinie Daudi	68
5.3	HLA-G-Expression in HLA-I-positiven Gliomzelllinien und Myoblasten	78

6	Diskussion	81
6.1	Prozessierung und Lokalisation der HLA-G-Isoformen in der Zelle	81
6.1.1	Fehlende Zelloberflächenexpression der verkürzten HLA-G-Isoformen in der Zelllinie K-562	81
6.1.2	Assoziation der HLA-G-Isoformen mit β 2m.....	84
6.1.3	Assoziation der HLA-G-Isoformen mit dem Peptidladekomplex und Präsentation von Peptiden	85
6.2	Die Zelloberflächenexpression und Dimerisierung von HLA-G1 ist abhängig von β 2m	87
6.3	Funktion von HLA-G.....	90
6.3.1	Geringe inhibitorische Wirkung der HLA-G1-Expression in der Zelllinie K-562 auf die zytotoxische Aktivität von Effektorzellen	90
6.3.2	Funktion der verkürzten HLA-G-Isoformen	93
6.3.3	Rolle der HLA-G-Hochregulation in Tumoren für eine Inhibition der anti-tumoralen Immunantwort	96
7	Zusammenfassung	98
8	Literatur	100
9	Anhang	119
9.1	HLA-G-cDNA-Vektoren	119
9.2	Protein-Primärstrukturen der HLA-G-Isoformen.....	126

1 Einleitung

Das Überleben eines semiallogenen Fötus im Mutterleib und die Vermeidung der Abstoßung durch das mütterliche Immunsystem stellt ein Paradox dar, an dessen Aufrechterhaltung MHC-Antigene entscheidend beteiligt sind.

1.1 MHC-Moleküle der Klassen I und II

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) kodiert für Zelloberflächenmoleküle, welche die Interaktion zwischen Zellen vermitteln, die an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind. Der MHC des Menschen wird als HLA (human leukocyte antigen, humanes leukozytenassoziiertes Antigen) bezeichnet. Er liegt auf Chromosom 6 (6p21.3) und erstreckt sich über ca. 3,5 Mb. Das β 2-Mikroglobulin, das für eine essentielle Untereinheit des HLA-Klasse-I-Moleküls (HLA-I-Moleküls) kodiert, liegt auf Chromosom 15 (15q21).

Die MHC-Zelloberflächenmoleküle dienen der Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst durch das Immunsystem. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von T-Zellen, Antigenerkennung durch T-Zellen, Abstoßung von Transplantaten und Anfälligkeit für viele immunologische Erkrankungen. MHC-Moleküle präsentieren T-Lymphozyten Peptide. T-Lymphozyten sind zur Antigenerkennung nur in der Lage, wenn ihnen geeignete Bruchstücke des Antigens durch ein Selbst-MHC-Molekül präsentiert werden (MHC-Restriktion). Die Einteilung von MHC-Molekülen in die Klassen I und II erfolgt nach der Herkunft der präsentierten Peptide, der mit ihnen interagierenden T-Zellpopulation und ihrem Expressionsmuster. MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC-II-Moleküle) findet man nur auf immunregulatorischen Zellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Lymphozyten und aktivierten T-Lymphozyten. Im Gegensatz dazu werden die MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC-I-Moleküle) der Loci HLA-A, -B und -C auf fast allen kernhaltigen somatischen Zellen, wenn auch unterschiedlich stark, konstitutiv exprimiert. T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Langerhans-Zellen und neutrophile Granulozyten weisen eine hohe Expression von MHC-I-Molekülen auf. Dagegen ist die Expression z.B. in der Leber, in exokrinen Pankreaszellen, im Corneaepithelium, in der Nebenschilddrüse, sowie in der Skelett- und glatten Muskulatur gering oder nicht vorhanden (Le Bouteiller 1994, Singer und Maguire 1990). HLA-A- und -B-Antigene fehlen außerdem auf männlichen und weiblichen Keimzellen und den unterschiedlichen Trophoblasten-Zellpopulationen, die während der Schwangerschaft die fetomaternalen Barriere in der Plazenta bilden (Castilla *et al.* 1993, Hunt und Orr 1992, Hutter und Dohr 1998, Ohashi *et al.* 1990, Roberts *et al.* 1992).

Die unterschiedlichen Expressionsmuster von MHC-Antigenen der Klassen I und II spiegeln ihre verschiedenen Funktionen wider. MHC-II-Moleküle präsentieren extrazelluläre, z.B. bakterielle Antigene. Diese werden durch Phagozytose oder Endozytose aufgenommen, in Endosomen abgebaut und auf MHC-II-Moleküle geladen. MHC-II exprimierende Zellen interagieren mit T-Helferzellen. Diese exprimieren CD4 als Korezeptor für MHC-II-Moleküle. Die CD4⁺ T-Zellen helfen über die Produktion von Zytokinen den Antikörper (Ak)-

produzierenden B-Lymphozyten bei der Abwehr extrazellulärer Pathogene. MHC-I-Moleküle hingegen präsentieren Peptide, die aus intrazellulären Proteinen stammen. Werden Selbst-Peptide präsentiert, führt dies normalerweise zu keiner Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen, da autoreaktive T-Lymphozyten im Thymus deletiert werden. Als Korezeptor für MHC-I-Antigene dient CD8. Erkennung von Zellen, die Selbst-MHC-I-Moleküle mit Fremdpeptiden, tumorspezifische Antigene oder Peptide aus intrazellulären Pathogenen wie Viren, auf ihrer Oberfläche exprimieren, führt zu Apoptose oder Lyse der erkannten Zellen. MHC-I-Moleküle dienen so der Eliminierung von virusinfizierten oder entarteten Zellen. MHC-I-Antigene interagieren aber auch mit Rezeptoren auf Makrophagen, Monozyten und NK-Zellen und beeinflussen so ihre Aktivität.

1.1.1 Struktur der MHC-Moleküle der Klasse I

MHC-I-Moleküle sind membranständig und gehören zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie. Sie bestehen aus einer schweren α -Kette (45 kD), einer leichten Kette, dem nicht polymorphen β 2-Mikroglobulin (β 2m, 12 kD), und einem variablen Peptidliganden aus meist 8-10 Aminosäuren, die nicht-kovalent miteinander assoziiert sind.

MHC-I-Moleküle werden in funktionelle Regionen unterteilt (Abb. 1.1). Die Peptidbindungsregion liegt auf dem N-terminalen Teil der α -Kette. Dabei bilden die α 1- und α 2-Domänen eine Grube, die seitlich von zwei parallelen α -Helices begrenzt wird. Der Boden der Grube wird durch eine β -Faltblatt-Struktur aus acht Strängen gebildet. Das Peptid ist über jedes der beiden Enden fest an ein Ende des Spaltes gebunden. Die Kontakte werden zwischen Atomen der Hauptkette des Peptids und unveränderlichen Resten in der peptidbindenden Furche hergestellt. Zwei bis drei Aminosäure-Seitenketten des Peptids binden tief in der Bindungstasche an polymorphe Aminosäuren. Sie dienen der Verankerung des Peptids im MHC-I-Molekül und bestimmen eine selektive Peptidbindung der verschiedenen Klasse-I-Moleküle. Peptide, die an eine bestimmte MHC-Allelvariante binden, haben an diesen Aminosäurepositionen identische bzw. ähnliche Reste. Die Sequenz des Peptids an anderen Positionen ist für die Bindung nicht entscheidend, so daß ein breites Spektrum verschiedener Peptide passender Länge binden kann. Andere Seitenketten des Peptids ragen nach oben und dienen der Wechselwirkung mit dem spezifischen Rezeptor der T-Zelle. Der TCR erkennt den 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). Die α 1- und α 2-Domänen der MHC-I-Antigene sind sehr variabel. Die meisten Unterschiede liegen auf den exponierten Oberflächen, vor allem in Bereichen, welche die peptidbindende Furche bilden. Auf die Peptidbindungsregion folgt noch extrazellulär die Ig-ähnliche α 3-Domäne. Sie ist konserviert, da sie die Bindungsstelle für den CD8-Korezeptor und auch die Hauptbindungsstelle für β 2m enthält (Bjorkman *et al.* 1987 a, Salter *et al.* 1990). β 2m hat Kontakt mit allen drei Domänen der MHC-I-schweren Kette (Tysoe-Calnon *et al.* 1991). Die Transmembranregion des MHC-I-Antigens wird durch die in diesem Bereich α -helicale α -Kette gebildet. Die zytoplasmatische Domäne stellt die vierte Region dar und dient der Interaktion mit Komponenten des Zytoplasmas.

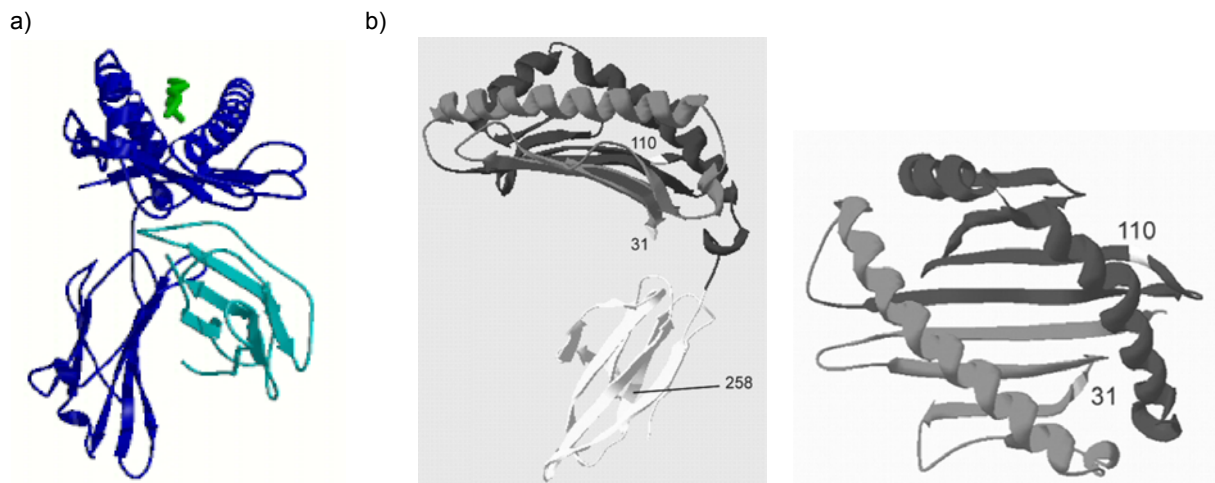


Abb. 1.1: Struktur von MHC-Klasse-I-Molekülen

a) Ein MHC Klasse-I-Antigen aus schwerer Kette, $\beta 2m$ und Peptid ist in Seitenansicht gezeigt (HLA-E: www.molbiol.ox.ac.uk/.../xtalimages_html/hlaeside.jpg, C.A.O'Callaghan). Die Domänen der schweren Kette sind blau, $\beta 2m$ ist türkis und das Peptid ist grün gekennzeichnet. b) Die schwere Kette von HLA-G ist in Seitenansicht und die Peptidbindegrube aus $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne ist in der Aufsicht gezeigt. Die $\alpha 1$ -Domäne ist in hellgrau, die $\alpha 2$ -Domäne dunkelgrau und die $\alpha 3$ -Domäne weiß-hellgrau gezeigt. Die Aminosäurepositionen, an denen Abweichungen vom HLA-G*0101-Allel auftreten (Thr31Ser, Leu110Ile, Thr258Met), sind gekennzeichnet (entnommen aus Hunt *et al.* 2003).

1.1.2 MHC-Klasse-I-restringierte Antigenprozessierung

Die korrekte Assoziation der trimeren Komplexe aus MHC-I-schwerer Kette, $\beta 2m$ und Peptid im Endoplasmatischen Retikulum (ER) ist Voraussetzung für eine stabile Oberflächenexpression der MHC-I-Moleküle. Die im Zytoplasma synthetisierten Proteine müssen vor der Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche prozessiert werden (Abb. 1.2). Zytoplasmatische Proteine werden durch Polyubiquitylierung entfaltet und für den Abbau durch den Proteasomenkomplex markiert (Ciechanover 1994, Hochstrasser 1996). Die Kernstruktur des Proteasoms ist ein multikatalytischer Proteasekomplex aus 28 regulatorischen und katalytischen Untereinheiten, die zu einer zylindrischen Struktur aus vier Ringen angeordnet sind (Groll *et al.* 1997, Löwe *et al.* 1995). Das Proteasom kann Proteine in ATP-unabhängiger Weise degradieren. Es produziert Peptide, die eine Länge von 3-30, meist jedoch 6-11 Resten besitzen (Kisselev *et al.* 1999, Ehring *et al.* 1996). Durch eine Reihe akzessorischer Proteinkomplexe, die zum Teil durch Interferon- γ (IFN- γ) induzierbar sind, kann die Aktivität des Proteasomenkomplexes moduliert werden. Dies führt zu einer erhöhten Variabilität von entstehenden Peptiden. Über die Art der hergestellten Epitope wird so die Bindung an MHC-I-Moleküle und damit die T-Zellantwort beeinflusst (Ahn *et al.* 1995, Belich *et al.* 1994, Gaczynska *et al.* 1996, Groettrup *et al.* 1995 und 1996, Nandi *et al.* 1996, Ortiz-Navarrete *et al.* 1991, Rock und Goldberg 1999). Allerdings können abgesehen von Proteasomen auch andere Proteasen und Aminopeptidasen in die Erzeugung von CTL-Epitopen involviert sein (Beninga *et al.* 1998, Geier *et al.* 1999, Glas *et al.* 1998, Roelse *et al.* 1994).

Auf die Prozessierung der Proteine im Zytoplasma folgt der Transport der Peptide in einer ATP-abhängigen Reaktion über TAP (transporter associated with antigen processing) ins Lumen des ER (Abb. 1.2). In humanen Zellen werden bevorzugt Proteine aus 8-9 Aminosäuren mit

hydrophoben Resten am C-Terminus transportiert. TAP ist ein Heterodimer aus TAP1 und TAP2 (Androlewicz und Cresswell 1994, Androlewicz *et al.* 1993 und 1994, Neefjes *et al.* 1993, Shepherd *et al.* 1993). Der Polymorphismus von humanem TAP ist gering und beeinflusst die Spezifität der Translokation der Peptide nicht oder nur geringfügig (Daniel *et al.* 1997, Übel *et al.* 1997).

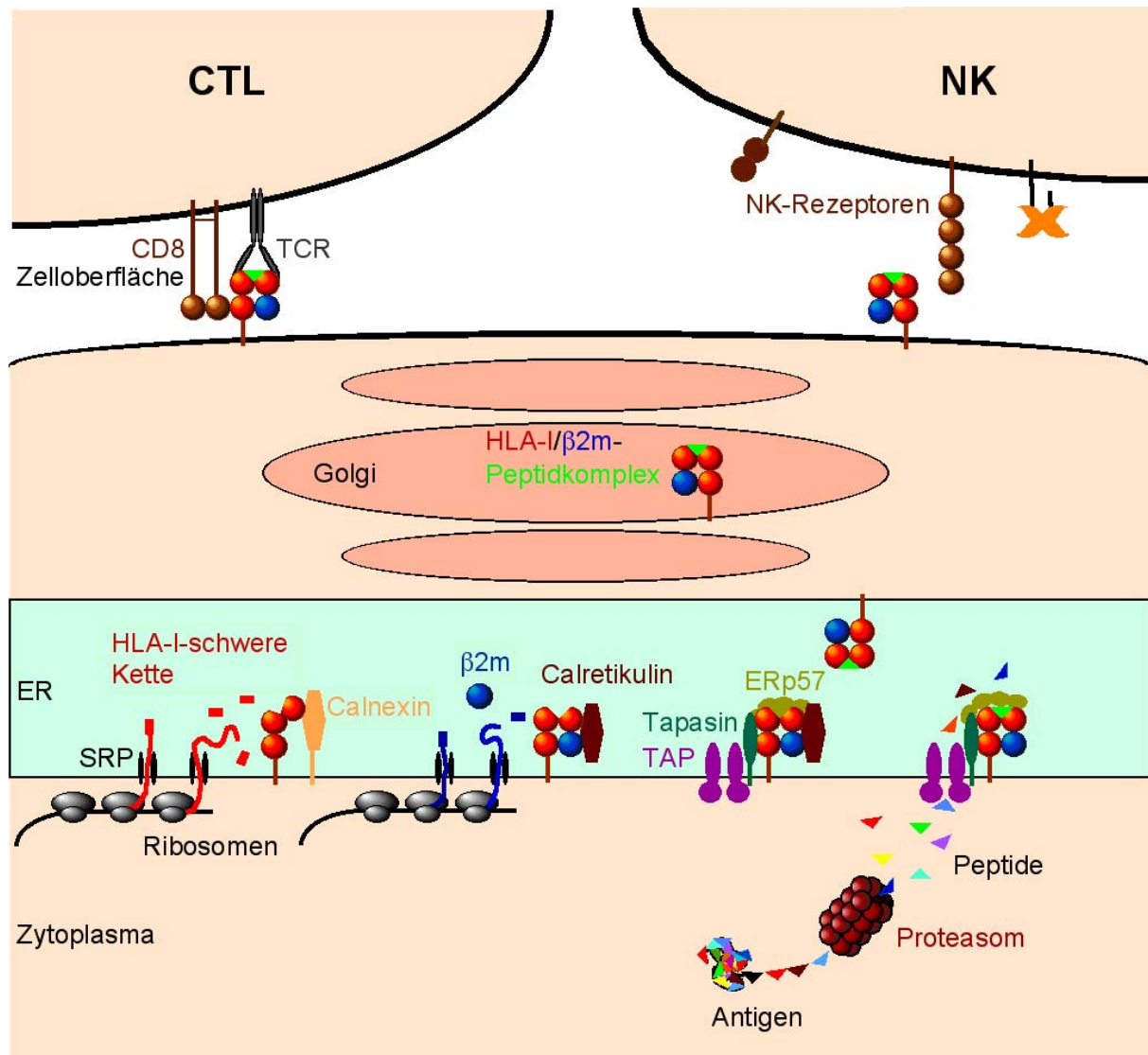


Abb. 1.2: Übersicht über die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation

Die MHC-I-schweren Ketten und β2m gelangen kotranslational über das „Signal recognition particle“ (SRP) in das Endoplasmatische Retikulum (ER). Ihre Signalpeptide werden abgespalten. Die Klasse-I-schweren Ketten assoziieren mit dem Chaperon Calnexin. Mit der Bindung von β2m erfolgt ein Austausch von Calnexin gegen ein anderes Chaperon, Calretikulin. Die Klasse-I-schwere Kette/β2m-Komplexe werden in den Peptidladekomplex bestehend aus dem Peptidtransporter TAP, Tapasin, der Thioloxidoreduktase ERp57 und Calretikulin integriert. Dabei ist die MHC-I-schwere Kette über Tapasin an TAP gebunden. Endogene Proteine werden im Zytoplasma durch den Proteasomenkomplex degradiert. Die entstehenden Peptide werden über den TAP-Transporter in das Lumen des ER transportiert. Hochaffine Peptide können dort an MHC-I/β2m-Komplexe binden und ermöglichen den Transport des trimolekularen Komplexes aus Klasse-I-schwerer Kette, β2m und Peptid über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche. Dort können die MHC-I-Komplexe mit TCR auf CTL oder inhibitorischen oder aktivierenden Rezeptoren auf T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten oder Makrophagen in Interaktion treten.

Der Zusammenbau der MHC-I-Peptidkomplexe erfolgt im ER. Das ER hat eine „Qualitätskontrollfunktion“, durch die sichergestellt wird, daß fehlgefaltete Proteine nicht transportiert,

sondern degradiert werden (Hammond und Helenius 1995). Chaperone binden reversibel an falsch gefaltete Proteine und erlauben mehrere Versuche, die richtige native Konformation zu erlangen. Moleküle, die nur partiell gefaltet sind, werden im ER zurückgehalten. $\beta 2m$ und ein gebundenes Peptid sind wichtige Bestandteile der Klasse-I-Komplexe. Ihre Abwesenheit führt zu falscher Faltung, Transport über den Sec61p Komplex ins Zytoplasma und Degradation der schweren Kette (Pilon *et al.* 1997, Rapoport *et al.* 1996, Wiertz *et al.* 1996). Entsprechend werden Dimere aus schweren Ketten und $\beta 2m$ in Zellen, in denen die Peptidbildung oder der TAP-Transport inhibiert ist, oder MHC-I-schwere Ketten in Zellen ohne $\beta 2m$ schlecht auf der Zelloberfläche exprimiert (Cerundolo *et al.* 1990, Hughes *et al.* 1997, Salter und Cresswell 1986, Wiertz *et al.* 1996). Ebenso werden auch in Wildtypzellen Dimere aus schwerer Kette und $\beta 2m$ im Zytosol degradiert. Dies legt die Vermutung nahe, daß Peptide limitierende Komponenten beim Zusammenbau der vollständigen Komplexe darstellen. Auf diese Weise ist gewährleistet, daß freie MHC-Komplexe bei Infektionen oder Entartung der Zellen in ausreichender Menge vorhanden sind (Hughes *et al.* 1997, Wiertz *et al.* 1996).

MHC-I-schwere Ketten gelangen durch kotranslationalen Transport in das ER. Dabei wird das Signalpeptid abgespalten (Abb. 1.2). Im Anschluß an die Translokation in das ER bindet die neu synthetisierte α -Kette zunächst an Calnexin. Calnexin ist ein membrangebundenes, Calcium-abhängiges, Lektin-ähnliches Chaperon (David *et al.* 1993, Degen *et al.* 1992). Es bindet monoglukosylierte N-gekoppelte Glykane und ist an der korrekten Faltung des Moleküls beteiligt (Carreno *et al.* 1995, Hammond und Helenius 1995, Zhang *et al.* 1995). Die Assoziation mit $\beta 2m$ erleichtert die Faltung der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen des Klasse-I-Moleküls während der *de novo*-Synthese (Hansen *et al.* 1988). Wenn $\beta 2m$ an den Komplex aus Calnexin und schwerer Kette bindet, wird Calnexin gegen Calretikulin ausgetauscht. Calretikulin ist ein lösliches, zu Calnexin homologes, Calcium-abhängiges Lektin (Farmery *et al.* 2000, Sadasivan *et al.* 1996). Die Assoziation von Calnexin und MHC-I-Molekülen mit TAP scheinen sich gegenseitig auszuschließen (Diedrich *et al.* 2001). Das Heterodimer aus schwerer Kette und $\beta 2m$ assoziiert unter Beihilfe von Calretikulin, der Thioloxidoreduktase ERp57 und Tapasin mit der TAP1-Untereinheit des TAP-Transporters (Abb. 1.2, Hughes und Cresswell 1998, Sadasivan *et al.* 1996, Solheim *et al.* 1997, Suh *et al.* 1994). Tapasin ist ein prolinreiches Glykoprotein der Ig-Superfamilie. Ein Lysinrest im hydrophoben Bereich dient der Interaktion mit anderen Proteinen (Herberg *et al.* 1998, Ortmann *et al.* 1997). In normalen Zellen wird der Komplex aus Calretikulin, MHC-I-schwerer Kette und $\beta 2m$ über Tapasin an TAP gebunden (Sadasivan *et al.* 1996). Dabei sind vier Tapasinmoleküle mit einem TAP1/TAP2 Heterodimer assoziiert und pro Tapasin liegt je ein Klasse-I/ $\beta 2m$ -Komplex vor (Androlewicz *et al.* 1994, Ortmann *et al.* 1997). Tapasin liefert auch das ER-Retentionssignal für leere MHC-I-Moleküle.

Hat ein geeignetes Peptid an den Komplex gebunden, trennt sich der HLA-I-Komplex von allen Hilfsmolekülen und kann über den Golgi-Apparat und das trans-Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche transportiert werden (Abb. 1.2).

1.1.3 Einteilung der Moleküle der MHC-Klasse-I

Vor allem auf Grund der Unterschiede im Polymorphismus wurden die 6 HLA-I-Loci in zwei Gruppen eingeteilt: HLA-Ia- oder auch klassische HLA-I-Loci (HLA-A, -B und -C) und HLA-Ib- oder nicht klassische HLA-I-Loci (HLA-E, -F, -G). Die drei klassischen HLA-I-Loci sind hochpolymorph. Bisher wurden 303 HLA-A-, 559 HLA-B- und 150 HLA-C-Allele identifiziert (<http://www.anthonynolan.com/HIG/index.html>, Januar 2004). In einer Population gibt es sehr viele Allele, die für zahlreiche verschiedene Oberflächenmoleküle kodieren. Die hohe Zahl an Allelen in einer Population stellt sicher, daß ein Pathogen zumindest von einem Teil der Bevölkerung erkannt wird. Dieser Polymorphismus ist auch die Grundlage für die Erkennung von Fremdgewebe bei Transplantationen. Die meisten Unterschiede befinden sich in den α 1- und α 2-Domänen in oder in der Nähe der peptidbindenden Region und beeinflussen so die peptidbindenden Eigenschaften der einzelnen Allele. Im Gegensatz dazu ist der Polymorphismus von HLA-E, -F und -G gering: 6 Allele von HLA-E, 2 Allele von HLA-F und 15 Allele von HLA-G (<http://www.anthonynolan.com/HIG/index.html>, Januar 2004). Neben dem geringen Polymorphismus waren die eingeschränkte Gewebeverteilung, die geringe Expression und die bis dahin unbekannte Funktion von HLA-E, -F und -G für die Bezeichnung als nicht-klassische HLA-I-Moleküle verantwortlich (Le Bouteiller und Lenfant 1996, Shawa *et al.* 1994).

1.1.3.1 HLA-E

Die Allele von HLA-E können in zwei Gruppen unterteilt werden, die an Aminosäureposition 107 einen Arginin- (HLA-E^R) bzw. Glycinrest (HLA-E^G) tragen. Sie kommen in vergleichbarer Häufigkeit in der kaukasischen Population vor (Geraghty *et al.* 1992). HLA-E wird in allen untersuchten Geweben und Zelllinien transkribiert (Ulbrecht *et al.* 1992 a, Wei und Orr 1990). Seine Zelloberflächenexpression ist jedoch gering. Inkubation bei 26°C, Zugabe von humanem β 2m oder exogenen Peptiden kann in Transfektanten die Oberflächenexpression stabilisieren (Ulbrecht *et al.* 1992 b). HLA-E ist in der Lage, Peptide, bevorzugt Nonamere, aus der Signalsequenz von einigen HLA-I-Molekülen (As 3-11) zu binden, wobei die Positionen 2 (Methionin), 7 und 9 (Leucin) entscheidend sind. Vor allem das Methionin an Position zwei des Peptids ist essentiell für die Funktion (Braud *et al.* 1997, Brooks *et al.* 1999, Lee *et al.* 1998 a). Auch das Signalpeptid G₃₋₁₁ (VMAPRTLFL) von HLA-G kann als Ligand dienen (Llano *et al.* 1998, Lee *et al.* 1998 a).

1.1.3.2 HLA-G

Genorganisation und Protein von HLA-G im Vergleich zu MHC-Klasse-Ia

Die typische Exon-Intron-Struktur und Domänenorganisation von HLA-Ia-Genen findet sich auch in HLA-G wieder (Abb. 1.3 a). Exon 1 beginnt mit einem kurzen 5'-untranslatierten Teil (5'-UT), gefolgt von 73 bp für das Signalpeptid, welches das Einschleusen in das ER bewerkstelligt und nach Eintritt in das ER abgespalten wird. Exon 2 (270 bp) kodiert die aus 90 Aminosäuren bestehende α 1-Domäne und Exone 3 und 4 (je 276 bp) die je 92 Amino-

säuren der $\alpha 2$ und $\alpha 3$ -Domänen. Die hydrophobe Transmembranregion wird von Exon 5 kodiert. Exone 6-8 der HLA-I-Gene kodieren die zytoplasmatische Domäne. Exon 8 enthält außerdem die 3'-untranslatierte Region (3'-UT). Bei HLA-G ist das Exon 7 der HLA-Ia-Gene nicht im Transkript enthalten (Abb. 1.3 a). Ein weiteres spezifisches Merkmal von HLA-G ist die Anwesenheit eines Stopkodons im 2. Kodon von Exon 6, wodurch der zytoplasmatische Anteil von HLA-G anstatt ca. 30 nur 6 Aminosäuren lang ist (Ellis *et al.* 1990, Geraghty *et al.* 1987). Dem verkürzten zytoplasmatischen Anteil von HLA-G fehlt das potentielle Endozytosignal, das in Form eines YSQA- oder LI-Motivs in allen MHC-I-Molekülen vorhanden ist. Dies führt zu einer im Vergleich zu anderen Klasse-I-Molekülen reduzierten Endozytose und daraus resultierend zu einer deutlich erhöhten Halbwertszeit von HLA-G an der Zelloberfläche (Davis *et al.* 1997, Park *et al.* 2001). Die Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne bringt zwei Lysinreste an Positionen -4 und -5 vom C-Terminus von HLA-G, wo sie als ER-Retrieval- und Retentionssignal wirken. Nach Assoziation von HLA-G mit hochaffinen Peptiden ist die partielle Rückführung vom cis-Golgi zum ER reduziert, was zu einem schnelleren Transport und einer erhöhten Zelloberflächenexpression führt. Beladung mit hochaffinen Liganden könnte über eine Konformationsänderung in einer Inaktivierung des Rückführungsmotivs resultieren (Park *et al.* 2001). Außerdem fehlt HLA-G ein hoch konservierter Tyrosinrest, der als Substrat für Tyrosinkinase dient. Dies könnte funktionelle Auswirkungen auf die Signalvermittlung haben (Geraghty *et al.* 1987).

Die Gesamthomologie zwischen HLA-G und der HLA-A/-B/-C Protein-Konsensus-Sequenz beträgt 86 % und entspricht damit der Homologie von HLA-A und -B untereinander. Die meisten Unterschiede liegen zwischen Aminosäuren 61 und 83 (Geraghty *et al.* 1987). In diesem Bereich unterscheiden sich auch die HLA-A-, -B- und -C-Allele am stärksten voneinander (Parham *et al.* 1988). Während die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen Homologien von 81 % bzw. 85 % aufweisen, ist die $\alpha 3$ -Domäne mit 91 % Homologie am stärksten konserviert (Geraghty *et al.* 1987). Die $\alpha 3$ -Domäne von HLA-G enthält die Aminosäurereste, die für die nicht-kovalente Assoziation mit $\beta 2m$ und die Bindung an den CD8-Korezeptor wichtig sind (Sanders *et al.* 1991). Die meisten Aminosäurereste, die für die Interaktion mit CD8 von Bedeutung sind, und alle für die Interaktion mit $\beta 2m$ verantwortlichen Reste in der $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Domäne sind bei HLA-G konserviert (Tysoe-Calnon *et al.* 1991, van der Ven *et al.* 1998 b).

Viele strukturelle Eigenschaften von Klasse-Ia-Antigenen sind in HLA-G konserviert. Die α -Kette der Klasse-I-Moleküle des Menschen besitzt eine N-glykosidisch gebundene Kohlenhydratseitenkette am Ende der $\alpha 1$ -Domäne (Asn 86) in der Nähe des Übergangs in die $\alpha 2$ -Domäne. Unterschiede im Molekulargewicht beruhen auf unterschiedlich starker Glykosylierung der Ketten. Diese einzelne N-Glykosylierungsstelle ist auch in HLA-G vorhanden. Die Cysteine in der $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Domäne sind konserviert und führen zur Bildung von Disulfidbrücken in der $\alpha 2$ - (Cys101-Cys164) und $\alpha 3$ -Domäne (Cys203-Cys259). Zusätzliche Cysteine befinden sich bei HLA-G an den Aminosäurepositionen 42 in der $\alpha 1$ -Domäne und 147 in der $\alpha 2$ -Domäne (Geraghty *et al.* 1987, siehe auch Abb. 6.1 und Anhang 9.2).

Polymorphismus von HLA-G

Während für Klasse-Ia-Moleküle der große Polymorphismus charakteristisch ist, sind von HLA-G bis jetzt 15 Allele beschrieben worden. Die Sequenzunterschiede liegen meist in den Exonen 2 und besonders 3, welche die Peptidbindungsregion kodieren. Nur vier HLA-G-Allele unterscheiden sich auch auf Aminosäureebene gegenüber dem Allel HLA-G*01011 (Abb. 1.1, Geraghty *et al.* 1987): HLA-G*0103 (Thr31Ser, Morales *et al.* 1993), HLA-G*0104 (Leu110Ile, Yamashita *et al.* 1996), HLA-G*0105N (1597 Δ C, delC¹³⁰, Ober *et al.* 1998, Suarez *et al.* 1997) und HLA-G*0106 (Thr258Met, Hviid *et al.* 2001). Die fünf häufigsten Sequenzabweichungen sind stille Austausch (As 57, 93 und 107) oder konservative Aminosäuresubstitutionen (Thr31Ser, Leu110Ile) (Alvarez *et al.* 1999, Bainbridge *et al.* 1999, Ellis *et al.* 1990, Hviid *et al.* 1997 und 2001, Ishitani *et al.* 1999, Karhukorpi *et al.* 1996, Kirszenbaum *et al.* 1997, Matte *et al.* 2002, Morales *et al.* 1993, Ober *et al.* 1996, Ober und Aldrich 1997, Suarez *et al.* 1997, Tamaki *et al.* 1993, van der Ven *et al.* 1998 a, Yamashita *et al.* 1996). Die letztgenannten Aminosäurepositionen sind wahrscheinlich weder an der Peptidbindung noch an der Interaktion mit dem TCR beteiligt (Bjorkman *et al.* 1987 a, Ober und Aldrich 1997). Außerdem gibt es eine Deletionsmutante (HLA-G*0105N), bei der im Exon 3 ein Cytosin in Kodon 129 oder 130 fehlt (1597 Δ C). Dadurch entsteht eine Leserastermutation, die zu einem Stopkodon an Position 189 am Beginn von Exon 4 führt (Hviid *et al.* 1997, Ishitani *et al.* 1999, Ober *et al.* 1998, Suarez *et al.* 1997, van der Ven *et al.* 1998 a). Da es gesunde Individuen gibt, die homozygot für das HLA-G*0105N-Allel sind, ist die Voll-Länge-Isoform für das Überleben nicht notwendig (Castro *et al.* 2000, Matte *et al.* 2000, Ober *et al.* 1998).

Regulation der Transkription und der HLA-G-Proteinexpression

Die Expression von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche wird hauptsächlich durch die Transkriptionsrate bestimmt. Sie kann durch viele Zytokine moduliert werden. IL-10 reguliert die HLA-G-Expression in Trophoblasten und Makrophagen hoch (Moreau *et al.* 1999). Die Expression von HLA-G kann auch durch IFN- γ oder in Kombination mit GM-CSF, IL-2 oder IFN- β induziert oder verstärkt werden (Amiot *et al.* 1998, Lefebvre *et al.* 2001, Yang *et al.* 1996).

HLA-G wird biallelisch in extravillösen Cytotrophoblasten von Plazenten des ersten und dritten Trimesters exprimiert (Bainbridge *et al.* 1999, Hashimoto *et al.* 1997, Hviid *et al.* 1998). Da der Polymorphismus von HLA-G gering ist, sollte das paternale HLA-G jedoch keine Alloantwort auslösen.

Eine Besonderheit von HLA-G ist das Auftreten verschiedener Spleißformen, wodurch mindestens vier membrangebundene und drei lösliche Isoformen entstehen (Abb. 1.3 b und c). Es sind zwar auch spontan auftretende Spleißvarianten von HLA-A- und -B-mRNA bekannt, aber ihre Expression erreicht nicht das Ausmaß wie bei HLA-G (Curran *et al.* 1999, Krangel 1986). Spleißvarianten treten bei HLA-A und -B auch während der Herunterregulation der HLA-I-Expression in Tumoren, als Folge von Infektion mit intrazellulären

Bakterien oder nach IFN- γ Stimulation auf (He und Le 1995, Huang *et al.* 1997, Wang *et al.* 1999). Die Regulation des alternativen Spleißens bei HLA-G ist noch nicht aufgeklärt.

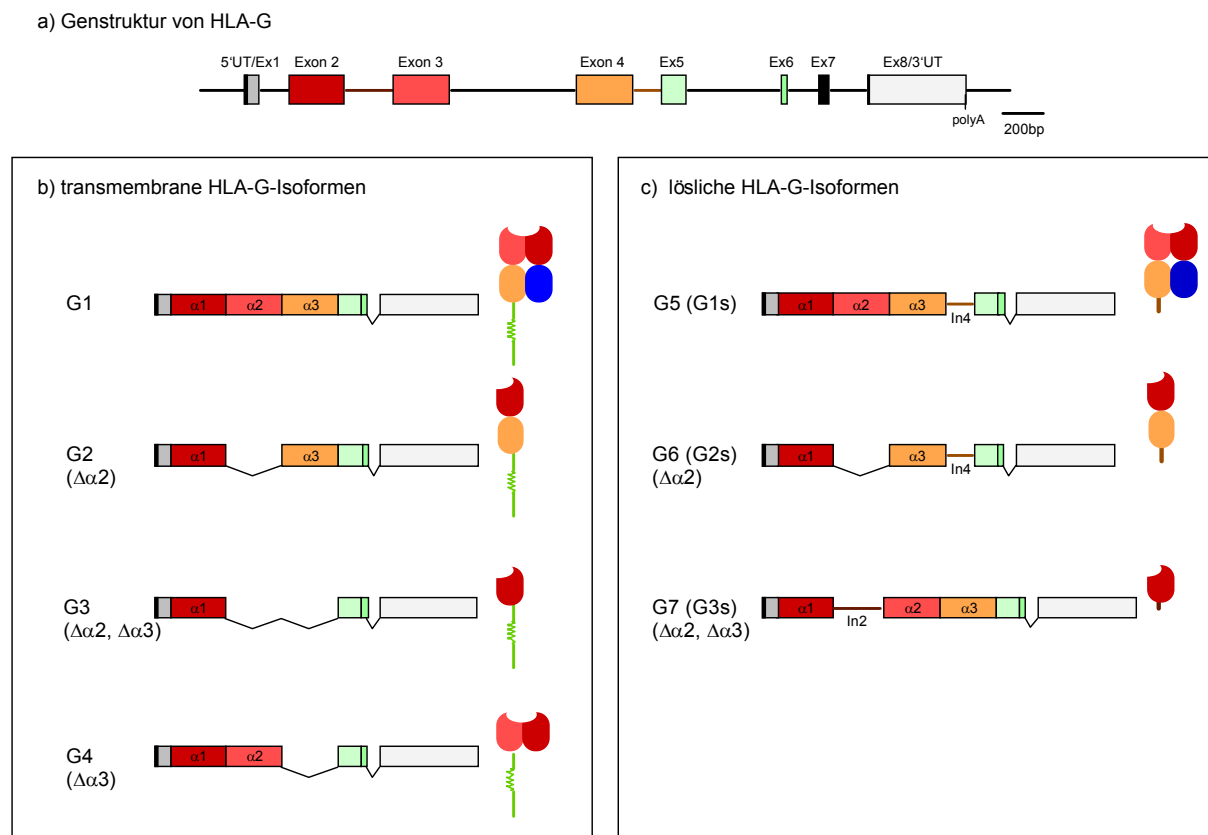


Abb. 1.3: Organisation des Gens, der Transkripte und Struktur der von ihnen kodierten HLA-G-Isoformen
 Gezeigt sind die Genstruktur von HLA-G (a), die durch alternatives Spleißing entstehenden mRNA der einzelnen membranständigen (b) und löslichen (c) Isoformen und die abgeleiteten Proteinstrukturen. Das HLA-G-Gen besteht aus 7 Exonen. Exon 1 kodiert die Signalsequenz. Exone 2, 3 und 4 kodieren die extrazellulären Domänen $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ des HLA-G-Polypeptids und Exon 5 die Transmembrandomäne und den Großteil der zytoplasmatischen Domäne. Die C-terminale Aminosäure und der 3'-untranslatierte Bereich werden durch Exon 6 kodiert. HLA-G1 repräsentiert die membrangebundene Voll-Länge-HLA-G-Isoform. Durch alternatives Spleißing entstehen mehrere verkürzte Isoformen. Der Spleißingvariante HLA-G2 fehlt das Exon 3, das die $\alpha 2$ -Domäne kodiert. HLA-G4 besitzt keine $\alpha 3$ -Domäne, die von Exon 4 kodiert wird. Die kürzeste Isoform HLA-G3 kodiert ein Polypeptid, dessen $\alpha 1$ -Domäne direkt an die Transmembrandomäne gekoppelt ist. Die löslichen Isoformen HLA-G5 (HLA-G1s) und HLA-G6 (HLA-G2s) werden von Spleißingvarianten translatiert, die das Intron 4 enthalten. Ein Stopkodon in Intron 4 verhindert die Translation der Transmembranregion. Die Isoform HLA-G7 (HLA-G3s) besteht nur aus der $\alpha 1$ -Domäne, da das Intron 2, das in der mRNA enthalten ist, ein Stopkodon enthält. Die HLA-G-Polypeptide, die den alternativen Formen der HLA-G-mRNA entsprechen, sind schematisch gezeigt.

Die membrangebundenen HLA-G-Isoformen werden als HLA-G1 (HLA-G1m), HLA-G2 (HLA-G2m), HLA-G3 (HLA-G3m) und HLA-G4 bezeichnet (Abb. 1.3 b).

HLA-G1: Das Voll-Länge-Transkript kodiert für ein Polypeptid, das im Aufbau den klassischen MHC-I-Molekülen entspricht, $\beta 2m$ -assoziiert auf der Zelloberfläche exprimiert wird und in der Lage ist, Peptide zu präsentieren (Shimizu *et al.* 1988). Durch den gegenüber HLA-Ia-Molekülen verkürzten zytoplasmatischen Anteil von HLA-G beträgt das Molekulargewicht von HLA-G1 nur 38,2 kDa.

Durch das Entfernen von ein oder zwei Exonen entstehen kurze Spleißvarianten, die für membrangebundene Isoformen kodieren.

HLA-G2: Die Isoform HLA-G2 enthält kein Exon 3, das die α 2-Domäne kodiert. Das HLA-G2 Protein ist 27,7 kD groß (Ishitani und Geraghty 1992).

HLA-G3: Der Isoform HLA-G3 fehlen die Exone 3 und 4, die den α 2- und α 3-Domänen entsprechen. Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 17,1 kD (Ishitani und Geraghty 1992).

HLA-G4: Dieser Isoform fehlt das Exon 4. Das HLA-G4-Protein besitzt dadurch keine α 3-Domäne und hat ein Molekulargewicht von 27,6 kD (Kirszenbaum *et al.* 1994).

Von HLA-G existieren mehrere lösliche Isoformen, die von mRNA kodiert werden, in der Introne enthalten sind. Die Translation wird jeweils durch ein Stopkodon in der Intronsequenz vor der Transmembrandomäne beendet (Abb. 1.3 c).

HLA-G5 (HLA-G1s): Die sezernierte Isoform des HLA-G1-Moleküls wird von einer mRNA kodiert, in der die 120 bp der Intron-4-Sequenz nicht entfernt wurden. Der offene Leserahmen dieser mRNA endet im Intron 4, 21 Aminosäuren nach der α 3-Domäne (Fujii *et al.* 1994, Moreau *et al.* 1995). HLA-G5 hat ein Molekulargewicht von 36,5 kD. Es ist mit β 2m assoziiert und bindet Peptide (Lee *et al.* 1995).

HLA-G6 (HLA-G2s): HLA-G6 entsteht durch das Fehlen von Exon 3 im Transkript und das Vorhandensein von Intron 4. Dem 25,9 kD schweren Protein fehlt dadurch die α 2-Domäne, und die Translation stoppt 21 Aminosäuren nach der α 3-Domäne (Fujii *et al.* 1994).

HLA-G7 (HLA-G3s): Die potentielle, lösliche Spleißvariante von HLA-G3 wird von einer mRNA translatiert, die das Intron 2 enthält. Durch ein Stopkodon im Leserahmen von Intron 2 wird die Translation zwei Aminosäuren nach der α 1-Domäne beendet, so daß die entstehende Isoform nur aus der α 1-Domäne besteht und 13,3 kD schwer ist (Paul *et al.* 2000).

Gewebeverteilung von HLA-G

Der Hauptexpressionsort von HLA-G ist die Plazenta (Ellis *et al.* 1986 und 1990, Kovats *et al.* 1990). Die Plazenta ist besonders interessant, weil das Gewebe vom Fötus abstammt und daher mütterliche und väterliche Antigene exprimiert. Väterliche MHC-I-Moleküle sollten eigentlich eine maternale Alloimmunreaktion induzieren, was zur Abstoßung des semi-allogenen Fötus führen würde.

Menschliche Prä-Implantationsembryos exprimieren keine HLA-A-, HLA-B- und HLA-II-Moleküle (Hutter und Dohr 1998). Nur Teile des menschlichen Prä-Implantationsembryos exprimieren HLA-G. Im Trophoectoderm von frühen Blastocysten wurde ebenfalls HLA-G-Protein nachgewiesen (Jurisicova *et al.* 1996).

Nach der Implantation entsteht aus dem Trophoectoderm der implantierten Blastocyste der Trophoblast und bildet die fötale Komponente der maternal-fötalen Barriere. Aus den Cytotrophoblasten entstehen alle Subpopulationen von Trophoblastenzellen, die anhand von Lokalisation, Morphologie und Differenzierungsstatus unterschieden werden (Hunt und Orr

1992, Kovats *et al.* 1990). Sie üben eine Reihe von Funktionen aus, u.a. den Nährstofftransport von der Mutter zum Fötus und die Synthese verschiedener Hormone und Wachstumsfaktoren. Plazentale Villi werden durch zwei Schichten von Trophoblastenzellen gebildet. Der voll differenzierte Syncytiotrophoblast bildet eine durchgehende Zellschicht in Kontakt mit dem mütterlichen Blut. Direkt unter dem Syncytium sind villöse Cytotrophoblasten lokalisiert. Während im Syncytiotrophoblast kein HLA-G nachgewiesen werden konnte, exprimieren villöse Cytotrophoblasten HLA-G-Protein (Bensussan *et al.* 1995, Hammer *et al.* 1997, Hutter *et al.* 1996, McMaster *et al.* 1995, Solier *et al.* 2002). Membrangebundenes und lösliches HLA-G wird hauptsächlich in extravillösen Cytotrophoblasten exprimiert. Diese Trophoblastensubpopulation zeichnet sich durch ihre proliferativen und im Anschluß daran invasiven Eigenschaften aus. Sie wandert kurz nach der Implantation von den Villi in das mütterliche Gewebe, das Myometrium, die Decidua basalis und die Spiralarterien ein. Sie bilden so die interstitiellen Trophoblasten, die für die Verankerung der Plazenta sorgen, bzw. die endovaskulären Trophoblasten, die durch Umgestaltung der Spiralarterien einen vermehrten Blutfluß ermöglichen. Mit fortschreitender Schwangerschaft werden die extravillösen Cytotrophoblasten weniger invasiv und bilden die Chorionmembran, die den Embryo umgibt und direkt an die mütterliche Decidua angeschlossen ist (Blaschitz *et al.* 1997, Kovats *et al.* 1990, Loke *et al.* 1997, McMaster *et al.* 1995 und 1998, Pröll *et al.* 2000, van Lierop *et al.* 2002). Die HLA-G-Expression korreliert dabei mit der Invasivität der extravillösen Trophoblasten (Goldmann-Wohl *et al.* 2000). Während voranschreitender Schwangerschaft läßt das Expressionsniveau von HLA-G nach, wohingegen die Expression von HLA-A und – B zunimmt (Kovats *et al.* 1990, Wei und Orr 1990).

Die extravillösen Trophoblasten sind in engem Kontakt mit mütterlichen Immunzellen, wie T-Zellen und NK-Zellen, die während der Implantation im Uterus angereichert werden. Es erfolgt jedoch keine Abstoßung. Die invasiven extravillösen Cytotrophoblasten, die an der Implantationsstelle in die Decidua und in mütterliche Spiralarterien einwandern, werden nicht zerstört, obwohl sie einen Tumorphänotyp aufweisen. Dies läßt sich zum Teil damit erklären, daß Cytotrophoblasten negativ für die hochpolymorphen HLA-I-Antigene HLA-A und HLA-B und für HLA-II-Komplexe sind (Hutter *et al.* 1996). Eine Subpopulation von Trophoblastenzellen, die extravillösen Trophoblasten, inklusive interstitielle Trophoblasten und endovaskuläre Trophoblasten exprimieren allerdings HLA-C (King *et al.* 1996 und 2000 a, Zemmour und Parham 1992). Der Polymorphismus von HLA-C ist deutlich geringer als der von HLA-A und –B (siehe auch 1.1.3). Zudem wird in Trophoblasten HLA-E exprimiert (King *et al.* 2000 b, Wei und Orr 1990).

Zelloberflächenexpression von HLA-G wurde auch auf Endothelzellen der Chorionvilli und Amnionepithelzellen nachgewiesen (Blaschitz *et al.* 1997, Hammer *et al.* 1997, Houlihan *et al.* 1995, McMaster *et al.* 1998). Die sezernierten HLA-G-Isoformen HLA-G5 und HLA-G6 wurden in Amnionflüssigkeit und im Serum gefunden (Athanasakis *et al.* 1999, Blaschitz *et al.* 1997, Hunt *et al.* 2000, Puppo *et al.* 1999, Rebmann *et al.* 1999, van Lierop *et al.* 2002). Dabei ist die Konzentration von löslichem HLA-G im Plasma zum Teil von den HLA-G-Allelen abhängig (Rebmann *et al.* 2001).

Durch Untersuchungen HLA-G-transgener Mäuse, die das HLA-G-Gen unter Kontrolle des HLA-G-Promotors enthalten, wurde die Expression von HLA-G-mRNA in Plazenta, Testis, Thymus, Ovarien, Milz und Gehirn nachgewiesen (Schmidt und Orr 1995). Ebenso wurde beim Menschen HLA-G-Expression nicht nur in der Plazenta, sondern auch in vielen anderen fötalen und adulten Geweben festgestellt. In der Regel ist sie aber um Größenordnungen niedriger als die Mengen an klassischen MHC-I-Molekülen in denselben Geweben (Onno *et al.* 1994).

Neben der Plazenta sind vor allem Thymusepithelzellen und aktivierte Makrophagen Expressionsorte von HLA-G (Aractingi *et al.* 2001, Chu *et al.* 1998, Crisa *et al.* 1997, Horuzsko *et al.* 1997, Mallet *et al.* 1999 a und 1999 b, Moreau *et al.* 1999, Schmidt und Orr 1995, Yang *et al.* 1996). Außerdem erfolgt HLA-G-Expression in so verschiedenen Geweben wie Myoblasten, Keratinozyten, fötaler Leber, Gehirn, Auge und peripheren B- und T-Zellen (Amiot *et al.* 1996, Houlihan *et al.* 1992, Ishitani und Geraghty 1992, Kirszenbaum *et al.* 1994, Maier *et al.* 1999, Onno *et al.* 1994, Shukla *et al.* 1990, Ulbrecht *et al.* 1994, Wiendl *et al.* 2000).

Extravillöse Cytotrophoblasten und Tumorzellen haben invasive Eigenschaften gemeinsam. Da die HLA-I-Expression in einer Reihe von malignen Erkrankungen verändert ist, weisen Tumoren häufig eine geringe HLA-I-Expression auf. Dies erhöht wiederum ihre Ähnlichkeit mit extravillösen Trophoblasten. Diese Veränderungen können einen entscheidenden Einfluß auf die Immunantwort und Metastasierung von Tumoren haben. Auch veränderte Expression von HLA-G wurde in einigen Tumoren entdeckt. Man findet HLA-G sowohl in Tumoren als auch in den Tumor infiltrierenden Zellen und z.T. erhöhte HLA-G5-Konzentrationen im Serum (Ugurel *et al.* 2001). So wurde HLA-G in Biopsien von Melanom-, Nieren-, Kolon-, Lungen- und Brustkrebspatienten entdeckt (Fukushima *et al.* 1998, Ibrahim *et al.* 2001 und 2003, Lefebvre *et al.* 2002, Paul *et al.* 1998 und 1999, Urosevic *et al.* 2001, Wagner *et al.* 2000). Spezifische Aktivierung von HLA-G wurde auch in Lymphomen festgestellt (Urosevic *et al.* 2002). Dies weist auf eine mögliche Rolle von HLA-G in der Tumorprogression hin.

1.2 HLA-G Interaktionen mit Zellen des Immunsystems und Funktionen von HLA-G

1.2.1 Mit HLA-G interagierende Rezeptoren

HLA-G kann mit verschiedenen Rezeptoren interagieren. Neben dem TCR und Wechselwirkungen mit dem Korezeptor CD8 auf T-Zellen kann HLA-G an verschiedene Immunrezeptoren der Ig-Superfamilie ILT2, ILT4, KIR2DL4 und BY55 binden. Diese Rezeptoren haben überlappende Expressionsmuster. Sie werden auf NK-Zellen (ILT2, KIR2DL4, BY55), T-Zellen (ILT2, KIR2DL4, BY55), B-Zellen (ILT2), Monozyten/Makrophagen (ILT2, ILT4) und Dendritischen Zellen (DC) (ILT2, ILT4) exprimiert (Abb. 1.4).

NK-Zellen exprimieren Zelloberflächenrezeptoren, die HLA-I-Moleküle erkennen. Sie können inhibierend (KIR, killer inhibitory receptors) oder aktivierend (KAR, killer activatory receptors)

wirken (Colonna 1997). Während das Rezeptorrepertoire einer Population variiert, bleibt das eines Individuums stabil (Schilling *et al.* 2002). Dabei ist die Expression von inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren klonal zwischen NK-Zellen verteilt. Individuelle NK-Zellen können mehrere verschiedene inhibitorische Rezeptoren exprimieren. Die Zahl der Zellen, die einen bestimmten Rezeptor tragen, und die Menge an Rezeptoren auf diesen Zellen sind variabel. Meist werden drei bis vier inhibitorische und ein aktivierender Rezeptor auf einer individuellen NK-Zelle exprimiert (Valiante *et al.* 1997). Das Rezeptorrepertoire wird nicht durch den HLA-Haplotyp bestimmt, d.h. NK-Rezeptoren, die keinen Liganden haben, können ebenfalls exprimiert werden. Allerdings muß mindestens ein Rezeptor vorhanden sein, der ein Selbst-MHC-I-Allel erkennt (Gumperz *et al.* 1996, Valiante *et al.* 1997, Zimmer *et al.* 1998). NK-Rezeptoren, für welche die Person keine HLA-I-Liganden besitzt, könnten an der Erkennung des allogenen Fötus durch die Mutter beteiligt sein.

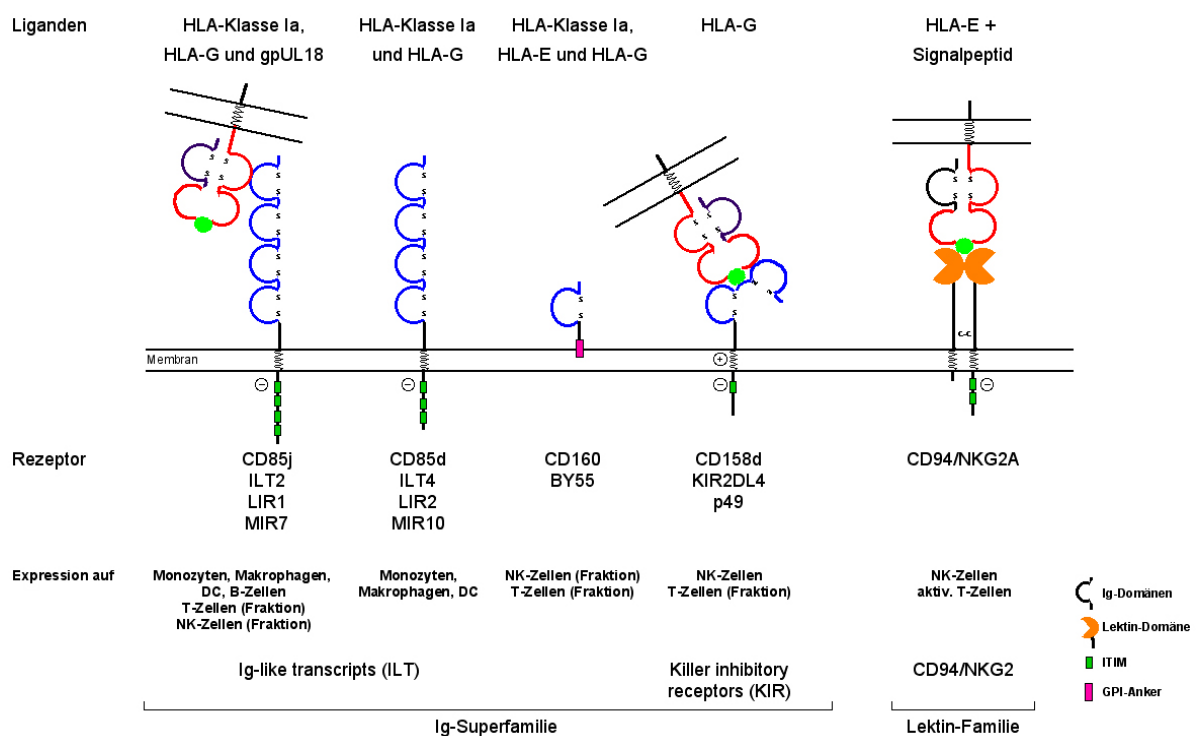


Abb. 1.4: Über HLA-G wirkende Rezeptoren

Rezeptoren der Ig-Superfamilie und der Lektinfamilie, die direkt (ILT2, ILT4, KIR2DL4, BY55) bzw. indirekt (CD94/NKG2A) mit HLA-G in Wechselwirkung treten können, sind schematisch mit ihrer bekannten oder angenommenen Struktur gezeigt. Die Zellen, welche die Rezeptoren exprimieren, und die jeweiligen Liganden sind angegeben. ILT2, ILT4 und CD94/NKG2A sind inhibitorische Rezeptoren, während BY55 aktivierende Signale weiterleitet und KIR2DL4 Eigenschaften sowohl von aktivierenden als auch von inhibierenden Rezeptoren besitzt. Der aktivierende Rezeptor CD94/NKG2C, der an HLA-E bindet, ist nicht gezeigt.

Die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen wird durch die Balance zwischen Signalen von aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren reguliert. In vielen Fällen existieren strukturell verwandte Paare von inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren, die den gleichen Liganden binden. Dabei haben die inhibitorischen Rezeptoren meist eine höhere Affinität zu den jeweiligen HLA-I-Antigenen als ihre aktivierenden Gegenstücke (Biassoni *et al.* 1997, Valés-Gómez *et al.* 1998 und 1999). Die negativen Signale dominieren normalerweise über die aktivierenden. Durch NK-Zellen, die nur ein Selbst-Allel erkennen, kann so schon der

Verlust oder eine verringerte Expression eines einzelnen MHC-I-Allels in einer infizierten oder transformierten Zelle erkannt werden (Pende *et al.* 1998).

Die Expression dieser Rezeptoren für MHC-I-Komplexe ist nicht auf NK-Zellen beschränkt. Sie finden sich auch auf einer kleinen Population von $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen, wo sie Zytotoxizität und Zytokinproduktion kontrollieren (D'Andrea *et al.* 1996, Mingari *et al.* 1995, 1997 und 1998). Das KIR Repertoire von CTL ähnelt dem von NK-Zellen. Aber KIR⁺ T-Zellen werden nicht darauf selektioniert, daß sie einen tolerogenen inhibitorischen Rezeptor tragen (Uhrberg *et al.* 2001, Young und Uhrberg 2002).

Die inhibitorischen KIR unterscheiden sich strukturell. Sie gehören zu der Ig-Superfamilie oder zu der C-Typ Lektinfamilie. Gemeinsam aber ist ihnen, daß das inhibitorische Signal über ITIM-Sequenzen (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, I/L/VxYxxL/V) in den zytoplasmatischen Domänen vermittelt wird. Nach Bindung des Liganden und Aktivierung des inhibitorischen Rezeptors werden die Tyrosine der ITIM-Sequenzen durch die Protein-Tyrosinkinase Lck phosphoryliert. Dadurch bieten sie eine Bindungsstelle für Phosphatasen, die SH2-Domänen enthalten, wie die Tyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2 (Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 bzw. -2). Dies wiederum führt zu einer Inhibition der proximalen Tyrosinkinasen (Binstadt *et al.* 1996, Burshtyn *et al.* 1999, Campbell *et al.* 1996, Fry *et al.* 1996, Vivier und Daeron 1997, Vyas *et al.* 2001).

1.2.1.1 Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie

KIR (killer cell inhibitory receptors, killer cell Ig-like receptors)

Humane KIR werden von einer Genfamilie auf Chromosom 19 (19q13.4) kodiert. Sie sind Typ I transmembrane Glykoproteine und gehören zur Ig-Superfamilie. Sie werden auf NK-Zellen und einer kleinen Gruppe von T-Zellen exprimiert. Die Rezeptordiversität wird durch allelischen Polymorphismus und alternatives Spleißen erzeugt. Außerdem existieren verschiedene Haplotypen in der Population (Döhning *et al.* 1996 a, Martin *et al.* 2000, Selvakumar *et al.* 1997, Uhrberg *et al.* 1997 und 2002, Vilches *et al.* 2000, Wilson *et al.* 2000).

KIR interagieren mit den $\alpha 1/\alpha 2$ -Domänen der MHC-I-Moleküle, die auch für die Peptidbindung zuständig sind. Für die Spezifität der HLA-B- und -C-spezifischen Rezeptoren sind Aminosäuren an den Positionen 77-83 der $\alpha 1$ -Domäne der MHC-I-Antigene verantwortlich. Aber auch andere Aminosäuren der $\alpha 1$ -Domäne spielen eine Rolle. So ist die Aminosäure 44 für die Spezifität von KIR2DL1 und KIR2DL2 für verschiedene HLA-C-Allele wichtig. Der Austausch von Aminosäuren in der Peptidbindungsgrube kann die Erkennung durch KIR beeinflussen (Biassoni *et al.* 1995, Cella *et al.* 1994, Gumpertz *et al.* 1997, Mandelboim *et al.* 1997, Winter und Long 1997). Dies beruht vermutlich auf der dadurch verursachten Veränderung des gebundenen Peptidrepertoires, da die Erkennung der MHC-I-Moleküle durch KIR auch von dem gebundenen Peptid abhängen kann (Malnati *et al.* 1995, Peruzzi *et al.* 1996, Rajagopalan und Long 1997, Zappacosta *et al.* 1997).

Anhand der Zahl der Ig-ähnlichen Domänen können zwei KIR-Subgruppen unterschieden werden (Tab. 1.1). KIR2D enthalten zwei und KIR3D drei extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen. Dabei erkennen die meisten KIR mit zwei Ig-Domänen Untergruppen von HLA-C, während KIR mit drei Ig-Domänen HLA-A- und HLA-B-Allele erkennen. In beiden Gruppen können anhand der Heterogenität des zytoplasmatischen Anteils die KIR, die eine lange zytoplasmatische Domäne mit zwei ITIM-Sequenzen im Abstand von 26 Aminosäuren enthalten (z.B. KIR2DL und KIR3DL), von den aktivierend wirkenden KAR unterschieden werden. Diese zeichnen sich durch einen kurzen zytoplasmatischen Anteil ohne ITIM-Sequenzen aus (z.B. KIR2DS und KIR3DS) (Biassoni *et al.* 1996, Moretta *et al.* 1995, Wagtmann *et al.* 1995).

Rezeptor	Struktur	Expression	Liganden	Referenz
KIR2DL1/CD158a (NKAT1/p58.1)	zwei Ig-ähnliche Domänen, zwei ITIM-Motive, kritische As: Asn 77/Lys 80	NK-Zellen, T-Zellen	Cw2, 4, 5, 6	Moretta <i>et al.</i> 1993, Colonna und Samaridis 1995
KIR2DL2/CD158b1 (p58.2) KIR2DL3/CD158b2 (p58.3)	zwei Ig-ähnliche Domänen, zwei ITIM-Motive, kritische As: Ser 77/Asn 80	NK-Zellen, T-Zellen	Cw1, 3, 7, 8	Moretta <i>et al.</i> 1993, Colonna und Samaridis 1995
KIR3DL1/CD158e1 (NKAT3/p70/NKB1)	drei Ig-ähnliche Domänen, zwei ITIM-Motive, kritische As: Ile 80, Arg 83	NK-Zellen, T-Zellen	Bw4	Cella <i>et al.</i> 1994, Litwin <i>et al.</i> 1994, D'Andrea <i>et al.</i> 1995
KIR3DL2/CD158k (NKAT4/p140)	drei Ig-ähnliche Domänen, zwei ITIM-Motive, Homodimer, kritische As: His 74	NK-Zellen, T-Zellen	A*0301	Döhning <i>et al.</i> 1996 b, Pende <i>et al.</i> 1996
ILT2/CD85j (LIR1, MIR7)	vier Ig-ähnliche Domänen, zwei ITIM-Paare	NK-Zellen, T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, DC, B-Zellen	HLA-A-, B- und C-Allele, HLA-G, gpUL18	Colonna <i>et al.</i> 1997, Cosman <i>et al.</i> 1997, Samaridis und Colonna 1997
ILT4/CD85d (LIR2, MIR10)	vier Ig-ähnliche Domänen, drei ITIM-Motive	Monozyten, Makrophagen, DC	HLA-A-, B- und C-Allele, HLA-G	Borges <i>et al.</i> 1997, Colonna <i>et al.</i> 1998, Fanger <i>et al.</i> 1998
KIR2DL4/CD158d (p49)	zwei Ig-ähnliche Domänen, ein ITIM-Motiv, geladene As im TM-Anteil	NK-Zellen, T-Zellen	HLA-G	Cantoni <i>et al.</i> 1998 a, Rajagopalan und Long 1999

Tab. 1.1: Überblick über die charakteristischen Merkmale und Spezifität der bisher charakterisierten KIR, die mit HLA-Klasse-I-Antigenen interagieren

Die KIR sind unter ihren gebräuchlichen Namen, der CD-Nomenklatur und alternativen Bezeichnungen aufgeführt. Ihre strukturellen Merkmale, die positiven Zellpopulationen und ihre Liganden sind angegeben.

Mehrere der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren besitzen selbst keine Sequenzmotive für die Signalübermittlung im zytoplasmatischen Anteil. Sie leiten die Signale über nicht-kovalente Assoziation mit Molekülen weiter, die ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, YxxL - 7x - YxxL) besitzen. Die Assoziation wird über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen einer basischen Aminosäure (meist Lysin) in der Transmembranregion des Rezeptors und einer sauren Aminosäure (meist Asparaginsäure) an entsprechender Stelle im Adapterprotein kontrolliert (Lanier 2001, Cerwenka und Lanier 2001). Ein solches Adapterprotein ist DAP12, ein über eine Disulfidbrücke gekoppeltes 12 kDa Typ I membran-

ständiges Homodimer. Es enthält ein ITAM im zytoplasmatischen Teil und trägt eine negativ geladene Aminosäure im Transmembranteil, mit der es mit der positiv geladenen Aminosäure des KAR interagieren kann. Phosphoryliertes DAP12 fungiert als Adapter und rekrutiert die Tyrosinkinasen ZAP70 und syk (Colonna 1998, Lanier *et al.* 1998).

Ein zu den KIR gehörender Rezeptor, KIR2DL4 (CD158d, p49) reagiert spezifisch mit HLA-G (Cantoni *et al.* 1998 a, Ponte *et al.* 1999, Rajagopalan und Long 1999). Er ist ein Typ I Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 49 kDa und besitzt 2 Ig-Domänen. Dieser Rezeptor weist auf DNA-Ebene ca. 50 % Homologie mit anderen Ig-Superfamilie-Mitgliedern auf (Cantoni *et al.* 1998 a, Selvakumar *et al.* 1996). Das Gen für KIR2DL4 ist auf allen Haplotypen vertreten (Uhrberg *et al.* 2002). KIR2DL4 wird in allen Individuen auf den meisten, wenn nicht allen NK-Zellen exprimiert. Im Gegensatz zu anderen KIR, die in sich überlappenden Gruppen von NK-Zellen exprimiert werden, findet man KIR2DL4-mRNA in allen NK-Zellen (Cantoni *et al.* 1998 a, Rajagopalan und Long 1999, Uhrberg *et al.* 1997, Valiante *et al.* 1997). Dahingegen sprechen Daten von Ponte *et al.* dafür, daß KIR2DL4 besonders in der späten Phase der Schwangerschaft nachweisbar ist und als Rezeptor für HLA-G in decidualen, aber nicht in peripheren NK-Zellen wirkt (Ponte *et al.* 1999). Außerdem wird KIR2DL4 auch in einer Subpopulation von T-Zellen exprimiert (Rajagopalan und Long 1999).

KIR2DL4 besitzt einige ungewöhnliche strukturelle Merkmale (Abb. 1.4, Tab. 1.1). Es gehört zu den Typ II KIR2D-Rezeptoren, da der extrazelluläre Anteil aus zwei Ig-ähnlichen Domänen mit der ungewöhnlichen DO-D2 Konfiguration besteht, eine Eigenschaft die KIR2DL4 nur mit KIR2DL5 teilt. Andere KIR gehören zum D1-D2 bzw. D0-D1-D2 Typ (Vilches *et al.* 2000). Außerdem ist KIR2DL4 ein ungewöhnliches Mitglied der KIR-Familie, weil es Merkmale von inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren in sich vereint. KIR2DL4 besitzt in der zytoplasmatischen Domäne ein ITIM, Kennzeichen von inhibierenden Rezeptoren, und in Übereinstimmung mit aktivierenden Rezeptoren im transmembranen Teil eine geladene Aminosäure (Arginin).

Zunächst wurde KIR2DL4 als inhibierend wirkender Rezeptor beschrieben. HLA-G exprimierende Zellen werden vor Lyse geschützt, wenn die Effektorzelle mit KIR2DL4 transfiziert wird (Rajagopalan und Long 1999). Auch NK-Zellen aus der Decidua werden durch HLA-G exprimierende Zielzellen inhibiert. Dieser Schutz vor Lyse kann durch ein Antiserum gegen p49 aufgehoben werden (Ponte *et al.* 1999). Die Erkennung von HLA-G legte die Vermutung nahe, daß KIR2DL4 als inhibitorischer Rezeptor maternale NK-Zellen inhibiert und so zu einem Schutz des Fötus beiträgt. Trotz des ITIM kann KIR2DL4 auch aktivierende Signale weiterleiten. Das Signal, das durch KIR2DL4 weitergegeben wird, scheint vom Aktivierungsstatus und Zelltyp abhängig zu sein. So induziert KIR2DL4 bei Abwesenheit von Zytokinen in ruhenden NK-Zellen IFN- γ -Produktion, aber keine Zytotoxizität, während mit IL-2 aktivierte NK-Zellen mit erhöhter IFN- γ -Produktion und Zytotoxizität auf Signale von KIR2DL4 reagieren (Rajagopalan *et al.* 2001). Die aktivierende Funktion von KIR2DL4 ist abhängig von dem Arginin-Tyrosin-Motiv in der Transmembrandomäne (Faure and Long 2002, Rajagopalan *et al.* 2001). Die Aktivierung durch KIR2DL4 ist sensitiv gegenüber Inhibition durch ITIM enthaltende Rezeptoren wie CD94/NKG2A und

konventionelle KIR2DL, sowie durch KIR-Mutanten, die nur ein ITIM besitzen. Daher ist anzunehmen, daß KIR2DL4 auch sensitiv gegenüber dem eigenen ITIM reagiert (Faure and Long 2002, Rajagopalan *et al.* 2001). Die normale Funktion des ITIM in KIR2DL4 ist noch nicht bekannt. Der zytoplasmatische Anteil von KIR2DL4 hat inhibitorische Wirkung. Tyrosinphosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne erlaubt die Bindung von SHP-1 und -2 und die Weitergabe eines inhibitorischen Signals (Faure und Long 2002, Yusa *et al.* 2002). Von KIR2DL4 wurde auch ein Allel mit verkürztem zytoplasmatischen Anteil ohne ITIM gefunden (Witt *et al.* 2002). Dieses Allel könnte die variable Auswirkung der KIR2DL4-Interaktion auf den Aktivierungsstatus von NK-Zellen mit beeinflussen.

ILT-Rezeptoren

Eine zweite Gruppe von NK-Rezeptoren ist Mitglied der Ig-Familie. Diese Glykoproteine besitzen zwei oder vier C-2-Typ Ig-ähnliche Domänen. Sie weisen auf Proteinebene 31-39 % Homologie mit KIR auf. Sie werden als ILT (immunoglobulin-like transcripts), LIR (leukocyte Ig-like receptors, leukocyte inhibitory receptors) oder MIR (monocyte/macrophage Ig-like receptors, monocyte/macrophage inhibitory receptors) bezeichnet. Ihre Expression ist nicht auf NK-Zellen beschränkt. Man findet sie vor allem auf Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Zellen (Borges *et al.* 1997, Colonna *et al.* 1997, Cosman *et al.* 1997, Samaridis und Colonna 1997, Torkar *et al.* 1998, Wagtmann *et al.* 1997). Sie sind wie die KIR ebenfalls auf Chromosom 19 (19q13.4) lokalisiert (Torkar *et al.* 1998, Wagtmann *et al.* 1997, Wilson *et al.* 2000).

Wie die KIR besitzt ein Teil der ILT-Rezeptoren zytoplasmatische ITIM und vermittelt Inhibition der Zellaktivierung durch Rekrutierung von SHP-1 (Borges *et al.* 1997, Cella *et al.* 1997, Colonna *et al.* 1997, Cosman *et al.* 1997, Dietrich *et al.* 2001, Fanger *et al.* 1998, Samaridis und Colonna 1997). Von den näher charakterisierten ILT-Rezeptoren erkennen zwei, ILT2 (LIR1, MIR7, CD85j) und ILT4 (LIR2, MIR10, CD85d), auch HLA-G (Abb. 1.4, Tab. 1.1). Diese Rezeptoren binden an eine Auswahl von HLA-A-, -B- und -C-Allelen sowie die Klasse-Ib-Antigene HLA-G, HLA-E und HLA-F (Allan *et al.* 1999, Colonna *et al.* 1997 und 1998, Cosman *et al.* 1997, Fanger *et al.* 1998, Lepin *et al.* 2000, Navarro *et al.* 1999, Vitale *et al.* 1999). Trotz der Reaktivität mit einem breiten Spektrum von HLA-A- und -B-Allelen und HLA-G reagiert ILT2 aber nicht funktionell mit HLA-C- oder HLA-E-Antigenen (Colonna *et al.* 1997, Navarro *et al.* 1999). Außerdem bindet ILT2 mit sehr hoher Affinität an gpUL18, ein MHC-I-Homolog des HCMV (humanes Cytomegalovirus) (Cosman *et al.* 1997, Vitale *et al.* 1999). ILT2 besitzt vier extrazelluläre Ig-Domänen und einen zytoplasmatischen Anteil mit 4 ITIM, an die SHP-1 binden kann (Samaridis und Colonna 1997). ILT2 kann auf den meisten oder allen B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen und einer Gruppe von NK-Zellen, $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Borges *et al.* 1997, Colonna *et al.* 1997, Cosman *et al.* 1997, Fanger *et al.* 1998, Vitale *et al.* 1999, Young *et al.* 2001). ILT4 besitzt wie ILT2 vier Ig-Domänen, jedoch nur drei ITIM im zytoplasmatischen Anteil. Außerdem wird ILT4 selektiv auf Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen, aber nicht auf B-Zellen, T-Zellen oder NK-Zellen exprimiert (Allan *et al.* 1999, Borges *et al.* 1997, Colonna *et al.* 1997 und 1998, Fanger *et al.* 1998, Tedla *et al.* 2002). ILT2 wird zudem auf einer Population von NK-Zellen und ILT2 und ILT4 auf Makrophagen aus der Decidua

exprimiert (Petroff *et al.* 2002, Ponte *et al.* 1999, Pröll *et al.* 2000). Die Interaktion von ILT2 und ILT4 mit HLA-G könnte zur Immuntoleranz der Mutter gegen den Fötus beitragen. Die selektive Expression von HLA-G auf Trophoblasten, die keine HLA-A- und -B-Antigene exprimieren, könnte über die Interaktion mit ILT2 und ILT4 die Lyse durch deciduale NK-Zellen bzw. die Ak-vermittelte Erkennung durch Monozyten inhibieren. ILT2 und ILT4 rekrutieren die SHP-1 Proteintyrosinphosphatase und vermitteln ein negatives Signal, das frühe Signalereignisse inhibiert (Bellón *et al.* 2002, Colonna *et al.* 1998, Nikolova *et al.* 2002). So wird in T-Zellen durch ILT2 die zytotoxische Aktivität, die Proliferation und die Zytokinsekretion beeinflusst (Saverino *et al.* 2000 und 2002). Erkennung von HLA-I-Molekülen durch ILT2 reduziert auch die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität, und in B-Zellen und Makrophagen wird die Rezeptor-induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung beeinflusst. Außerdem kann über ILT2 oder ILT4 die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen durch Monozyten herunterreguliert werden (Bellón *et al.* 2002, Colonna *et al.* 1997, 1998 und 1999, Fanger *et al.* 1998).

1.2.1.2 Rezeptoren der C-Typ Lektin-Superfamilie: CD94/NKG2

Die zweite Gruppe inhibitorischer Rezeptoren wird durch Gene kodiert, die auf Chromosom 12 (12p12-p13) liegen. Sie werden auf NK-Zellen und einer Gruppe von zytotoxischen T-Zellen exprimiert (Aramburu *et al.* 1991). Diese Gruppe von Rezeptoren umfaßt Heterodimere aus dem Typ II Transmembranprotein CD94 und einem Molekül der NKG2-Familie. CD94 besitzt eine extrazelluläre lektinähnliche Domäne, die an Klasse-I-Moleküle binden kann, aber keine zytoplasmatische Domäne zur Signalübertragung. Es ist kovalent mit einem Molekül der NKG2-Familie assoziiert, das ebenfalls eine lektinähnliche Domäne enthält und als Signalüberträger dient (Lazetic *et al.* 1996). Je nachdem mit welchem Mitglied der NKG2-Familie CD94 assoziiert ist, wirkt der Komplex inhibierend oder aktivierend: NKG2A und NKG2B haben zwei ITIM-Motive in ihrer zytoplasmatischen Domäne und übertragen inhibitorische Signale über Kopplung an SHP Tyrosinphosphatasen (Brooks *et al.* 1997, Carretero *et al.* 1998, Le Drean *et al.* 1998). Im Gegensatz dazu wirken NKG2C und NKG2E aktivierend (Bellón *et al.* 1999, Cantoni *et al.* 1998 b, Houchins *et al.* 1997). Der spezifische Ligand für CD94/NKG2A und CD94/NKG2C ist HLA-E (Borrego *et al.* 1998, Braud *et al.* 1998 a, Brooks *et al.* 1999). Dabei dienen nonamere Peptide, die aus den Signalsequenzen von anderen HLA-I-schweren Ketten stammen, als Ligand für HLA-E. Nicht alle HLA-I-Allele, so auch nicht HLA-E selbst, liefern einen passenden Liganden für HLA-E (Borrego *et al.* 1998, Braud *et al.* 1997 und 1998 b, Lee *et al.* 1998 a). Aber HLA-G besitzt ein solches Signalpeptid, das an HLA-E binden kann (Pende *et al.* 1997, Perez-Villar *et al.* 1997). Peptide, die anstelle des Methionin an Position 2 (Position 4 des Signalpeptids) Threonin besitzen, stabilisieren die HLA-E-Expression nicht effizient. HLA-E-Antigene, die das von HLA-G stammende Peptid gebunden haben, binden mit hoher Affinität an CD94/NKG2 (Valés-Gómez *et al.* 1999). Während mit den meisten Signalpeptiden beladene HLA-E Moleküle von CD94/NKG2A⁺ Zellen besser als von CD94/NKG2C⁺ Zellen erkannt werden, werden HLA-G-Peptid präsentierende HLA-E Antigene von CD94/NKG2C und NKG2A exprimierenden Klonen gut erkannt (Llano *et al.* 1998, Valés-Gómez *et al.* 1999). Über den zur Verfügung gestellten Liganden verändert HLA-G die Affinität von HLA-E zu den aktivierenden und inhibitorischen CD94/NKG2-Komplexen und kann so indirekt Effektor-

funktionen von CD94/NKG2 exprimierenden Zellen beeinflussen (Pende *et al.* 1997, Perez-Villar *et al.* 1997, Söderström *et al.* 1997).

Die Transfektion von Zielzellen, wie z.B. der HLA-Ia-defizienten 721.221, mit verschiedenen Klasse-I-Allelen (A-, B- und C-Allele und HLA-G) inhibiert ihre Lyse durch CD94/NKG2A⁺ Effektorzellen. Diese Inhibition ist abhängig von der Fähigkeit der Signalpeptide aus diesen Klasse-I-Allelen, die HLA-E-Zelloberflächenexpression zu stabilisieren (Lee *et al.* 1998 b). Durch die spezifische Interaktion des CD94/NKG2-Komplexes mit HLA-E kann anhand der an HLA-E gebundenen Signalpeptide die Expression der HLA-I-Moleküle kontrolliert werden, die bei Virusinfektionen oder Entartung von Zellen häufig reduziert ist.

1.2.2 Funktionen von HLA-G

Die Bedeutung der HLA-G-Expression für eine Aufrechterhaltung der Schwangerschaft zeigt sich in der Korrelation einer verminderten HLA-G-Expression im extravillösen Trophoblasten mit Präeklampsie (Colbern *et al.* 1994, Goldmann-Wohl *et al.* 2000, Hara *et al.* 1996). Präeklampsie ist ein Schwangerschafts-spezifisches Syndrom, das in später Schwangerschaft auftritt und mit Bluthochdruck, Proteinuria und Ödemen einhergeht. Auch sind die Anzahl der invasiven Trophoblasten und die Invasion reduziert (Redman 1991). Ein weiteres Indiz für den Beitrag der HLA-G-Expression zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft ist die Assoziation von einigen HLA-G-Allelen mit Fehlgeburten (Aldrich *et al.* 2001, Pfeiffer *et al.* 2001). Der HLA-G Genotyp beeinflusst die Serumkonzentration von löslichem HLA-G (Rebmann *et al.* 2001). Nach in-vitro-Fertilisation haben Patientinnen mit verringerter HLA-G5-Konzentration im peripheren Blut ein höheres Risiko für spontane Aborte als Patientinnen mit einem hohen Expressionsniveau (Pfeiffer *et al.* 2000). HLA-G trägt also zur Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber dem Fötus bei.

HLA-G exprimierende Zellen können mit so verschiedenen Zellen des Immunsystems wie NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und Monozyten/Makrophagen über HLA-G in Wechselwirkung treten. Die Decidua enthält eine große Anzahl an CD56⁺ NK-Zellen und Makrophagen, aber nur wenige CD8⁺, CD4⁺ αβ TCR⁺ T-Zellen und γδ TCR⁺ T-Zellen (Pröll *et al.* 2000).

Eine charakteristische Eigenschaft von HLA-Ia-Molekülen ist die Bindung und Präsentation von Peptiden. Membrangebundene und lösliche Volle-Länge-HLA-G-Isoformen sind in der Lage, nonamere Peptide zu binden. Diese stammen von intrazellulären Proteinen unterschiedlicher Funktion und Lokalisation in der Zelle wie z.B. aus Histonen oder ribosomalen Proteinen. Die Komplexität der gebundenen Peptide ist etwas geringer als bei HLA-A und -B. Bevorzugt werden Peptide einer Länge von 9 Aminosäuren. Die Peptide besitzen das Sequenzmotiv XI/LPXXXXXL (X eine beliebige As) mit Ankerresten an Position 2 (Ile oder Leu), Position 3 (Pro) und der C-terminalen Position 9 (Leu). Für die Spezifität der von HLA-G gebundenen Peptide scheinen besonders Leu am C-Terminus und Pro oder eine andere kleine hydrophobe Aminosäure in Position 3 eine Rolle zu spielen (Diehl *et al.* 1996, Ishitani *et al.* 2003, Lee *et al.* 1995, Münz *et al.* 1999). HLA-G exprimierende Zellen können

mit CD8⁺ T-Zellen in Interaktion treten. CD8 bindet vorwiegend über die $\alpha 3$ -Domäne an MHC-I-Moleküle (Gao *et al.* 1997). Die an der Interaktion mit dem TCR beteiligten Aminosäuren sind bei HLA-G konserviert (Bjorkman *et al.* 1987 a). Außerdem bindet CD8 an HLA-G mit einer Affinität, die derjenigen von CD8 zu den klassischen HLA-I-Antigenen entspricht (Gao *et al.* 2000, Sanders *et al.* 1991). Dies weist auf die Fähigkeit zur Peptidpräsentation gegenüber TCR auf CD8⁺ T-Zellen hin, so daß HLA-G gegen plazentale oder periphere Infektionen schützen kann. Humane HLA-G-spezifische T-Zellen sind bisher noch nicht nachgewiesen worden, aber HLA-G hat die Fähigkeit, in der Maus als Restriktionselement für CD8⁺ CTL zu wirken (Horuzsko *et al.* 1997, Lenfant *et al.* 2003, Schmidt *et al.* 1997). HLA-G ist in Thymusepithelzellen aus der Medulla exprimiert, was für eine T-Zell-Restriktion spricht (Crisa *et al.* 1997, Mallet *et al.* 1999 a und b). HLA-G könnte eine antivirale Funktion ausüben. Der Fötus ist trotz viraler Infektionen während der Schwangerschaft die meiste Zeit über vor Ausbreitung der Viren geschützt. Die Peptidpräsentation durch HLA-G könnte es erlauben, viral infizierte oder entartete Zellen in der Plazenta zu erkennen (Lenfant *et al.* 2003).

Natürliche Killerzellen machen 10 %-15 % der PBL von gesunden Individuen aus und befinden sich in peripheren Geweben, inklusive Milz, Leber, Bauchhöhle und Plazenta. NK-Zellen sind im allgemeinen CD3⁻/TCR⁻ sowie CD4⁻ und CD8⁻ und exprimieren CD56, auf der Oberfläche. Die Mehrzahl der NK-Zellen aus dem peripheren Blut exprimieren wenig CD56, dafür aber viel CD16-Antigen (CD56^{dim}/CD16^{bright}). CD16 (Fc γ RIIIA) ist ein niederaffiner Rezeptor für die Fc-Region von IgG. Ak-beladene Zielzellen werden von NK-Zellen durch Bindung von CD16 an den Fc-Teil der Immunglobuline gebunden und können lysiert werden (ADCC, antibody dependent cell mediated cytotoxicity) (Lanier *et al.* 1988). Etwa 10 % der NK-Zellen aus dem peripheren Blut exprimieren sehr viel CD56 (CD56^{bright}) und entweder kein CD16-Antigen (CD16⁻) oder nur wenig (CD16^{dim}). Sie tragen den hochaffinen IL-2R, aber kaum KIR und sekretieren sowohl Typ 1 als auch Typ 2 Zytokine (Moffet-King *et al.* 2002, Verma *et al.* 1997). Da diese Zellen ein hohes proliferatives Potential besitzen, kaum zytoplasmatische Granula enthalten und nur schwache zytolytische Aktivität zeigen, sind sie vermutlich unreife Vorläuferzellen (Carson *et al.* 1997, Nagler *et al.* 1989, Vivier *et al.* 1993). Von den CD56^{bright} NK-Zellen aus dem Blut stammen wahrscheinlich die CD56^{bright} Gewebe-NK-Zellen ab, die in Lymphknoten, verletzten Gelenken, der Nasenschleimhaut und im Uterus vorkommen (Moffet-King *et al.* 2002). Im Gegensatz zu den CD56^{bright} NK-Zellen aus dem Blut weist die Mehrheit der NK-Zellen aus dem Uterus die typischen morphologischen Charakteristika großer granulärer Lymphozyten (LGL = large granular lymphocytes: große Lymphozyten mit zahlreichen Granula im Zytoplasma) auf (Nagler *et al.* 1989). Diese LGL machen über 80 % der Lymphozyten der Decidua aus und treten mit den Trophoblasten des Fötus in Kontakt (King *et al.* 1998, Pröll *et al.* 2000). Da die MHC-I-Expression sehr gering ist, stellt die Plazenta ein potentielles Ziel für NK-Zellen dar. Normalerweise wird die Lyse von Zellen durch NK-Zellen dadurch verhindert, daß ihre Klasse-I-Moleküle mit inhibitorischen Rezeptoren, die spezifisch für MHC-I-Allotypen sind, in Wechselwirkung treten (siehe 1.2.1). NK-Zellen im humanen Uterus exprimieren KIR in einem Repertoire, das sich von dem der NK-Zellen im peripheren Blut unterscheidet. Der Anteil von NK-Zellen, die Rezeptoren für HLA-C-Allele exprimieren, ist gegenüber dem Blut erhöht. NK-Zellen aus der Decidua sind CD94⁺ (Verma *et al.* 1997). Entsprechend der Anteile von decidualen NK-

Zellen, die CD94/NKG2A und KIR2DL4 exprimieren, scheint CD94/NKG2A zu Beginn der Schwangerschaft und KIR2DL4 bei fortgeschrittener Schwangerschaft wichtiger zu sein (Ponte *et al.* 1999). Während der Schwangerschaft wird die KIR-Expression auf peripheren Lymphozyten hochreguliert, was sich bei T-Zellen in einem höheren Prozentsatz an KIR⁺ (p58.2, CD94/NKG2A, ILT2) Zellen und bei T- und NK-Zellen in der Expressionsstärke zeigt. Die meisten NK-Zellen aus der maternalen Decidua exprimieren CD94/NKG2A und ILT2. Die Expression von KIR2DL4 könnte von besonderer Bedeutung sein, da dieser Rezeptor von allen NK-Zellen in der Decidua exprimiert wird (Ponte *et al.* 1999). Allerdings wurde auch ein Fall einer Frau mit mehreren erfolgreichen Schwangerschaften beschrieben, die kein KIR2DL4-Gen besitzt (Gómez-Lozano *et al.* 2003). Außerdem kann die HLA-G-Expression in extravillösen Trophoblasten wie unter 1.2.1.2 beschrieben über sein Signalpeptid die HLA-E-Expression und damit die Erkennung durch CD94/NKG2-Komplexe modulieren. HLA-G trägt zum Schutz des Fötus vor Angriff des maternalen Immunsystems bei, indem die NK-vermittelte Lyse inhibiert wird. Da Trophoblasten HLA-C exprimieren, kann ein Teil des Schutzes auch über die Rezeptoren p58.1 und p58.2 erfolgen, die spezifisch für HLA-C sind (Verma *et al.* 1997).

HLA-G kann nicht nur auf NK, sondern über Interaktion mit ILT2 und KIR2DL4 auch auf die CTL-Zytotoxizität modulierend einwirken. HLA-G1 inhibiert Antigen-spezifische CTL-Antworten (Le Gal *et al.* 1999, Rouas-Freiss *et al.* 1999). Aus der Plazenta aufgereinigtes HLA-G hat einen konzentrationsabhängigen Effekt. Hohe HLA-G-Konzentrationen unterdrücken die zytotoxische Allo-T-Zellantwort, während geringe Konzentrationen die Alloantwort erhöhen (Kapasi *et al.* 2000). Das lösliche HLA-G5 beeinflusst die Alloantwort von CTL möglicherweise durch Veränderung der Sekretion von Zytokinen von einer Th1- zu einer Th2-Antwort (Kapasi *et al.* 2000).

Für einen günstigen Verlauf von Schwangerschaften werden Th2-Zytokine (z.B. IL-4 und IL-10) als positiv und Th1-Zytokine (IL-2, IFN- γ) eher als schädlich angesehen. Tatsächlich wurde bei Schwangeren gegenüber nicht schwangeren Frauen eine Abnahme von IFN- γ und IL-2 exprimierenden Zellen festgestellt (Veenstra van Nieuwenhoven *et al.* 2002). Bei Patientinnen mit mehrfachen Aborten ist die Sekretion von Th1-Zytokinen erhöht (Hamai *et al.* 1998, Raghupathy 1997). Die Interaktion von HLA-G exprimierenden Zellen mit Rezeptoren wie ILT2 und ILT4 kann die Zytokinsekretion beeinflussen. HLA-G1 induziert durch Hochregulation von IL-4, IL-3, IL-1 β und IL-10 und Herunterregulation von IFN- γ und TNF- α eine Verschiebung in Richtung Th2-Zytokine (Kanai *et al.* 2001, Kapasi *et al.* 2000, Maejima *et al.* 1997). IL-10 wiederum inhibiert die allo-spezifische Zytotoxizität (Groux *et al.* 1998). Außerdem reguliert es die HLA-G-Expression auf Trophoblasten und peripheren Blutmonozyten hoch (Moreau *et al.* 1999). Zu den in der maternalen Decidua vertretenen lymphoiden Zelltypen gehören neben NK-Zellen und T-Zellen auch Makrophagen. Diese machen während der Schwangerschaft 18 %-25 % der deciduellen Leukozyten aus. Deciduelle Makrophagen aus dem 1. Trimester exprimieren ILT2 und ILT4 (Petroff *et al.* 2002). Durch ILT2 oder ILT4 kann die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen von Monozyten herunterreguliert werden (Colonna *et al.* 1999).

Die Interaktion von HLA-I-Antigenen mit CD8 kann unabhängig vom TCR erfolgen. So wie schon für lösliche HLA-Ia-Moleküle gezeigt, hat sezerniertes HLA-G die Fähigkeit, Apoptose in aktivierten CD8⁺ T-Zellen zu induzieren (Contini *et al.* 2000 und 2003, Solier *et al.* 2002, Zavazava und Krönke 1996). Die durch HLA-G5 ausgelöste Apoptose ist zwar nicht vom TCR, aber von der Interaktion mit CD8 abhängig und wird durch den CD95/CD95-Ligand Pathway vermittelt (Fournel *et al.* 2000). Dies könnte erklären, warum in Abwesenheit von Infektionen nur sehr wenige CD8⁺ T-Zellen in der Decidua nachweisbar sind (Pröll *et al.* 2000). Sezerniertes HLA-G könnte auf diesem Weg zu der Elimination von potentiell schädlichen mütterlichen CTL in der Schwangerschaft beitragen. Für NK-Zellen gibt es ebenfalls Hinweise, daß sie bei Kontakt mit HLA-G exprimierenden Trophoblasten in Apoptose gehen. Es treten Veränderungen in der Morphologie von CD56⁺ Zellen auf, die einem Übergang vom Aktivierungsstatus zu einem Zustand der Apoptose entsprechen (Emmer *et al.* 2002). Auch menschliche NK-Zellen können CD8 α -Homodimere exprimieren. In Abhängigkeit von der CD8-Expressionsdichte auf NK-Zellen kann lösliches HLA-G über den Fas/FasL Pathway die Apoptose auslösen. Diese durch lösliche MHC-I-Antigene vermittelte Apoptose kann durch KIR und CD94/NKG2 inhibiert werden (Spaggiari *et al.* 2002).

Sowohl für HLA-G1 als auch für HLA-G5 wurde gezeigt, daß sie die allogene proliferative T-Zellantwort unterdrücken (Lila *et al.* 2001, Riteau *et al.* 1999). Der Effekt auf CD4⁺ Zellen blieb auch in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen bestehen (Bainbridge *et al.* 2000 a). Er wird wahrscheinlich über ILT2 vermittelt, da Crosslinking von ILT2 die proliferative Antwort von CD4⁺ T-Zellen inhibiert.

Die beschränkte Gewebeverteilung und die Expression löslicher und verkürzter Isoformen legen die Vermutung nahe, daß HLA-G abgesehen von der Antigenpräsentation noch andere, nicht immunologische Funktionen haben könnte. HLA-G inhibiert die „rollende“ Adhäsion und die transendotheliale Migration von NK-Zellen (Dorling *et al.* 2000 a und b, Forte *et al.* 2001). Falls NK-Zellen für die Plazentation und Trophoblasteninvasion wichtig sind, könnte HLA-G so das Verbleiben der Zellen an Orten, wo sie benötigt werden, verlängern. HLA-G könnte auch die Festsetzung der Blastocyste an das maternale Gewebe fördern. Die Expression von HLA-G5 durch frühe Embryonen, nachgewiesen im Zellkulturüberstand, ist eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Implantation des Embryos (Fuzzi *et al.* 2002). Außerdem ist ein Einfluß von HLA-G auf die Invasivität der Trophoblasten möglich, da diese mit der HLA-G-Expression korreliert. In Präeklampsie ist die Expression von HLA-G in Trophoblasten reduziert, aber es treten Cluster von HLA-G⁺ Zellen auf, die in die Decidua eingewandert sind (Goldmann-Wohl *et al.* 2000). Das lösliche HLA-G könnte während der Plazentation einen angiogenetischen Effekt haben. HLA-G ist auf fötalen Endothelzellen in den Chorionvilli exprimiert (Blaschitz *et al.* 1997). Da die HLA-G-Expression in Präeklampsie verschwindet, könnte sie etwas mit der Vaskularisierung zu tun haben.

2 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Aufklärung der Funktion ausgewählter Isoformen von HLA-G ohne Beteiligung anderer MHC-Antigene der Klasse I.

Die Aufgabenstellung beinhaltete die Etablierung von Transfektanten der HLA-G-Isoformen HLA-G1, HLA-G2, HLA-G4 und HLA-G5 in der HLA-Klasse-I-negativen Zelllinie K-562. Die Transfektanten sollten bezüglich ihrer HLA-G-Expression auf mRNA- und Proteinebene charakterisiert werden. Da die veröffentlichten Daten über die Zelloberflächenexpression der verkürzten HLA-G-Isoformen kontrovers sind, sollte ein besonderes Augenmerk auf die Prozessierung und Zelloberflächenexpression der verschiedenen HLA-G-Varianten gelegt werden. Außerdem sollten die Transfektanten hinsichtlich ihrer funktionellen Expression von HLA-G untersucht werden. Als Kontrollen wurden HLA-E- bzw. HLA-B27-positive Transfektanten analysiert.

Da für zahlreiche Tumoren eine Induktion der HLA-G-Expression beschrieben wurde, sollte untersucht werden, ob HLA-G1 in β 2m-defizienten Zellen die Immunerkennung beeinflusst. Dazu wurde die β 2m-negative Zelllinie Daudi ausgewählt, die nicht nur von LAK-Zellen, sondern auch von $\gamma\delta$ T-Zellen des peripheren Bluts lysiert wird.

3 Material

3.1 Abkürzungen

(m)Ak	(monoklonaler) Antikörper
ABTS	2,2'-Azino-di[3-ethyl-benzthiazolinsulfonat(6)]
Amp	Ampicillin
As	Aminosäure
AS	Antiserum
ATCC	American Type Culture Collection
β-ME	β-Mercaptoethanol
β2m	β2-Mikroglobulin
BATDA	bis (acetoxymethyl) 2,2':6',2"-terpyridine-6,6"-dicarboxylate
Bis	N, N'-Methylen-Bis-Acrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
CD	"cluster of differentiation antigens"
CDP-STAR™	Disodium 2-chloro-5-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-yl)phenyl phosphate
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
dd	Didesoxy-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTAF	Dichlorotriazinyl-Aminofluoreszein
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
DC	Dendritische Zellen (dendritic cells)
DTT	Dithiothreitol
ECACC	European Collection of Cell Cultures
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellscanner (Durchflußzytometer)
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HEPES	2,4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl-Ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	Meerrettichperoxidase
hu	human
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILT	"Ig-like transcript"
IPP	Isopentenyl-Pyrophosphat
IPTG	Isopropylthio-β-D-Galactosid
ITAM	"immunoreceptor tyrosine-based activation motif"

ITIM	"immune receptor tyrosine-based inhibition motif"
Kana	Kanamycin
KIR	"killer inhibitory receptor"
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
min	Minuten
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
NK	natürliche Killer
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	periphere Blut-Lymphozyten
PBS	Phosphat-Saline-Puffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	R-Phycoerithrin
PEG	Polyethylenglycol
PerCP	Peridinin Chlorophyll-a Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNAse A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	reverse Transkription mit nachfolgender PCR
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
TAP	"transporter associated with antigen processing"
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TC	Tri-Color
TCR	T-Zellrezeptor
TDA	2,2':6',2"-terpyridine-6,6"-dicarboxylic acid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
UT	untranslatierter Bereich
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
24M-Platte	24-Loch-Mikrotiterplatte
96rM-Platte	96-Loch-Rundboden-Mikrotiterplatte
96fM-Platte	96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte

3.2 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien und Enzyme wurden vom jeweils preisgünstigsten Anbieter bezogen. Bei Bevorzugung eines bestimmten Herstellers ist dies im Text angegeben.

3.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Wasser aus einer Seralpur Ap 30 Anlage (USF, Ransbach-Baumbach) (H₂O) angesetzt und anschließend autoklaviert oder aus autoklavierten Stocklösungen hergestellt. Für Laufpuffer und Waschpuffer für die Immundetektion wurde demineralisiertes, autoklaviertes Wasser verwendet.

3.4 Antikörper und sekundäre Reagentien

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp/ Spezies	Bezug/ (Referenz)
HLA-Klasse-I- und huβ2m-spezifische Antikörper			
4H84	denaturierte HLA-G α-Kette	IgG1 Maus	M. McMaster, San Francisco, CA, USA (Crisa <i>et al.</i> 1997)
16G1	lösliches HLA-G	IgG2a	D. Geraghty, Seattle, Washington, USA (Lee <i>et al.</i> 1995)
87G	HLA-G	IgG2b Maus	D. Geraghty, Seattle, Washington, USA (Hara <i>et al.</i> 1996)
A1.4	HLA-Klasse-I α-Ketten (auch denaturiert), kein HLA-G	IgG2b Maus	Antigenix America Inc., NY, USA (Bushkin <i>et al.</i> 1986)
Ab704	HLA-G	Antiserum Kaninchen	V. Rebmann, Essen, Deutschland
BFL.1	HLA-G	IgG2b Maus	P. Le Bouteiller, Toulouse, Frankreich (Bensussan <i>et al.</i> 1995)
HC10	denaturierte HLA-B und HLA-C α-Ketten	IgG2a Maus	H. Ploegh, Boston, MA, USA (Stam <i>et al.</i> 1986)
HCA2	HLA-Klasse-I α-Kette (auch denaturiert)	IgG1 Maus	A. Ziegler, Berlin, Deutschland (Stam <i>et al.</i> 1990)
Kaninchen-AS	HLA-G	Antiserum Kaninchen	S. Maier, München, Deutschland
MEM-G/1	denaturierte HLA-G α-Kette	IgG1 Maus	V. Horejsi, Prag, Tschechoslowakei (Boyson <i>et al.</i> 2002, Menier <i>et al.</i> 2003)
MEM-G/9	natives HLA-G	IgG1 Maus	V. Horejsi, Prag, Tschechoslowakei (Menier <i>et al.</i> 2003)
W6/32	HLA-Klasse-I α-Ketten + β2m	IgG2a Maus	ATCC HB95 (Barnstable <i>et al.</i> 1978, Parham <i>et al.</i> 1979)
BBM.1	huβ2m	IgG2b Maus	ATCC HB28 (Brodsky <i>et al.</i> 1979)
NK-Rezeptor-spezifische Antikörper			
CD94-FITC	CD94 (Klon HP-3D9) FITC markiert	IgG1 Maus	BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland
HP-3B1	CD94	IgG2a Maus	Immunotech, Marseille, Frankreich
VMP55	ILT2	IgG1 Maus	DAKO, Hamburg, Deutschland (Pulford <i>et al.</i> 1991)

Bezeichnung	Spezifität	Isotyp/ Spezies	Bezug/ (Referenz)
Antikörper gegen T- und NK-Zellantigene			
CD3-Biotin	CD3 (Klon SK7) biotinyliert	IgG1 Maus	BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland
CD4-PE	CD4 PE markiert	IgG Maus	Coulter-Immunotech, Marseille, Frankreich C. Falk, GSF; München, Deutschland
CD56	CD56 (Klon C218)	IgG1 Maus	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD8-PE	CD8 PE markiert	IgG Maus	Coulter-Immunotech, Marseille, Frankreich C. Falk, GSF, München, Deutschland
CD8-TC	CD8 TC markiert	IgG2a Maus	Caltag, Hamburg, Deutschland
V δ 2	V δ 2 (Klon B6.1)	IgG1 Maus	BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland
V δ 2-FITC	V δ 2 (Klon B6.1) FITC markiert	IgG1 Maus	BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland
TAP-spezifischer Antikörper			
148.3	huTAP1	Maus	R. Tampé; Marburg, Deutschland (Meyer <i>et al.</i> 1994)
Isotypkontrollen			
MOPC 141	Isotypkontrolle	IgG2b Maus	Robinson, London, Great Britain Sigma, Deisenhofen, Deutschland
MOPC 21	Isotypkontrolle	IgG1 Maus	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
UPC10/RPC5	Isotypkontrolle	IgG2a Maus	ICN, Biomedicals Inc., Eschwege, Deutschland

Cy2-gekoppelter, sekundärer Antikörper für FACS

Ziege anti-Maus IgG, F(ab')₂-Fragment, Jackson Immunoresearch Laboratories/
Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

DTAF-gekoppelte, sekundäre Antikörper für FACS

Ziege anti-Maus IgG, F(ab')₂-Fragment, Jackson Immunoresearch Laboratories/
Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

Ziege anti-Maus IgG + IgM, F(ab')₂-Fragment, Jackson Immunoresearch Laboratories/
Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

FITC-gekoppelter, sekundärer Antikörper für FACS

Ziege anti-Kaninchen IgG, F(ab')₂-Fragment, Jackson Immunoresearch Laboratories/
Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

PE-gekoppelter, sekundärer Antikörper für FACS

Ziege anti-Maus IgG, F(ab')₂-Fragment, Coulter-Immunotech, Marseille, Frankreich

Streptavidin-PE für FACS

PE markiertes Streptavidin, BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland

Streptavidin-PerCP für FACS

PerCP markiertes Streptavidin, BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland

alkalische Phosphatase-gekoppelter Antikörper für Northernblot

Schaf anti-Digoxigenin, IgG-Fab-Fragment, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim,
Deutschland

alkalische Phosphatase-gekoppelte Antikörper für Westernblot

Ziege anti-Maus IgG + IgM (H+L), Klon WL10MC, Tropix Inc., Bedford, Massachusetts, USA/Serva, Heidelberg, Deutschland

Ziege anti-Kaninchen, Tropix Inc., Bedford, Massachusetts, USA/Serva, Heidelberg, Deutschland

Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Antikörper für ELISA

Kaninchen anti-hu β_2m , DAKO, Glostrup, Dänemark

3.5 Bakterienstämme

Für die Subklonierung wurden die Bakterienstämme E. coli DH5 α und E. coli INF α F' verwendet. Für die Transformation mit pCRTM2.1-Vektoren wurden E. coli INF α F' eingesetzt.

E. coli DH5 α F⁻, ϕ 80 δ /lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻ *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

E. coli INF α F' F['], *endA1*, *recA1*, *hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺), *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, ϕ 80/lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)

3.6 Eukaryontische Zellen und Transfektanten

Als Standardmedium wurde, wenn nicht anders angegeben, RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 1 mM Natriumpyruvat, 50 U/ml Penicillin und 50 μ g/ml Streptomycin versetzt. Falls nicht anders vermerkt, wurde für die Kultivierung von Transfektanten dem Medium 0,4 mg/ml G418, bei den Daudi-Transfektanten 1,2 mg/ml G418 und bei den HeLa-Transfektanten 0,5 mg/ml G418 zugegeben.

Zelllinien

721.221 (.221)	humane lymphoblastoide, EBV transformierte B-Zelllinie (HLA-A-, -B- und -C-negativ, Expression von DPw2, DQw1, DR1, β 2m) (Shimizu und DeMars 1989)
721.45 (.45)	humane B-Zelllinie (HLA-A2, -B5, -Cw1; hemizygot) (DeMars <i>et al.</i> 1983) F. Momburg, DKFZ, Heidelberg
Daudi	humane Burkitt-Lymphomzelllinie (β 2m-negativ, HLA-A1, -A66, -B58, Cw3, Cw6) ATCC CCL 213 (Rosa <i>et al.</i> 1983)
HeLa229	humane Zervixkarzinomzelllinie J. Kuipers, Medizin. Hochschule Hannover, Hannover
HL-60	humane myeloische lymphoide Leukämiezelllinie ATCC CCL 240
LG2 (= JB2)	humane lymphoblastoide B-Zelllinie (HLA-A2, -B27, -Cw1)

JEG-3	humane Chorioncarcinomzelllinie, starke Expression von HLA-G ECACC 92120308, ATCC HTB-36
K-562	humane Erythroleukämiezelllinie (HLA-Klasse-I-negativ) ATCC CCL 243
NKL	humane NK-Zelllinie (CD94/NKG2A ⁺ , ILT2 ⁺) RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS oder humanem AB-Serum, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml huIL-2 (Robertson <i>et al.</i> 1996) M. López-Botet, Servicio de Immunología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spanien
A172, LN-18, LN-229, LN-308, LN-319, U138MG, U87MG, U251MG, U373MG, T98G, LN-428, D247MG	humane Gliomzelllinien als Sedimente erhalten von H. Wiendl, Tübingen, Deutschland
TE671	humane Rhabdomyosarkomzelllinie als Sedimente erhalten von H. Wiendl, Tübingen, Deutschland

Transfektanten

.221 HLA-G1	cDNA von HLA-G1 in pREP7 in RPMI 1640 mit 0,4 mg/ml Hygromycin S. Maier
K-562 HLA-B27	HLA-B27-Gen M. Ulbrecht
K-562 HLA-G2 3'Flag	HLA-G2 mit Flag-Epitop am 3' Ende in pcDNA3 H. Hutter, Karl-Franzens-Universität Graz, Graz, Österreich
K-562 HLA-E ^G sigA2	cDNA von HLA-E ^G (E*01033), bei dem im Exon 1 das Signalpeptid gegen das von HLA-A2 ausgetauscht wurde, im Vektor pcDNA3 (Ulbrecht <i>et al.</i> 2003)
HeLa229 B27Q10	Exone 1-4 von HLA-B*2705 fusioniert mit Exon 5 von Q10 J. Kuipers, Medizin. Hochschule Hannover, Hannover (Kuipers <i>et al.</i> 2001)

primäre Zellen

LAK	humane Lymphokin-aktivierte Killerzellen RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin, 10 % hitzeinaktiviertem huAB-Serum, 1 mM Natriumpyruvat, 1000 U huIL-2/ml z.T. erhalten von C. Falk, GSF, München
PBMC	freiwillige Spender und Blutbank Ulm

3.7 Oligonukleotide

T_A gibt die in der PCR verwendete Annealingtemperatur an.

M13 revers	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	
M13 (-20)	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	$T_A = 52^\circ\text{C}$, 1 mM MgCl_2

Primer für die Herstellung der Expressionskonstrukte und für die RT-PCR

G-5'UT	5'-ACTCATTCTCCCCAGACGC-3'	
Ex6/3'UT	5'-CAGCTGTTTCACATTGCAGCCTG-3'	$T_A = 60^\circ\text{C}$, 1,5 mM MgCl_2

G-Ex1	5'-CAAGGATGGTGGTCATGGCG-3'	
G-Int4-2as	5'-GTAAAGGTCTTCAGAGAGGC-3'	$T_A = 60^\circ\text{C}$, 1,5 mM MgCl_2

HLA-5'UT	5'-GGGCGTCGACGGACTCAGAATCTCCTCAGACGCCGAG-3'	
HLA-3UTB	5'-CCGCAAGCTTCTGGGGAGGAAACACAGGTCAGCATGGGAAC-3'	$T_A = 56^\circ\text{C}$, 1 mM MgCl_2

(Curran *et al.* 1996)

E91s	5'-GGGTCTCACACCCTCCAGAAT-3'	
E136as	5'-CGGCGGTCCAGGAGCT-3'	$T_A = 65^\circ\text{C}$, 1,5 mM MgCl_2

(Dominguez *et al.* 1992)

Primer zur Mutagenese der As 4 der Signalsequenz von HLA-G von Met zu Thr

G-5'UT/Ex1mut	5'-ACTCATTCTCCCCAGACGCCAAGGATGGTGGTCaCGG-3'	
	Die nicht zur Sequenz komplementäre Base ist klein geschrieben.	
Ex6/3'UT	5'-CAGCTGTTTCACATTGCAGCCTG-3'	$T_A = 60^\circ\text{C}$, 1,5 mM MgCl_2

Primer zu Entfernung eines Basenaustausches in klonierter HLA-G5 cDNA

G-Ex1	5'-CAAGGATGGTGGTCATGGCG-3'	
G-Ex4/Int4	5'-GTAAAGGTCTTCAGAGAGGCTCCTGCTTCCCTAACAGACATGATG CCTCCATCTCCCTCCTTACTCCATC-3'	$T_A = 58^\circ\text{C}$, 1,5 mM MgCl_2

Kontrolle der Orientierung der HLA-G5-Insertion in pIRES-EGFP

pIRES-EGFP 1053	5'-TCTTAGCGCAGAAGTCATGC-3'	
G-Ex1	5'-CAAGGATGGTGGTCATGGCG-3'	$T_A = 60^\circ\text{C}$, 1 mM MgCl_2

Amplifikation einer 3'UT-Sonde für HLA-G: HLA-G 3'UT-Sonde

GP5.U	5'-TGAAACAGCTGCCCTG-3'	
GP3.U	5'-CCATCAATCTCTTGGGA-3'	$T_A = 52^\circ\text{C}$, 1,5 mM MgCl_2

(Alizadeh *et al.* 1993)

Amplifikation einer 3'UT-Sonde für HLA-G: HLA-G 3'UT M13-Sonde

M13 revers	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	
M13 (-20)	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	$T_A = 52^\circ\text{C}$, 1 mM MgCl_2

Amplifikation der HLA-G4-Sonde

G-Ex1	5'-CAAGGATGGTGGTCATGGCG-3'	
Ex6/3'UT	5'-CAGCTGTTTCACATTGCAGCCTG-3'	$T_A = 60^\circ\text{C}$, 1,5 mM MgCl_2

Amplifikation der 3'UT-Sonde für HLA-B

SP-6	5'-CATACGATTTAGGTGACACTATAG-3'	
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'	$T_A = 51^\circ\text{C}$, 1,5 mM MgCl_2

3.8 Vektoren und Plasmide

Vektor für die Subklonierung von PCR-Produkten

Für die Subklonierung von PCR-Produkten wurde der Vektor pCRTM2.1 (Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz; Invitrogen, De Schelp, Niederlande) verwendet.

Vektoren für die Expression in humanen Zelllinien

Der Vektor pcDNA3.1 (-) (Ampicillin- und G418-Resistenz; Invitrogen, De Schelp, Niederlande) wurde für die Klonierung von HLA-G1mut, HLA-G4mut, HLA-G5 und HLA-B27 eingesetzt. Der Vektor pIRES2-EGFP (Kanamycin- und G418-Resistenz; Clontech, Palo Alto, USA) wurde für die Klonierung von HLA-G1, HLA-G2 und HLA-G5 verwendet. HLA-G5 wurde außerdem in den Vektor pIRES-EGFP (Ampicillin-Resistenz; Clontech, Palo Alto, USA) einkloniert.

HLA-G-Isoformen in pREP7, pREP10, pCRTMII und pCRTM2.1

Im Labor standen bereits HLA-G-cDNA-Konstrukte in den Vektoren pREP7 und pCRTMII (HLA-G1, HLA-G3, HLA-G4, HLA-G5 und HLA-G6) bzw. pREP10 und pCRTM2.1 (HLA-G2) zur Verfügung.

Herstellung der cDNA-Vektoren für die Transfektion der HLA-G-Isoformen in K-562, Daudi und HeLa229

HLA-G1/pIRES2-EGFP: Im Labor stand ein HLA-G1-Konstrukt im Vektor pcDNA3.1 (Hygro) zur Verfügung, das mit *Nhe* I und *Bam*H I präparativ verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. Die HLA-G1-Bande wurde aus dem Gel isoliert und in den entsprechend geschnittenen pIRES2-EGFP-Vektor umklontiert. Erhaltene Klone wurden mittels PCR (Primer G-5'UT, Ex6/3'UT) und Restriktionsverdau überprüft.

HLA-G1mut/pcDNA3.1 (-): Mit dem Primerpaar G-5'UT/Ex1mut und Ex6/3'UT wurde vom Template HLA-G1 in pCRTMII HLA-G1 amplifiziert und der T zu C Basenaustausch eingeführt, der zum Aminosäureaustausch von Met zu Thr an Position 4 im Signalpeptid führt. Das erhaltene HLA-G1mut-Amplifikat wurde in den Vektor pCRTM2.1 kloniert, über Restriktionsverdau und PCR (Primer M13 (-20) und M13 revers) kontrolliert und sequenziert. Von einem korrekten Klon wurde Plasmid-DNA isoliert, mit

Xho I und *Bam*H I präparativ verdaut und das isolierte Fragment in den entsprechend geschnittenen Expressionsvektor pcDNA3.1 (-) ligiert. Die erhaltenen Klone wurden mittels PCR (Primer G-5'UT und Ex6/3'UT) und Restriktionsverdau überprüft.

HLA-G2/pIRES2-EGFP: HLA-G2 wurde mit *Eco*R I aus dem Vektor pCRTM2.1 ausgeschnitten und in den Vektor pIRES2-EGFP umkloniert. Die Vorgehensweise entsprach der Umklonierung von HLA-G1 in den Vektor pIRES2-EGFP. Auf richtige Orientierung der Insertions wurde mittels Restriktionsverdau getestet.

HLA-G4mut/pcDNA3.1 (-): Ein aus der Vorarbeit erhaltener HLA-G4-Klon im Vektor pCRTMII mit einer Deletion im 5'-Bereich sowie ein HLA-G1mut-Klon in pCRTM2.1 wurden mit *Bss*H II präparativ verdaut. *Bss*H II schneidet am Ende von Exon 3 von HLA-G und im Kanamycingen der Vektoren. Die Restriktionsfragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, isoliert und die Fragmente, die den 5'Teil von HLA-G1mut und 3'Teil von HLA-G4 enthalten, miteinander ligiert. Die erhaltenen Klone wurden über PCR (Primer G-5'UT, Ex6/3'UT) und Restriktionsverdau kontrolliert und sequenziert. Nach einen präparativen Verdau mit den Enzymen *Xho* I und *Bam*H I wurde das HLA-G4mut-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pcDNA3.1 (-) umkloniert. Die erhaltenen Klone wurden mittels PCR (Primer G-5'UT und Ex6/3'UT) und Restriktionsverdau überprüft.

HLA-G5/pIRES-EGFP: Es stand ein HLA-G5-Konstrukt mit einem Fehler am Ende von Exon 4 zur Verfügung. Die HLA-G5 cDNA wurde zur Korrektur des Fehlers mit den Primern G-Ex1 und G-Ex4/Int4 unter Verwendung der Pfu-DNA-Polymerase amplifiziert und in den Vektor pCRTM2.1 ligiert. Erhaltene Klone wurden mittels PCR, Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Die HLA-G5-cDNA wurde mit *Eco*R I ausgeschnitten und in die *Eco*R I-Schnittstelle von pIRES-EGFP einkloniert. Die erhaltenen Klone wurden über PCR (Primer G-Ex1 und G-Int4-2as) und Restriktionsverdau kontrolliert. Zur Überprüfung der korrekten Orientierung der Insertion wurde das Primerpaar pIRES-EGFP 1053 und G-Ex1 eingesetzt.

HLA-G5/pcDNA3.1 (-): Die HLA-G5-cDNA wurde mit den Enzymen *Not* I und *Bst*X I aus dem Vektor pIRES-EGFP ausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen pcDNA3.1 (-) Vektor einkloniert. Die erhaltenen Klone wurden über PCR (Primer G-Ex1 und G-Int4-2as) und Restriktionsverdau kontrolliert.

HLA-G5/pIRES2-EGFP: Mit *Bam*H I und *Xho* I wurde das HLA-G5-Fragment aus pcDNA3.1 in den Vektor pIRES2-EGFP umkloniert. Vor Einsatz in die Transfektion wurden die Klone mittels PCR (Primer G-Ex1 und G-Int4-2as) und Restriktionsverdau kontrolliert.

HLA-B27/pcDNA3.1 (-): HLA-B27 wurde mit den Enzymen *Bam*H I und *Xho* I aus dem Vektor pCRTM2.1 ausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pcDNA3.1- (G418) umkloniert. Die Vorgehensweise entsprach der Umklonierung von HLA-G1 in den Vektor pIRES2-EGFP. Die erhaltenen Klone wurden über PCR (HLA-5'UT und HLA-3UTB) und Restriktionsverdau auf Insertion eines richtigen Fragmentes überprüft.

3.9 Sonden

Sonden für HLA-G

Sonde für die Überprüfung der HLA-G-Transfektanten:

Amplifikation der HLA-G4-cDNA aus dem HLA-G4-cDNA-Konstrukt mit den Primern G-Ex1 und Ex6/3'UT.

HLA-G-spezifische 3'UT-Sonden:

Amplifikation des 3'UT Bereich von HLA-G (5,4 kb *Hind* III-Fragment von HLA-GH in pBlueskript KS) mit dem Primerpaar GP5.U und GP3.U ergibt ein 287 bp großes Amplifikat, das als Sonde eingesetzt wurde (HLA-G 3'UT-Sonde). Um eine bessere Markierung der HLA-G 3'UT Sonde zu erhalten wurde das 287 bp große Amplifikat in den Vektor pCRTM2.1 umkloniert. Die Sequenz wurde durch Kontrollverdau und Sequenzierung überprüft. Zur Sondenherstellung wurden die Primer M13 (-20) und M13 revers verwendet (HLA-G 3'UT M13 Sonde). Das Amplifikat besitzt eine Länge von 486 bp.

spezifische Sonde für HLA-B

Die Markierung erfolgte mittels PCR mit T7- und SP6-Primer und einem Plasmid, das ein 440 bp *Pvu* II/*Pst* I-Fragment der HLA-B8 cDNA (3'UT) in pSPT19 enthält.

3.10 Peptide und Proteine

Der Peptid-Ligand für HLA-G aus dem Histonprotein 2A (As 77-85: RIIPRHLQL, Diehl *et al.* 1996, Lee *et al.* 1995) wurde von Dr Eulitz (GSF, München) synthetisiert und in einer Konzentration von 20 mM in DMSO gelöst.

Gereinigtes humanes β 2m (hu β 2m) wurde von Serological Reagents Ltd. (East Grinstead, UK) bezogen.

4 Methoden

4.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.1.1 Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren

Phenolextraktion

Um organische Verunreinigungen, die bei weiteren enzymatischen Reaktionen von DNA stören können, aus wässrigen Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurden diese mit dem gleichen Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25/24/1) gründlich gemischt. Nach Zentrifugation bleiben die durch das Phenol denaturierten Proteine in der unteren organischen Phase oder bilden eine Interphase. Die obere wässrige Phase mit den Nukleinsäuren wurde zur Entfernung von Phenolresten einer Chloroformextraktion unterzogen. Danach folgte die Präzipitation der Nukleinsäuren.

Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurelösung wurde mit NaCl (Endkonzentration 200 mM) oder 1/10 Volumen Na-Acetat (3 M, pH 5,2) versetzt und mit 2,5 Volumen Ethanol für mindestens 30 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gefällt. Alternativ wurde die Fällung mit 0,6 Volumen Isopropanol durchgeführt, wobei die Inkubation in Kälte unterblieb. Nach Zentrifugation wurde das Präzipitat zur Entfernung der Salze zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet, bis der restliche Alkohol sich verflüchtigt hatte, und schließlich in H_2O oder Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 0,1 mM EDTA) gelöst.

4.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte UV-photospektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei einer Schichtdicke der verwendeten Quarzküvette von 1 cm entspricht eine Extinktion von 1,0 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ doppelsträngiger DNA, 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA und 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Oligonukleotiden.

4.1.3 Isolierung von Nukleinsäuren

4.1.3.1 Isolierung genomischer DNA nach der Aussalzmethode

Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden direkt aus der Kultur oder aus tiefgefrorenen Zellsedimenten in 3 ml Kernlysepuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 400 mM NaCl, 10 mM EDTA) resuspendiert, durch Zugabe von 100 μl 20 % SDS lysiert und anschließend für mindestens 2 h bei 37°C mit 150 μl Proteinase K (4 mg/ml) verdaut. Nach Zugabe von 1 ml 5 M NaCl wurde kräftig gemischt, 30 min auf Eis inkubiert und schließlich 10 min bei 3000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0) zentrifugiert. Der Überstand wurde einer zweiten Zentrifugation unterzogen und die DNA dann mit 0,6 Volumina Isopropanol gefällt. Nach Abzentrifugation

der ausgefallenen DNA für 10 min bei 3000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0) wurde sie 2x mit 70 % Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und schließlich in H₂O oder Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 0,1 mM EDTA) gelöst.

4.1.3.2 Plasmidisolierung

Schnelle Plasmidisolierung

Zur raschen Überprüfung einer größeren Anzahl von Transformanten auf erfolgreiche Insertion mittels Restriktionsverdau wurde die Plasmidpräparation im kleinen Maßstab nach Chowdhury durchgeführt (Chowdhury 1991). Dazu wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit demselben Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) eine min lang gründlich gemischt und 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und sofort 10 min zentrifugiert, das Sediment mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 50 ml TER (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, 20 mg/ml RNase A) gelöst. 5 bis 10 µl dieser DNA wurden dann in den Restriktionsverdau eingesetzt.

Modifizierte Alkalische Lyse/PEG-Präzipitation

Die Anleitung für diese Art der Plasmidisolierung, die sehr saubere DNA für die Sequenzierung und vor allem für die Transfektion liefert, wurde dem Protokoll des ABI Prism™ Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit von Perkin Elmer entnommen. Es wurden bis zu 50 ml einer Übernachtskultur zentrifugiert, das Sediment in 2 ml GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert, mit 3 ml frisch angesetzter 0,2 N NaOH/1 % SDS-Lösung lysiert und 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 3 ml 3,0 M Kalium-Acetat pH 4,8 wurde die Lösung neutralisiert und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch zweimalige Zentrifugation für 10 min bei Raumtemperatur (3500 rpm, Heraeus Megafuge 1.0) entfernt. Nach Zugabe von RNase A (Endkonzentration 20 µg/ml) wurde die Lösung 20 min bei 37°C inkubiert. Nach zwei bis drei Extraktionsschritten mit jeweils 4 ml Chloroform folgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und sofortige Zentrifugation für 10 min bei Raumtemperatur. Die DNA wurde mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und in 320 µl H₂O gelöst. Nach Zugabe von 80 µl 4 M NaCl und 400 µl 13 % PEG₈₀₀₀ wurde die DNA durch Inkubation auf Eis für 20 min und Zentrifugation bei 4°C für 15 min ein zweites Mal gefällt und schließlich in H₂O oder Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 0,1 mM EDTA) gelöst.

Plasmidisolierung mit dem NucleoSpin Kit

Bis zu 5 ml einer Übernachtskultur wurden mit dem NucleoSpin Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

4.1.3.3 Isolierung von RNA

Isolierung von RNA nach der sauren Methode

RNA wurde nach der Methode von Chomczynski isoliert (Chomczynski und Sacchi 1987). Bis zu 1×10^7 Zellen wurden in 500 μ l Lösung D (4 M Guanidinium-Thiocyanat, 25 mM Na-Citrat, pH 7,0, 0,5 % Sarcosyl, 0,75 % β -Mercaptoethanol) resuspendiert, mit 50 μ l 2 M Na-Acetat, pH 4,0, 500 μ l wassergesättigtem Phenol und 100 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (49/1) versetzt und jeweils gründlich gemischt. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis und 20 min Zentrifugation (13.000 rpm) in der auf 4°C gekühlten Mikroliterzentrifuge wurde der wäßrige Überstand mit 500 μ l Isopropanol gemischt und für mindestens 1,5 h bei -20°C präzipitiert. Das Sediment wurde in 300 μ l Lösung D aufgenommen, mit 300 μ l Isopropanol ein zweites Mal gefällt, schließlich mit 70 % Ethanol gewaschen und in DEPC-behandeltem H₂O (1 % DEPC, Inkubation bei 37°C für > 2h, anschließend autoklaviert) gelöst.

Isolierung von RNA mit dem TriPure Isolation Reagent oder peqGold TriFast

Die Isolierung von RNA mit dem TriPure Isolation Reagent (Boehringer Mannheim, Mannheim) oder peqGOLD TriFast™ (peqLab, Erlangen, Deutschland) erfolgte nach Angaben der Hersteller.

4.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Für die Restriktion von DNA wurden, wenn nicht anders angegeben, die von Boehringer empfohlenen Reaktionspuffer und -temperaturen verwendet. Das Volumen des Reaktionsansatzes wurde so gewählt, daß eine DNA-Konzentration von 200 ng pro μ l und das eingesetzte Volumen des Enzyms von $1/10$ des Reaktionsansatzes nicht überschritten wurden. Die Vollständigkeit des Verdaus (1 U Restriktionsenzym soll 1 μ g DNA/h schneiden) wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Für *Bam*H I/*Xho* I-Doppelrestriktionen wurde der Puffer Blue von AGS (AGS, Heidelberg) mit Zusatz von 1 mM DTT verwendet.

4.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe zweier spezifischer Primer, die zum 5'-Ende des gewünschten DNA-Abschnitts und zum 3'-Ende des entgegengesetzten Strangs komplementär sind, wurde die Polymerase-Kettenreaktion nach Erlich und Saiki (Saiki *et al.* 1988) eingesetzt. Ein 20- μ l-Reaktionsansatz enthielt die DNA-Matrize (50-200 ng genomischer DNA, 1-5 ng Plasmid oder 1 μ l cDNA), 1x PCR-Puffer, 1-4 mM MgCl₂, 0,2 mM jedes dNTP, 7,5-10 pmol jedes Primers und 0,5 U Taq-DNA-Polymerase (AmpliTaq-DNA-Polymerase, Perkin Elmer, Weiterstadt; Qiagen/Diagen GmbH, Hilden oder Taq-DNA-Polymerase, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Für die Klonierung von HLA-G5 wurde die Pfu-Polymerase (Promega Corporation, Madison, USA) bei einer Extensionszeit von 2 min/kb eingesetzt. Nach der PCR wurden zu einem 25- μ l-PCR-Ansatz

je 8 µl dATP (2 mM) und Taq-DNA-Polymerase (2 U) zugegeben und bei 70°C für 15 min inkubiert, um einen A-Überhang für die Klonierung in den Vektor pCRTM2.1 zu erhalten. Verwendete PCR-Puffer waren 10x PCR-Puffer von Perkin Elmer ohne oder mit 15 mM MgCl₂ und 10x PCR-Puffer von Qiagen oder von Amersham Pharmacia mit je 15 mM MgCl₂. Die erforderlichen Primer- und MgCl₂-Konzentrationen, vor allem aber die Anlagerungstemperatur ("Annealing"-Temperatur, T_A), wurden für jedes Primerpaar ausgetestet. Die Schmelztemperatur der Oligonukleotide wurde zunächst nach der "2+4"-Regel (Wallace *et al.* 1979) berechnet: $T_M = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}$ $T_A = T_M - 5^\circ\text{C}$
 Später erfolgte die Berechnung nach einer Formel von MWG (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland): $T_M = 69,3^\circ\text{C} + 0,41 \times (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650/\text{Primerlänge}$ $T_A = T_M + 3^\circ\text{C}$

Ein Standard-PCR-Programm setzte sich aus folgenden Schritten zusammen [die Angaben gelten für die PE (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer, Weiterstadt) und Hybaid OmnE (Hybaid, Heidelberg)]:

1x	Anfangsdenaturierung	95°C	5 min (10 min für PCR-Screen von Bakterien)
25-40x	Denaturierung	95°C	30 s
	"Annealing"	spez. Temp.	30 s
	Extension	72°C	60 s pro 1000 bp
1x	Schluß-Extension	72°C	10 min

4.1.6 Reverse Transkription und PCR (RT-PCR)

In die cDNA-Synthese wurden 1 µg Gesamt-RNA und 500 ng Oligo(dT)₁₅₋₁₈-Primer (GIBCO BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland) eingesetzt. Die reverse Transkription wurde zunächst mit der SuperscriptTM Reversen Transkriptase (GIBCO BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland), später mit der ExpandTM Reversen Transkriptase (Boehringer Mannheim) jeweils nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.1.7 Reinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde mit dem High PureTM PCR Product Purification Kit von Boehringer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

4.1.8 Klonierung von PCR-Produkten

Die Subklonierung von PCR-Produkten erfolgte mit dem TA Cloning Kit in den Vektor pCRTM2.1 (Invitrogen, De Schelp, Niederlande) nach den Angaben des Herstellers.

4.1.9 Nachweis einer Insertion in rekombinanten Bakterien mittels PCR

Zur Untersuchung von Bakterien auf Aufnahme eines Plasmids mit der korrekten Insertion wurde mit einer gelben Spitze eine Kolonie von der Platte entnommen und in 100 µl H₂O gründlich resuspendiert. 1 µl dieser Suspension wurde in eine Standard-PCR eingesetzt, bei der die Anfangsdenaturierung auf 10 min verlängert wurde, um die Bakterienwand zu lysieren (siehe 4.1.5)

4.1.10 Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden mittels PCR

Für die Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden wurden im üblichen PCR-Ansatz die normalen dNTP durch die PCR-Dig-dNTP-Mischung [Endkonzentrationen je 0,2 mM dATP, dCTP und dGTP, 0,13 mM dTTP, 0,07 mM Dig-11-dUTP (Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphat, Alkali-labil, Boehringer Mannheim)] ersetzt und die Extensionszeit auf 2 min verlängert. Um Sonden mit definierten Enden zu erhalten, wurde als Template ein PCR-Amplifikat eingesetzt, das aus einer Amplifikation mit den für die Markierungs-PCR verwendeten Primern hervorgegangen war.

4.1.11 Sequenzierung

Zur DNA-Sequenzanalyse klonierter Fragmente wurde der ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI PRISM, Perkin Elmer, Weiterstadt) nach Angaben des Herstellers benutzt. Zur Fällung der Sequenzierreaktion wurde der 20-µl-PCR-Ansatz nach Zugabe von 80 µl H₂O in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit 10 µl 2 M Natriumacetat, pH 4,0 und 300 µl 100 % Ethanol gründlich gemischt, 10 min auf Eis inkubiert, 10 min auf Raumtemperatur erwärmt und schließlich 15 min bei 13.000 rpm in der Mikroliterzentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde einmal mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Sequenziergele wurden von Frau Eve Holtdorf auf einem ABI 373A-Sequenzierer (abi, Applied Biosystems, Perkin Elmer, Weiterstadt) gefahren. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem dazugehörigen Programm SeqEd™675.

Später wurden die Sequenzierreaktionen mit Fluoreszenz-markierten Primern und dem Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit mit 7-deaza-dGTP (Amersham Life Science, Braunschweig, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem ALFexpress™ DNA Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech GmbH) aufgetrennt. Für die Auswertung wurde das dazugehörige Programm ALFwinSequence Analyser eingesetzt.

4.1.12 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

4.1.12.1 Auftrennung von DNA auf Agarosegelen

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wurden horizontale, nicht-denaturierende Agarosegele verwendet, wobei die eingesetzte Agarosekonzentration (0,7 % bis 2 %) nach den Fragmentgrößen gewählt wurde. Der Gellauf erfolgte in 1x TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) mit 0,15 µg/ml Ethidiumbromid, die Proben wurden mit 6x Auftragspuffer (15 % Ficoll 400, 0,25 % Bromphenolblau/Xylencyanol FF oder 0,25 % Orange G, in Tris-EDTA-Puffer pH 8,0) versetzt. Als Längenstandard wurden 200 ng einer 1 kb-Leiter (GIBCO BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 bis 100 V, die Laufdauer richtete sich nach dem erforderlichen Trennungseffekt. Nach dem Lauf konnten die Gele bei 312 nm im UV-Durchlicht mit Rotfilter photographiert werden.

4.1.12.2 Agarosegelelektrophorese von RNA

Die RNA wurde in 1,2 %igen Agarosegelen aufgetrennt, die 1x MOPS (40 mM MOPS, 10 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA) und 2,2 M Formaldehyd zur Denaturierung der RNA enthalten. Der Laufpuffer bestand aus 1x MOPS mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid. Auf Eis wurden 5 µg Gesamt-RNA mit 2 µl 5x MOPS, 3,5 µl Formaldehyd und 10 µl deionisiertem Formamid gemischt, 15 min bei 56°C zur Auflösung vorhandener Sekundärstrukturen denaturiert, sofort anschließend 5 min auf Eis gekühlt, mit 1 µl Auftragspuffer (30 % Ficoll, 1 mM EDTA, pH 8, 0,4 % Bromphenolblau, 0,4 % Xylencyanol FF) versetzt und aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 1-2 V/cm.

4.1.12.3 Northernblot

Nach dem Gellauf wurde das Gel 10 min mit 20x SSC gewaschen. Der Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham Life Science, Braunschweig, Deutschland) erfolgte mittels Kapillarblot mit 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na₃-Citrat, pH 7,0) über Nacht. Nach dem Transfer wurde die Membran in 2x SSC geschwenkt, luftgetrocknet und 2 h zur Fixierung der RNA bei 80°C gebacken.

4.1.13 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden und Detektion

Die Hybridisierung erfolgte nach der Methode von Engler-Blum (Engler-Blum *et al.* 1993). Die gebackene Membran wurde kurz mit 2x SSC angefeuchtet, mit 68°C heißer Prähybridisierungslösung (0,25 M Na₂HPO₄, pH 7,2, 1 mM EDTA, 20 % SDS (w/v), 0,5 % (w/v) Blocking-Reagens, Boehringer Mannheim) eingeschweißt und für 1 h im Wasserbad bei 68°C äquilibriert. Danach wurde die Prähybridisierungslösung durch die Hybridisierungs-

lösung (pro 100 cm² Membran 10 ml Prähybridisierungslösung mit 10 ng Sonde/ml) ersetzt und bei 68°C im Schüttelwasserbad über Nacht inkubiert. Nach 3x 20minütigem stringenten Waschen mit Hybridisierungswaschlösung (20 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS) bei 65°C zum Entfernen überschüssiger Sonde und 5minütigem Schwenken in Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure, pH 8,0, 3 M NaCl, 0,3 % (w/v) Tween 20) erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen durch Schwenken in Blockpuffer (0,5 % Blockierungsreagens in Waschpuffer) bei Raumtemperatur für 1 h. Anschließend wurde die Membran für 30 min in Konjugatpuffer (anti-DIG-AP 1:15000 in Blockpuffer) inkubiert, 4x 10 min in Waschpuffer geschwenkt, 5 min in Substratpuffer (0,1 M Tris/HCl, pH 9,5, 0,1 % NaCl, 50 mM MgCl₂) äquilibriert und dann für 5 min mit Substratlösung (2,4 µM CDP* in Substratpuffer) bedeckt. Danach wurde die Membran in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm aufgelegt.

4.1.14 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das zu isolierende Fragment wurde unter UV-Licht möglichst knapp ausgeschnitten, durch Glaswolle zentrifugiert, einer Phenolextraktion und einer anschließenden Chloroformextraktion unterzogen, mit 2,5 Volumina 100 % Ethanol in Kälte gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und schließlich nach kurzem Lufttrocknen in H₂O gelöst. Alternativ wurden DNA-Fragmente mit dem GENE CLEAN II Kit (BIO 101 Inc., La Jolla, Ca., USA) nach Anweisung des Herstellers aus Agarosegelen isoliert. Die Konzentration wurde durch Auftrag eines Aliquots auf ein Agarosegel und Vergleich mit dem Größenstandard bestimmt.

4.1.15 Subklonierung von DNA-Fragmenten

Für die Klonierung von Restriktionsfragmenten in einen linearisierten Vektor wurden 50-200 ng Vektor mit dem Fragment im molaren Verhältnis von 1:2 bis 1:3 eingesetzt. Die Berechnung der eingesetzten Fragmentmenge erfolgte dabei nach folgender Formel:

$$\text{Fragmentmenge (ng)} = \frac{\text{Fragmentgröße (bp)} \times \text{Vektormenge (ng)}}{\text{Vektorgöße (bp)}} \times 2 \text{ (oder } \times 3)$$

Ein 10-µl-Ansatz enthielt außerdem 1x Reaktionspuffer (66 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT), 10 mM ATP und 0,2 U Ligase (T4-DNA-Ligase, Boehringer Mannheim). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 14-16°C.

4.2 Arbeiten mit Bakterien

4.2.1 Lagerung

Bakterien in Flüssigkulturen oder auf Agarplatten können für mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden. Für die Langzeitlagerung erfolgte der Zusatz von 1 Volumen 2x Freeze (1,26 g K₂HPO₄, 0,36 g KH₂PO₄, 0,09 g Natriumcitrat, 0,018 g MgSO₄·7H₂O, 0,18 g

(NH₄)₂SO₄, 8,8 ml Glycerin, H₂O ad 100 ml) zur Übernacht-Kultur der Bakteriensuspension und die Verwahrung bei -80°C.

4.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Die kompetenten tiefgefrorenen Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 1-5 ng ungeschnittenem Plasmid oder 5-10 µl des Ligationsansatzes versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 37°C für 5 min. Dann wurde der Ansatz sofort für 2 min auf Eis gekühlt, mit 500 µl vorgewärmtem SOC-Medium (2 % Pepton 140, 0,5 % Hefeextrakt, 0,05 % NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM NaOH, 20 mM Glucose, 10 mM MgCl₂) versetzt und anschließend 1 h bei 37°C inkubiert. Aliquots der Transformationsansätze konnten dann auf LB-Platten (LB-Medium mit 1,5 % Bacto Agar) mit dem erforderlichen Selektionsmedium ausplattiert werden.

Für die Transformation von INF α F' aus dem TA Cloning Kit wurde die Transfektion nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für die Blau-Weiß-Selektion wurden auf den Platten außerdem 40 µl X-Gal (40 mg/ml in Dimethylformamid) ausgestrichen.

4.3 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

4.3.1 Allgemeine Zellkultur

Eukaryontische Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre im entsprechenden Medium inkubiert. Zur Passagierung adhärenter Zellen wurden diese zunächst mit PBS (139,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin/1 mM EDTA in PBS) bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt. Das Auszählen von Zellen erfolgte nach Vitalfärbung in Trypanblaulösung (1:5 in PBS) in der Neubauer-Zählkammer. Für die Lebendlagerung wurden Zellen sedimentiert (1100 rpm, 10 min, Heraeus Megafuge 1.0R), 5-10x 10⁶ Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert (20 % FCS, 10 % DMSO in RPMI 1640) und bei -80°C eingefroren. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur Kultivierung tiefgefrorener Zellen wurden diese rasch auf 37°C erwärmt, einmal mit Medium gewaschen und in eine geeignete Zellkulturflasche überführt.

4.3.2 Transfektion von eukaryontischen Zellen

Elektroporation

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in frischem Medium ausgesät (1x 10⁵/ml). Vor der Transfektion wurden sie einmal mit Medium gewaschen und auf 5x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden pro Transfektionsansatz Aliquots von 200 µl (1x 10⁶ Zellen) in eine Küvette mit 2 mm Elektrodenabstand transferiert, mit 20 µg der zu

transfizierenden DNA (2 µg/µl) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Elektroschock erfolgte bei 105 V, 72 Ω und 1700 mF für Daudi bzw bei 300 V, 13 Ω und 500 mF für K-562 in einem Electro Cell Manipulator (BTX, San Diego, USA). Nach erneuter 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen in 6 ml Vollmedium in eine T25-Flasche überführt. 48 h später wurden 1-3x 10⁴ Zellen/Vertiefung auf 96fM-Platten in Selektionsmedium ausgesät. Nach etwa 10 Tagen wurden einzelne Klone in 24M-Platten überführt. Nachdem sie dort dicht genug gewachsen waren, wurden sie entweder per Immunfluoreszenz (HLA-G1, siehe 4.3.5) oder per ELISA (HLA-G5, siehe 4.4.7) auf Expression untersucht oder in T25-Flaschen überführt, bis genug Zellen für die Bestimmung der HLA-G-Expression im Westernblot vorhanden waren (siehe 4.4.5).

Einsatz lipophiler Reagentien

HeLa229 wurden mittels Transfectene (Qiagen, Hilden, Deutschland) transfiziert. Einen Tag vor der Transfektion wurden 5x10⁵ Zellen in einer T25-Zellkulturflasche (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) mit 5 ml RPMI/10 % FCS ausgesät. Bei einer Konfluenz von ca. 70 % am Tag der Transfektion wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und mit 4 ml frischem Medium versorgt. Zu 1 µg Plasmid-DNA wurde EC-Puffer bis zu einem Endvolumen von 150 µl dazugegeben. Nach Zugabe von 8 µl Enhancer wurde das Gemisch für 1 s gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzem Anzentrifugieren, Zugabe von 10 µl Effectene und 10 s Vortexen wurde erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dem sich bildenden Komplex wurde 1 ml Medium hinzugefügt, dieses gemischt und sofort tropfenweise zu den Zellen gegeben.

4.3.3 Stabilisierung der Oberflächenexpression durch Inkubation bei 26°C und Zugabe von Peptid oder huβ2m

Die Inkubation von Zellen bei 26°C erfolgte über Nacht im Brutschrank ohne CO₂-Begasung. Deswegen wurde als Medium RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und den üblichen Zusätzen verwendet. Es wurden 2x 10⁵ Zellen pro Vertiefung auf einer 96rM-Platte ausgesät. Für die Stabilisierung von HLA-G mit Peptid oder β2m wurden 2x 10⁵ Zellen in 200 µl Medium mit dem H2A-Peptid in einer Endkonzentration von 100 µM bzw. mit β2m in einer Endkonzentration von 12,5 µg/ml versetzt. Als Kontrollen wurden Zellen ohne Peptid und β2m mitgeführt. Da das Peptid in DMSO gelöst vorlag, wurden Zellen zur Kontrolle nur mit der entsprechenden Menge an DMSO behandelt.

4.3.4 Hemmung des intrazellulären Transports durch Behandlung mit Brefeldin A

Die Inkubation von Zellen bei 26°C erfolgte wie unter 4.3.3 beschrieben. Für die Hemmung des Transports vom ER zum Golgi wurden 1x 10⁵ Zellen in 200 µl Medium mit Brefeldin A in einer Endkonzentration von 10 µg/ml versetzt.

4.3.5 FACS-Analyse

4.3.5.1 Zelloberflächenfärbung

Je Loch einer 96rM-Platte wurden 2×10^5 Zellen mit 150 μ l PBS/FCS (10 % FCS, 0,1 % Na-Azid) gewaschen (Zentrifugation für 4 min, 4°C, 625 g), mit 40 μ l primärem Ak resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 150 μ l PBS/FCS wurden die Zellen mit 30 μ l DTAF-, Cy2-, FITC-, PE- oder PerCP-konjugiertem sekundärem Reagenz resuspendiert, 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert, anschließend 3x mit je 150 μ l PBS/FCS gewaschen und in 150 μ l 1 % Paraformaldehyd/PBS, pH 7,4 fixiert. Im FACScan[®] Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) wurden 5.000-40.000 vitale Zellen aufgenommen, die in einem für die Zellsorte charakteristischen, durch Vorwärts- und Seitwärtsstreuung bestimmten Bereich („gate“) lagen. Gemessen wurde die Intensität der Fluoreszenzen (Fluoreszenz 1 bei Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffe FITC, DTAF oder Cy2, Fluoreszenz 2 bei Verwendung PE-gekoppelter Ak, Fluoreszenz 3 bei Verwendung TC- oder PerCP-gekoppelter Ak). Bei Propidiumiodid-Färbungen wurde das „gate“ durch die Vorwärtsstreuung und die Intensität der Rotfluoreszenz (Fluoreszenz 2) festgelegt. Für die Auswertung wurden mit dem Programm CellQuest[™] von Becton Dickinson Histogramme erstellt, in denen die Zellzahl (y-Achse) gegen die Intensität der Fluoreszenz (x-Achse) aufgetragen ist. Bei Mehrfachfärbungen wurden Dot plots erstellt, bei denen die Fluoreszenzintensitäten für je 2 Fluoreszenzfarbstoffe gegeneinander aufgetragen sind.

4.3.5.2 Intrazelluläre Färbung

Intrazelluläre Färbung mit Fix&Perm

$1-2 \times 10^6$ Zellen wurden in einem 15-ml-Spitzbodenröhrchen mit PBS/5 % FCS/0,1 % Na-Azid gewaschen (Zentrifugation 5 min bei 300 g). Nach Entfernung des Überstandes wurde nochmals zentrifugiert (5 min, 300 g) und der verbleibende Überstand vollständig abgenommen. Die Zellen wurden in 50 μ l PBS/5 % FCS/0,1 % Na-Azid resuspendiert. Nach Zugabe von 100 μ l Reagenz A (Fix&Perm: Fixation Medium, An der Grub GmbH, Kaumberg, Austria), Mischen durch Auf- und Abpipettieren und kurzes Vortexen wurden die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 1 ml PBS/5 % FCS/0,1 % Na-Azid (Zentrifugation 5 min, 300 g, Überstand abnehmen, Zentrifugation 5 min, 300 g). Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurden 100 μ l Reagenz B (Fix&Perm: Permeabilization Medium, An der Grub GmbH, Kaumberg, Austria) und 10 μ l inaktiviertes humanes Serum zugegeben. Durch Auf- und Abpipettieren und Vortexen mit geringer Umdrehungszahl für 1-2 s wurde gemischt. Die Zellen wurden 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen resuspendiert und in Vertiefungen einer 96rM-Platte aufgeteilt. Nach Inkubation mit je 40 μ l 1. Ak für 20 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen 2x mit 150 μ l PBS/5 % FCS/0,1 % Na-Azid gewaschen (Zentrifugation 5 min, 370 g). Nach Zugabe von 30 μ l 2. Ak wurden die Zellen 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden 3x mit 150 μ l PBS/5 % FCS/0,1 %

Na-Azid gewaschen und in 150 µl PBS/5 % FCS/0,1 % Na-Azid aufgenommen. Die Analyse erfolgte wie unter 4.3.5.1 beschrieben.

Zytoplasmatische Immunfluoreszenzfärbung mit Saponin

Die Zellen wurden mit 1 ml 4 % Paraformaldehyd/PBS, pH 7,4 für 15-20 min bei Raumtemperatur fixiert und 2x mit PBS/5 % FCS/0,1 % Na-Azid gewaschen. Nach vorsichtiger Resuspension in 40 µl mAk mit 0,1 % Saponin wurden sie 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden 2x mit je 1 ml PBS/5 % FCS/0,1 % Na-Azid gewaschen (Zentrifugation 5 min, 320 g, Überstand verwerfen). Nach vorsichtiger Aufnahme der Zellen in 30 µl sekundärem Ak mit 0,1 % Saponin wurden die Zellen 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Analyse wurden die Zellen 3x mit 1 ml PBS/5 % FCS/ 0,1 % Na-Azid gewaschen.

4.3.6 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen

Je vier ml Ficoll wurden in einem 15-ml-Röhrchen vorsichtig mit 8 ml EDTA-Blut, das zuvor 1:1 mit PBS oder Kompletmedium verdünnt worden war, überschichtet. Nach Zentrifugation für 20 min bei 1200 g und ausgeschalteter Bremse wurde die zellhaltige Intermediärphase vorsichtig abgenommen und 2x mit PBS gewaschen (Zentrifugation für 10 min, 300 g bzw. 10 min, 200 g). Das Zellsediment wurde in PBS aufgenommen und ein Aliquot der Zellen zum Zählen entnommen.

Isolierung von NK-Zellen aus dem peripheren Blut

NK-Zellen wurden aus PBMC mit den MACS CD56 MicroBeads (Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland) positiv selektioniert. Durch negative Selektion mittels MACS NK Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland) bzw. des Rosette SepTM human NK enrichment cocktails (CellSystems, St. Katharinen, Deutschland) wurden NK-Zellen angereichert. Die Durchführung erfolge jeweils nach Anleitung der Hersteller.

Isolierung von $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem peripheren Blut

PBMC wurden nach Stimulation mit 30 µM IPP oder Daudi mit einem V δ 2-spezifischen, FITC-gekoppelten Ak (BD Pharmingen) gefärbt und wie unter 4.3.7 beschrieben isoliert. Alternativ wurden aus den PBMC die V δ 2-positiven ($\gamma\delta$ T-Zellen) mit MACS Goat anti-mouse IgG MicroBeads (Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Deutschland) unter Verwendung des V δ 2-spezifischen Ak (BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland) positiv selektioniert. Die Durchführung erfolge nach Anleitung des Herstellers.

4.3.7 Sortieren von Zellen mittels FACS

Zum Sortieren von K-562 HLA-G1 (pcDNA3.1) auf Zellen mit starker HLA-G-Expression wurde eine FACS-Färbung mit W6/32-Hybridomüberstand durchgeführt, wobei alle verwendeten Lösungen azidfrei verwendet wurden. Zum Sortieren von K-562 HLA-G1 (pIRES2-EGFP), K-562 HLA-G2 (pIRES2-EGFP), Daudi HLA-G1 (pIRES2-EGFP) und HeLa229 HLA-G5 (pIRES2-EGFP) wurden die Zellen direkt auf hohe EGFP-Expression sortiert. Die Sortierung wurde von Dr. J. W. Ellwart oder K. Nispel (GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Molekulare Immunologie, Deutschland) an einem FACSstar PLUS (BD), später an einem MoFlow (Sitomation, USA) durchgeführt. Die positiven Zellen wurden als gemischte Population oder Einzelzellen abgelegt.

Zur Isolation von $\gamma\delta$ T-Zellen wurden frisch isolierte PBMC oder PBMC, die 9 - 10 Tage mit 30 μ M IPP/50 U hUL2/ml stimuliert worden waren, mit dem FITC-gekoppelten V δ 2-spezifischen Ak gefärbt. Das Na-Azid war zuvor aus dem Ak entfernt worden. Die Zellen wurden anschließend bei Dr. J. W. Ellwart sortiert.

4.4 Proteinchemische Methoden

4.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Die Zellsedimente wurden in Lysepuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 % Triton X-100; 2 % Trasytol (Bayer); 1 mM PMSF; Crisa *et al.* 1997) gründlich resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 min zentrifugiert (4°C, 13.000 rpm, Heraeus Biofresco). Anschließend wurde die Proteinkonzentration in den Überständen nach der Methode von Bradford bestimmt.

4.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration in Lysaten wurde nach der Methode von Bradford ermittelt. (Bradford 1976). Zur Erstellung einer Eichkurve wurden 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 und 20 μ l einer BSA-Stammlösung (0,2 μ g/ μ l) in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Von den zu bestimmenden Proben wurden jeweils Doubletten von 1 μ l einer 1:5, 1:10 oder 1:20 Verdünnung eingesetzt. Nach Zugabe von 150 μ l Bradford-Reagens (0,01 % Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7 % Ethanol, 8,5 % Phosphorsäure) erfolgte innerhalb von 15 min die Messung der Absorption im ELISA-Reader (E^{max} precision microplate reader, Molecular Devices) zunächst bei λ_{1-2} 650 nm – 450 nm, später bei einer Wellenlänge von 595 nm.

Die Konzentrationsbestimmung von aufgereinigtem mAk W6/32 erfolgte zusätzlich UV-photospektrometrisch durch Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm (Richtwert OD₂₈₀ = 1 entspricht ca. 1 mg/ml).

4.4.3 Abspaltung von Oligosacchariden mit Endoglykosidase H

Der Endo H-Verdau von Zellysaten wurde mit der Endoglykosidase H_f (Endo H) von Biolabs (New England Biolabs GmbH, Schwalbach) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Ein Aliquot wurde jeweils als Negativkontrolle mit H₂O statt Enzym mitgeführt.

4.4.4 Immunpräzipitation

Zur Vorbereitung der Protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia, Freiburg) wurde sie über Nacht bei 4°C in 15 ml PBS gequollen, 2x mit PBS gewaschen, mit 2 Volumina PBS versetzt (33 %ige Protein-A-Sepharose-Lösung) und nach Zugabe von 0,2 % Na-Azid bei 4°C gelagert. Für die Präzipitation mit dem TAP-Ak 148.3 wurde Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Diese wurde zuvor zur Entfernung des Ethanols 2x mit 1 ml PBS gewaschen und im Ausgangsvolumen PBS resuspendiert.

Pro Ansatz wurden 1×10^7 Zellen in 100 µl Lysepuffer (NP-40 Lysepuffer: 40 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5 % NP-40, 2 mM PMSF, 5 mM Iodoacetamid oder für die besonders sanfte Lyse Digitoninpuffer: 1 % (w/v) Digitonin, 1 mM PMSF, 1 % Trasylol in PBS) aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei 4°C und 10.000 rpm (Heraeus, Biofuge fresco) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 30 µl Ak-Überstand bzw. 1 µl Ascites oder 2,5-5 µl gereinigtem Ak versetzt und 45 min bei 4°C auf einem Rad drehend inkubiert. Nach Zugabe von 15 µl 30 % Protein A-Sepharose CL-4B-Lösung bzw. Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia, Freiburg) wurden die Lysate weitere 20 min bei 4°C auf dem Rad bewegt, 2 min bei 4°C und 10.000 rpm (Heraeus, Biofuge fresco) zentrifugiert und das Sediment 3x mit je 1 ml eiskaltem Lysepuffer bzw. bei Digitoninlyse mit 0,1 % Digitonin in PBS gewaschen. Das Sediment wurde mit 25 µl 1x reduzierendem SDS-Probenpuffer (Roti-Load, Roth GmbH und Co, Karlsruhe) versetzt, gemischt, 1 min abzentrifugiert und bei 4°C gelagert.

4.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Die 6x8 cm großen, 1 mm dicken Trenngele [10-15 % Polyacrylamid (29:1 Acrylamid/Bisacrylamid), 375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % SDS (w/v), 0,4%o TEMED, 0,1 % Ammoniumpersulfat] wurden mit 1 cm Sammelgel (5 % Polyacrylamid, 126 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 1 %o TEMED, 0,1 % Ammoniumpersulfat) überschichtet. Vor dem Auftragen wurden die Volumina der Proben angeglichen und die Ansätze mit Auftragspuffer versetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurde der Auftragspuffer Roti-Load (Roth GmbH und Co, Karlsruhe) eingesetzt. Für den Vergleich von Proben unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen wurde ein Auftragspuffer mit bzw. ohne β-ME verwendet (4x Auftragspuffer ohne β-ME: 0,2 M Tris-HCl pH 6,8, 40 % (v/v) Glycerol, 8 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau oder 5x Auftragspuffer: 60 mM Tris-HCl (pH6,8), 25 % Glycerol, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, mit oder ohne 14,4 mM

β -ME). Nach Denaturierung der Proteine für 10 min bei 95°C erfolgte der Auftrag auf das Polyacrylamidgel. Für den Auftrag von Zellysaten wurde entweder auf Zellzahl (meist 1×10^6) oder auf Proteinmenge (meist 100 μ g) normiert. Als Größenstandard wurden der Prestained Protein Marker Broad Range (New England Biolabs GmbH, Schwalbach) oder der Color Marker Wide Range (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verwendet. Der Gellauf erfolgte in einer XCell™ Mini-Cell Gelkammer (Novex, San Diego, USA) in 1x Tris-Glycin-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) bei 55 V zum Einlaufen der Probe in das Sammelgel, bei 75 V bis zum Erreichen des Trenngels und weiter bei 95 V. Nach dem Lauf wurden Gel und Membran (Protran BA 84, Schleicher & Schüll) 5 min in Transferpuffer (12 mM Tris, 96 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) äquilibriert und danach über Nacht bei 25 V in einem Naßblotmodul (LKB/Pharmacia, Freiburg) geblottet. Die Membran wurde 5 min in 1x PBS geschwenkt. Die Immundetektion der Westernblots wurde zunächst mit dem Western-Light™ Chemiluminescent Detection System von Tropix (TROPIX, Bedford, Massachusetts, USA), später mit dem ECL Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) nach Anleitung der Hersteller durchgeführt.

4.4.6 Silber- und Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen

Silberfärbung von Proteingelen

Für die Silberfärbung wurden alle Lösungen mit H₂O und Imprägnier-, Färbe- und Entwicklerlösung erst kurz vor Gebrauch angesetzt. Die Gele wurden nach dem Lauf für mindestens 60 min in 50% Methanol/12% Eisessig fixiert und danach für jeweils 20 min in 50% bzw. 30% Ethanol geschwenkt. Nach 1-2minütigem Schütteln in der Imprägnierlösung (0,87 mM Na-Thiosulfat, 0,93 mM Formaldehyd) und sofort anschließendem 3maligem Waschen mit H₂O erfolgte die Färbung unter starkem Schütteln für 20 min in der Färbelösung (0,2% (w/v) AgNO₃, 0,93 mM Formaldehyd). Nach Entfernung des überschüssigen Silbernitrats durch 2maliges kurzes Waschen mit H₂O wurde in Entwicklerlösung (6% (w/v) Na₂CO₃, 0,035 mM Na-Thiosulfat, 0,66 mM Formaldehyd) inkubiert, bis die Banden gut sichtbar waren und dann die Farbreaktion mit 50% Methanol/12% Eisessig gestoppt.

Coomassiefärbung von Proteingelen

Für die Coomassiefärbung wurden die Polyacrylamidgele für 5-10 min (Gele mit 0,75 mm Dicke) bzw. 10-20 min (Gele mit 1,5 mm Dicke) in 20 ml Färbelösung (45% Methanol, 10% Eisessig, 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250) geschüttelt. Anschließend wurden die Gele mehrmals mit Wasser gewaschen. Die Entfärbung erfolgte auf dem Schüttler in Entfärbelösung (10 % Methanol, 10 % Eisessig) bis das Gel wieder farblos war und die Banden deutlich sichtbar waren. Für die vollständige Entfärbung wurde die Entfärbelösung mehrmals gewechselt und das Gel über Nacht in Entfärbelösung geschüttelt.

4.4.7 "Enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA)

Zur Bindung des mAk W6/32 an den Boden der 96fM-Platte (Maxisorb, Greiner, Frickenhausen, Deutschland) wurden je Vertiefung 100 μ l (5 μ g W6/32/ml PBS) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einstündigem Blocken mit 200 μ l 5 % Magermilchpulver/0,02 % Tween 20/PBS wurden 100 μ l Antigen (Zellkulturüberstand von K-562 oder HeLa HLA-G5-Transfektanten und von untransfizierten Zellen als Negativkontrolle) zugegeben, 1 h inkubiert, 4x mit 300 μ l PBS/0,02 % Tween 20 pro Loch gewaschen und danach mit 100 μ l sekundärem, Peroxidase-gekoppeltem Ak (Kaninchen anti-hu β_2 m-HRP 1:1000 in PBS/0,02 % Tween, DAKO) pro Vertiefung nochmals 1 h inkubiert. Dem erneuten viermaligen Waschen folgte die Zugabe von 100 μ l ABTS Peroxidase Substrat (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Maryland, USA), 30 min Inkubation und anschließend die Messung bei λ_{1-2} 405 nm-650 nm im Elisa-Reader (E^{\max} , Molecular Devices/MWG-Biotech).

4.4.8 Aufreinigung von Proteinen

Aufreinigung von W6/32 und Kopplung an eine „HiTrap NHS-activated HP Säule“

Die Aufreinigung des monoklonalen Ak W6/32 aus Zellkulturüberstand erfolgte mit dem ÄKTAprime (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Eine ProteinA-Sepharose Säule (1 ml, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) wurde mit Lösung A (150 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 6,5) äquilibriert. Je 300 ml durch einen 0,45 μ m Filter filtrierter Zellkulturüberstand wurden über die Säule geleitet. Nach Waschen der Säule mit Lösung A erfolgte die Elution mit Lösung B (150 mM NaCl, 50 mM Citrat, pH 3). Aliquots von 500 μ l Eluat wurden mit je 20 μ l vorgelegtem 2 M Tris/HCl pH 8 neutralisiert. Die Konzentrationsbestimmung des Ak in den Eluaten erfolgte mittels Bradford und photospektrometrisch (Abschnitt 4.4.2). Der Aufreinigungserfolg wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot-Analyse bzw. Coomassie- oder Silberfärbung kontrolliert (4.4.5 und 4.4.6). Außerdem wurde der aufgereinigte mAk W6/32 im FACS auf Funktion getestet (4.3.5.1). Positive Fraktionen des W6/32 Eluats wurden vereinigt, über Macrosep Centrifugal Concentrators (PALL Filtron Corporation, Northborough, MA, USA) nach Angaben des Herstellers aufkonzentriert, mit Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) gewaschen und in diesem auf eine Konzentration von 5 mg/ml eingestellt. Die Kopplung von 5 ml W6/32 (5 mg/ml in Kopplungs-Puffer) an eine „HiTrap NHS-activated HP Säule“ (5 ml, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Aufreinigung von HLA-G5 aus Zellkulturüberstand

Zur Aufreinigung von HLA-G5 wurden 2 l HeLa HLA-G5 Zellkulturüberstand wie in Fournel *et al.* 1999 beschrieben auf die mit W6/32 gekoppelte Säule geladen und HLA-G5 eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE gefolgt von Coomassie- oder Silberfärbung und Westernblot-Analyse auf Reinheit und Menge von HLA-G5 getestet (Abschnitte 4.4.5, 4.4.6). Außerdem erfolgte eine Kontrolle mittels ELISA (Abschnitt 4.4.7).

4.5 Funktionelle Tests

4.5.1 Zytotoxizitätstest

Zielzellen wurden am Tag vor der Markierung in einer Zelldichte von 3×10^5 /ml in frischem Medium ausgesät. 3×10^6 Zielzellen wurden in RPMI-Medium (RPMI 1620 mit 5 % FCS) gewaschen. Sie wurden in 3 ml RPMI-Medium aufgenommen und mit 5 μ l BATDA reagent (Perkin ElmerWallac GmbH, Freiburg, Deutschland) für 10 min bei 37°C markiert (Abb. 4.1).

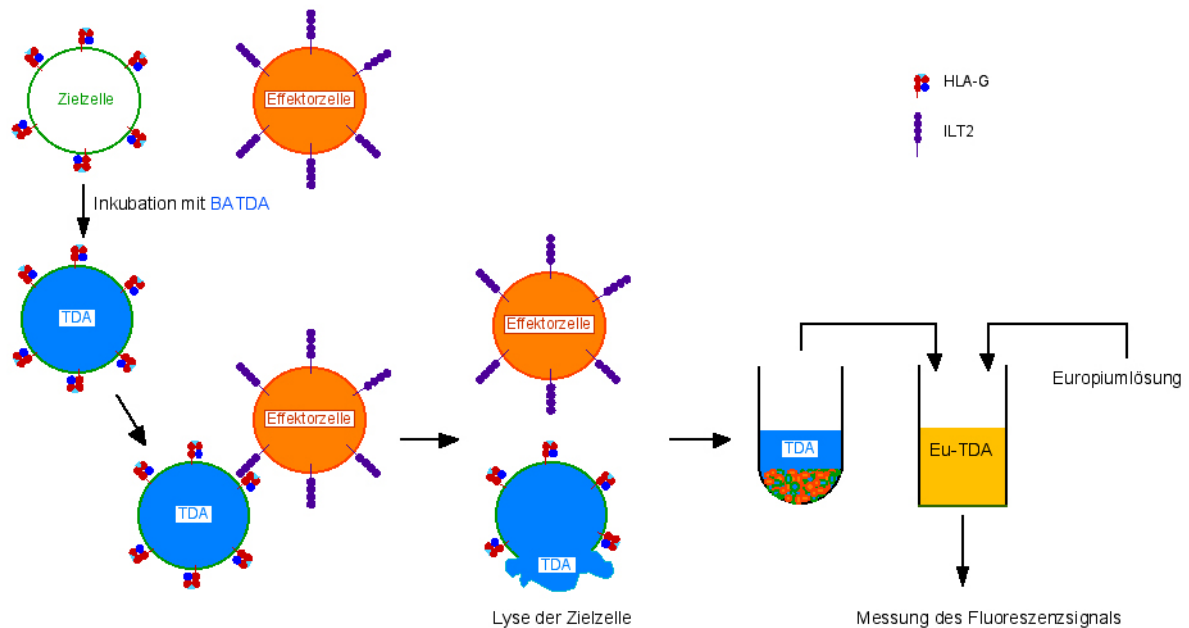


Abb. 4.1: Prinzip des Europium-Zytotoxizitätstests

Die Zielzellen werden mit BATDA inkubiert. BATDA durchdringt die Zellmembran. Nach Aufnahme in die Zelle wird es durch Hydrolyse der Esterbindung durch eine Acetylcysterase in den hydrophilen Liganden TDA umgewandelt, der die Zellmembran nicht mehr passieren kann. Nach Inkubation der TDA-markierten Zielzellen mit Effektorzellen und Lyse der Zielzellen wird TDA freigesetzt. Dieses bildet mit Europium einen Chelatkomplex Eu-TDA, der über ein Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden kann. Die Signalstärke korreliert mit der Anzahl der lysierten Zellen. Das Ausmaß der Zellyse wird beeinflusst durch aktivierende und inhibitorische Rezeptoren (z.B. ILT2) auf den Effektorzellen und ihre Liganden (z.B. HLA-G) auf den Zielzellen.

Markierte Zellen wurden in RPMI-Medium gewaschen, in Aliquots von 3×10^5 Zellen lebend weggefroren und bei -80°C gelagert oder sofort eingesetzt. Mit BATDA markierte Zellen wurden 3x mit ca. 8 ml RPMI-Medium gewaschen und in einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/ml in RPMI-Medium resuspendiert. Es wurden 5000 Zielzellen/Ansatz eingesetzt. Ziel- und Effektorzellen wurden falls angegeben für 15 min mit Ak bei Raumtemperatur präinkubiert. Zur Kontrolle der Funktion von HLA-G5 wurden NKL ($2,5 \times 10^5$ /ml) mit HeLa-, HeLa HLA-G5- oder HeLa HLA-B27Q10-Zellkulturüberständen oder aufgereinigtem HLA-G5 (1 μ g/ml) bei 37°C für 30 min präinkubiert. In einigen Ansätzen wurden, um multivalente Bindung an HLA-G5 zu erhalten, die Vertiefungen der 96rM-Platten über Nacht mit 200 μ l W6/32 oder 16G1 (5 μ g/ml) bzw. mit BBM.1- oder W6/32-Zellkulturüberstand bei 4°C beschichtet, 4x mit RPMI-Medium gewaschen, 3x für je 30 min mit 200 μ l HeLa HLA-G5- oder HLA-B27Q10-Zellkulturüberständen präinkubiert und mit RPMI-Medium gewaschen,

bevor die Effektorzellen zugegeben wurden. Effektorzellen – PBMC, NKL, LAK Zellen, NK-Zellen oder $\gamma\delta$ T-Zellen – wurden in RPMI-Komplettmedium resuspendiert und in verschiedenen Effektor:Zielzellverhältnissen mit markierten Zielzellen in einer 96rM-Platte gemischt. Maximale Freisetzung von TDA wurde durch Inkubation der Zielzellen in 0,25 % Triton X-100 bestimmt. Für die Kontrolle der spontanen Freisetzung wurden die Zielzellen ohne Effektorzellen in RPMI-Komplettmedium inkubiert. Der Hintergrund wurde durch Abzentrifugieren der markierten, eingestellten Zielzellen und Inkubation des Überstandes in RPMI-Komplettmedium allein bestimmt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Die 96rM-Platten wurden für 2 h bei 37°C in einem Zellkulturbrutschrank inkubiert. Zellen wurden bei 300 g für 7 min abzentrifugiert. Je 20 μ l der Überstände wurden zusammen mit 180 μ l Europium-Lösung (gebrauchsfertig, Perkin ElmerWallac GmbH) in einer 96fM-Platte mit niedrigem Europium-Hintergrund (Perkin ElmerWallac GmbH) 15 min auf einem Mikrotiter-schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte mit einem VictorTM1420 Multilabel Counter (Wallac ADL GmbH, Freiburg, Germany). Der %-Satz an spezifischer Lyse wurde berechnet als $[(\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})/(\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung})] \times 100$.

4.5.2 Proliferationstest

Bestimmung der Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen durch FACS-Analyse

PBMC wurden in einer Zellkonzentration von 1×10^6 /ml mit mit 60 Gy bestrahlten Daudi oder Daudi-Transfektanten als Stimulatorzellen in einer Zellkonzentration von 1×10^5 /ml für 5 - 22 Tage koinkubiert. Als Positivkontrolle für die Proliferation wurden zum Teil Zellen mit 30 μ M IPP und 50 U hull2/ml stimuliert. Der Anteil $\gamma\delta$ -positiver Zellen wurde in Relation zur PBMC-Gesamtzellzahl durch FACS-Färbung (siehe 4.3.5.1) und Analyse im FACScan[®] Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) bestimmt.

Bestimmung der Teilung von $\gamma\delta$ T-Zellen mittels Markierung der Zellen mit CFSE

Zu markierende $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in einer Zellkonzentration von 5×10^5 /ml in PBS/5 % FCS aufgenommen. Nach Zugabe von CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR) in einer Endkonzentration von 0,5 - 0,75 μ M wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Sie wurden 3x mit PBS/5 % FCS gewaschen und in Medium aufgenommen. Je 1×10^4 mit CFSE markierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden mit 4×10^4 Daudi bzw. Daudi-Transfektanten für mehrere Tage in einer 96rM-Platte koinkubiert. Die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen wurde durch Färbung mit dem $\gamma\delta$ -spezifischen Ak und dem PE-markierten sekundären Ak und Analyse der Fluoreszenzen 1 (CFSE) und 2 (PE) im FACScan[®] Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) kontrolliert (siehe 4.3.5).

5 Ergebnisse

Das HLA-Klasse-I-Antigen HLA-G zeichnet sich durch das Auftreten von mehreren verkürzten Isoformen aus, die durch alternatives Spleißen zustande kommen. Das komplette membranständige HLA-G1 besitzt die extrazellulären Domänen $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$. Den verkürzten Isoformen HLA-G2 (alternativ gespleißte cDNA ohne Exon 3: HLA-G $\Delta\alpha 2$), HLA-G3 (alternativ gespleißte cDNA ohne Exone 3 und 4: HLA-G $\Delta\alpha 2, \Delta\alpha 3$) und HLA-G4 (alternativ gespleißte cDNA ohne Exon 4: HLA-G $\Delta\alpha 3$) fehlen jeweils eine oder zwei der extrazellulären Domänen. Von Transkripten, die Intron 4 bzw. 2 enthalten, werden die löslichen Isoformen HLA-G5 (alternativ gespleißte cDNA mit Intron 4: HLA-G1s, „lösliches“ HLA-G1), HLA-G6 (alternativ gespleißte cDNA ohne Exon 3, mit Intron 4: HLA-G2s, „lösliches“ HLA-G $\Delta\alpha 2$) und HLA-G7 (alternativ gespleißte cDNA mit Intron 2: HLA-G3s, „lösliches“ HLA-G $\Delta\alpha 2, \Delta\alpha 3$) translatiert. Stopkodone in den Intronsequenzen führen zu einem vorzeitigen Translationsstop (siehe Abschnitt 1.1.3.2 und Abb. 1.3).

Um die Expression und Funktion der einzelnen HLA-G-Isoformen unabhängig voneinander untersuchen zu können, wurden Transfektanten für einige der verkürzten HLA-G-Proteine hergestellt.

5.1 Expression und Funktion der HLA-G-Isoformen in der HLA-I-negativen Zelllinie K-562

Für die Versuche zur Expression und Funktion von HLA-G standen bereits Transfektanten in der Zelllinie 721.221 (.221) zur Verfügung. Die Zelllinie .221 exprimiert jedoch auch HLA-E und HLA-F (Wainwright *et al.* 2000). HLA-E kann durch Bindung von Peptiden, die aus Signalpeptiden von HLA-I-Molekülen stammen, stabilisiert werden (Braud *et al.* 1997). Da auch das Signalpeptid von HLA-G als Ligand für HLA-E dienen kann, wurden durch *in vitro* Mutagenese der HLA-G-cDNA (ATG zu ACG = Met zu Thr an Position 4 der Signalsequenz) Transfektanten hergestellt, deren verändertes HLA-G-Signalpeptid keinen Liganden für HLA-E liefert. Eine so veränderte HLA-G-Sequenz wird im folgenden als HLA-G1mut bzw. bei der HLA-G4-Isoform als HLA-G4mut bezeichnet. Um die Funktion der HLA-G-Isoformen unabhängig von der Expression anderer MHC-Ia- und MHC-Ib-Antigene untersuchen zu können, wurde die HLA-I-negative Erythroleukämiezelllinie K-562 gewählt. K-562-Zellen wurden mit HLA-G1mut- und HLA-G4mut-cDNA im Vektor pcDNA3.1 transfiziert. Da in dieser Zelllinie in späteren Versuchen keine Hochregulation von HLA-E festgestellt wurde, fanden auch die ursprünglichen HLA-G-cDNA ohne Mutation im Signalpeptid Verwendung: HLA-G1 (pIRES2-EGFP), HLA-G2 (pIRES2-EGFP), HLA-G2 3'Flag (pcDNA3) und HLA-G5 (HLA-G1s, pcDNA3.1). Die K-562 HLA-G1-Transfektanten wurden auch für funktionelle Analysen eingesetzt, weil in diesen Klonen durch Sortierung auf hohe EGFP-Expression eine höhere HLA-G1-Expression erreicht wurde als in den Klonen mit dem HLA-G1mut (pcDNA3.1)-Vektor. Neben HLA-G1- wurden HLA-G2- und HLA-G4-cDNA-Vektoren gewählt, da diese HLA-G-Isoformen je zwei extrazelluläre Domänen aufweisen. Darin stimmen sie mit MHC-II-Antigenen, aber z.B. auch mit den verwandten Glykoproteinen ULBP überein, die

funktionell auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Die Transfektanten wurden durch Westernblot-Analyse und wenn möglich durch FACS-Analyse auf HLA-G-Proteinexpression getestet. Die FACS-Analyse kam beim Nachweis von HLA-G1 und von EGFP in HLA-G1- und HLA-G2-Transfektanten zum Einsatz. Zur Analyse der Expression und Funktion von HLA-G in der Zelllinie K-562 wurden jeweils mehrere Klone nach ihrer Expressionsstärke ausgewählt. Im folgenden sind Ergebnisse mit den Klonen HLA-G1 B3 und C1 (HLA-G1mut in pcDNA3.1), HLA-G1 15 und 27 (HLA-G1 in pIRES2-EGFP), HLA-G2 3'Flag II10 (HLA-G2 3'Flag in pcDNA3), HLA-G4 A5 (HLA-G4mut in pcDNA3.1) und HLA-G5 B5 (HLA-G5 in pcDNA3.1) und mit der Zellpopulation HLA-G2 Pool B (HLA-G2 in pIRES2-EGFP) gezeigt (Tab. 5.1).

Klonname	HLA-G-cDNA	Vektor	Anmerkung
K-562 HLA-G1 B3	HLA-G1mut	pcDNA3.1	
K-562 HLA-G1 C1	HLA-G1mut	pcDNA3.1	
K-562 HLA-G1 15	HLA-G1	pIRES2-EGFP	
K-562 HLA-G1 27	HLA-G1	pIRES2-EGFP	
K-562 HLA-G2 Pool B	HLA-G2	pIRES2-EGFP	Zellpopulation
K-562 HLA-G2 3'Flag II10	HLA-G2 3'Flag	pcDNA3	
K-562 HLA-G4 A5	HLA-G4mut	pcDNA3.1	
K-562 HLA-G5 B5	HLA-G5	pcDNA3.1	

Tab. 5.1: Übersicht über die für die Untersuchungen der Expression und Funktion eingesetzten Klone von K-562 HLA-G-Transfektanten

Die Transfektantenklone in der Zelllinie K-562 sind mit ihren Namen, den HLA-G-Isoformen und den Vektoren angegeben. mut = HLA-G cDNA-Sequenz mit Mutation von ATG zu ACG = Met zu Thr an Position 4 der Signalsequenz.

5.1.1 Expression der HLA-G-Spleißvarianten in Transfektanten der Zelllinie K-562

Zur Kontrolle der Transkription von HLA-G in den K-562-Transfektanten wurden sie im Northernblot auf HLA-G-mRNA getestet (siehe 4.1.12, 4.1.13). Dabei wurde als Sonde die Digoxigenin-markierte HLA-G4-cDNA verwendet. Dieser fehlt das Exon 4, das den konserviertesten Bereich der HLA-I-Transkripte ausmacht. Die Sonde reagiert in diesem System ausschließlich mit HLA-G-Transkripten und erkennt nicht die geringe Anzahl von HLA-E-Transkripten in K-562. K-562-Zellen, die mit der HLA-G-cDNA im Vektor pIRES2-EGFP transfiziert wurden, exprimieren eine bicistronische mRNA, die zugleich für HLA-G und EGFP kodiert. Die Transkripte laufen daher im Gel langsamer. Bei allen Transfektanten ist HLA-G-mRNA nachweisbar (Abb. 5.1). Die Signalstärke des Klones HLA-G4 A5 ist jedoch sehr schwach. Der Klon HLA-G1 B3 ging aus der Sortierung des Klones HLA-G1 19 auf hohe HLA-G1-Expression im FACS hervor. Daher gleichen sich trotz geringerer Menge an aufgetragener Gesamt-RNA die Signalstärken der Klone HLA-G1 B3 und HLA-G1 19.

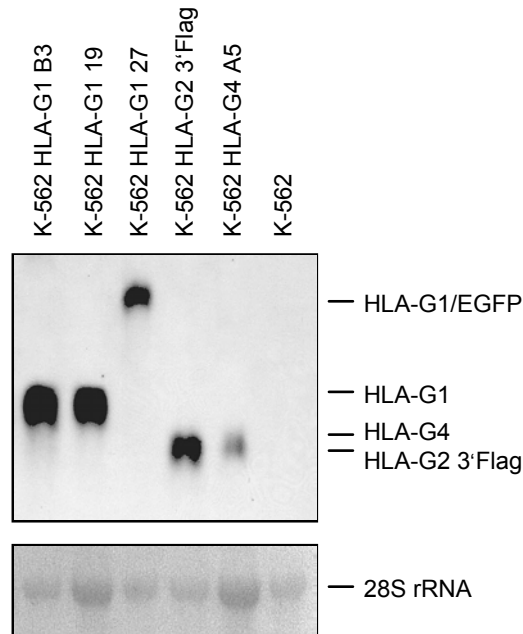


Abb. 5.1: Analyse der HLA-G-mRNA-Expression in K-562 HLA-G-Transfektanten

Je 5 µg Gesamt-RNA aus untransfizierten und mit HLA-G-cDNA-Vektoren transfizierten K-562 wurden auf einem 1,2 %igen Formaldehydgel aufgetrennt und anschließend auf eine Hybond-N⁺-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit der Digoxigenin-markierten HLA-G4-cDNA als Sonde. Die Menge der aufgetragenen RNA ist durch die Ethidiumbromidfärbung der 28S rRNA angezeigt. Die Ethidiumbromidfärbung des Gels ist revertiert dargestellt.

Da der Nachweis der HLA-G-mRNA noch keinen Beweis für die Synthese der entsprechenden Proteine erbringt, wurden die Transfektanten im Westernblot getestet (Abschnitt 4.4.5). In den Transfektanten band der HLA-G-spezifische mAk 4H84 an Polypeptide mit den nach Abspaltung des Signalpeptids erwarteten Größen von 35,6 kD für HLA-G1, 25,1 kD für HLA-G2 ($\Delta\alpha2$), 26,0 kD für HLA-G2 3'Flag ($\Delta\alpha2$, + Flag-Epitop), 25,0 kD für HLA-G4 ($\Delta\alpha3$) und 33,9 kD für das sezernierte HLA-G5 (Abb. 5.2, Abb. 5.8).

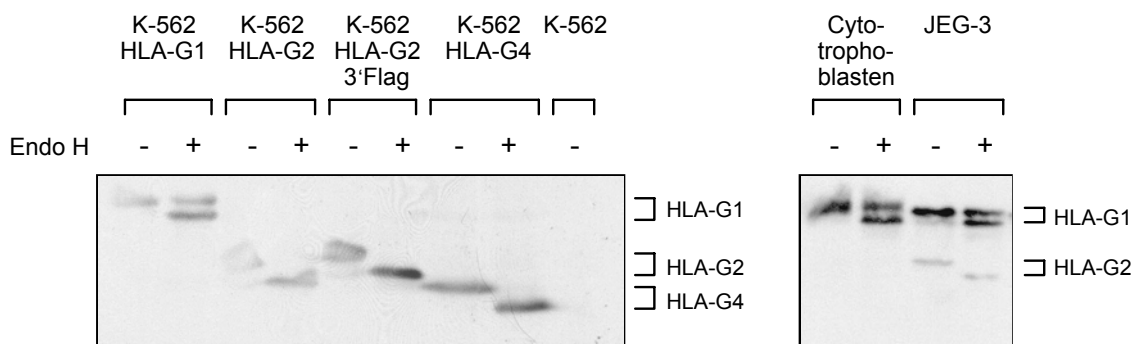


Abb. 5.2: Endo H-Verdau von Zellysaten der K-562 HLA-G-Transfektanten

Je 100 µg Zellysate wurden mit Endo H behandelt (+) oder ohne Zugabe von Enzym (-) als Kontrolle mitgeführt. Nach Auftrennung auf einem 10 %igen Polyacrylamidgel und Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran wurden die HLA-G-Antigene mit dem mAk 4H84 nachgewiesen.

Nachdem die Transkription und Translation der verschiedenen HLA-G-Isoformen in den K-562-Transfektanten nachgewiesen worden waren, sollte untersucht werden, ob die membranständigen Isoformen HLA-G1, HLA-G2 und HLA-G4 auf der Zelloberfläche

exprimiert werden. Um erste Hinweise auf die Zelloberflächenexpression der HLA-G-Isoformen zu erhalten, wurden Lysate von K-562-HLA-G-Transfektanten einer Inkubation mit Endoglykosidase H (Endo H) unterzogen, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die HLA-G-Polypeptide mit dem HLA-G-spezifischen mAk 4H84 nachgewiesen (Abb. 5.2, Abschnitte 4.4.3, 4.4.5). Die Tatsache, daß ein Glykoprotein resistent gegenüber Abspaltung von Zucker durch Endo H ist, weist darauf hin, daß das Protein den medialen Golgi-Apparat passiert hat. Dies wiederum ist ein Indikator für Zelloberflächenexpression. Ein Teil der HLA-G1-Moleküle in den K-562-Transfektanten ist Endo H-resistent. Von den verkürzten HLA-G-Isoformen HLA-G2 ($\Delta\alpha 2$) und HLA-G4 ($\Delta\alpha 3$) können keine Endo H-resistenten Moleküle nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt auch mit der Sensitivität der HLA-G-Isoformen in Zellen überein, die das endogene HLA-G transkribieren. JEG-3 und Cytotrophoblasten weisen Endo H-resistente und -sensitive HLA-G1-Moleküle auf. Der Größenunterschied zwischen HLA-G-Polypeptiden aus Cytotrophoblasten und JEG-3 beruht auf unterschiedlichen Glykosylierungsmustern in Trophoblastenzellen (Abb. 5.2, McMaster *et al.* 1998). Die im Lysat von JEG-3 nachweisbaren HLA-G2-Antigene - in der RT-PCR mit anschließendem Northernblot überwiegen die HLA-G2-Transkripte gegenüber den HLA-G4-Transkripten - werden vollständig verdaut (Abb. 5.2). Der Endo H-Verdau liefert keinen Hinweis auf einen Transport der verkürzten HLA-G-Isoformen in den K-562 HLA-G⁻, HLA-G2 3'Flag- und HLA-G4-Transfektanten auf die Zelloberfläche. Dieses Ergebnis korreliert mit der über FACS ermittelten Zelloberflächenexpression der HLA-G-Isoformen, wie im Folgenden gezeigt.

Die Transfektanten wurden in FACS-Analysen mit verschiedenen HLA-I- und HLA-G-spezifischen Ak auf HLA-G-Zelloberflächenexpression getestet (Tab. 5.2, Abschnitt 4.3.5.1).

	K-562 HLA-G1mut	K-562 HLA-G1	K-562 HLA-G2	K-562 HLA-G2 3'Flag	K-562 HLA-G4mut
a) Zelloberflächenfärbung					
W6/32	+++	+++	-	-	-
HCA2	-	-/+	-	n.d.	-
87G	++	+++	-	-	-
MEM-G/9	+++	+++	-	-	-
4H84	-	-	-	-	-
MEM-G/1	-	-	-	-	-
BFL.1	-	-	n.d.	n.d.	-
Kaninchen-Antiserum	-	-	n.d.	n.d.	-
Ab 704	-	-	n.d.	n.d.	-
BBM.1	+++	+++	n.d.	-	n.d.
b) intrazelluläre Färbung					
W6/32	n.d.	+++	-	-	-
MEM-G/9	n.d.	+++	-	+	-
HCA2	n.d.	+++	++	++	++
4H84	n.d.	+++	-	n.d.	-

Tab. 5.2: Übersicht über die Reaktivität von Ak in der FACS-Analyse von HLA-G⁺ K-562-Transfektanten

Der Nachweis von HLA-G-Isoformen in HLA-G1⁻, HLA-G1mut⁻, HLA-G2⁻, HLA-G2 3'Flag⁻ und HLA-G4mut-K-562-Transfektanten wurde a) in der Zelloberflächenfärbung und b) zum Teil mittels intrazellulärer FACS-Färbung mit den HLA-I-spezifischen mAk W6/32 und HCA2, den HLA-G-spezifischen Ak 87G, MEM-G/9, 4H84, MEM-G/1, BFL.1, Ab704 und dem Kaninchen-Antiserum gegen die $\alpha 1$ -Domäne von HLA-G, sowie dem $\beta 2m$ -spezifischen mAk BBM.1 getestet. - = keine Bindung, + = sehr schwache Bindung, ++ = schwache Bindung, +++ = gute Bindung der Ak an die jeweilige Transfektante, n.d. = nicht durchgeführt

Während die Volle-Länge-Isoform HLA-G1 mit dem HLA-I-spezifischen mAk W6/32, sowie den HLA-G-spezifischen mAk 87G und MEM-G/9 angefärbt werden konnte, waren die verkürzten Isoformen HLA-G2 und HLA-G4 nicht nachweisbar. Auch Färbung mit dem β 2m-spezifischen mAk BBM.1 ergab nur für die HLA-G1 exprimierenden Transfektanten ein Signal (Tab. 5.2). Für einige der HLA-G-Transfektanten sind beispielhaft FACS-Ergebnisse für die mAk W6/32, 87G, MEM-G/9 oder BBM.1 gezeigt (Abb. 5.3).

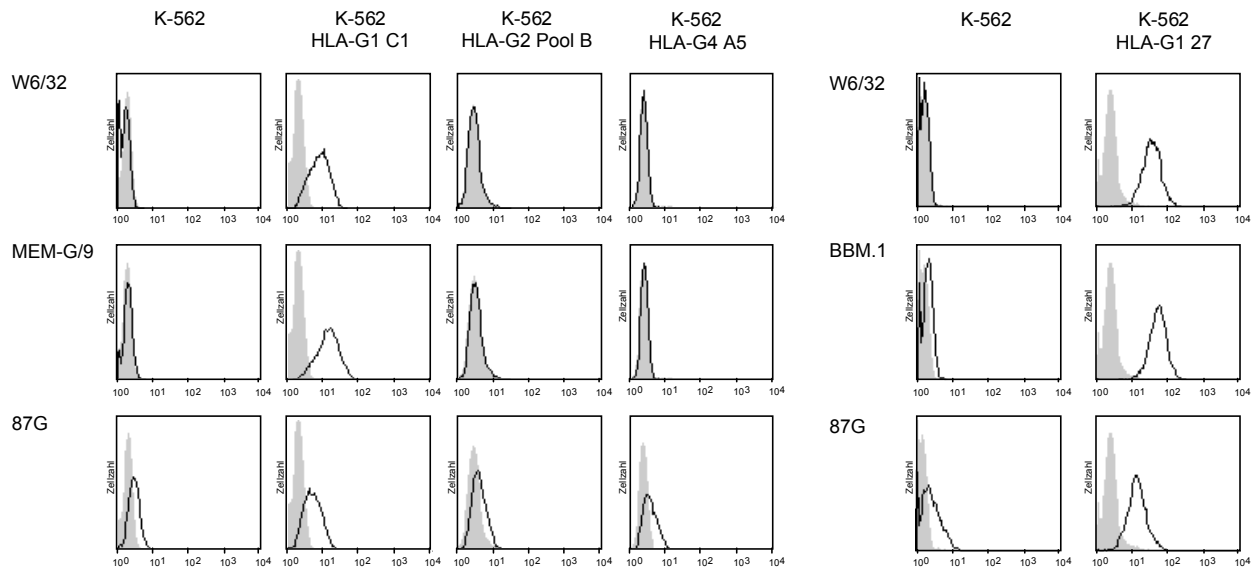


Abb. 5.3: Analyse der Zelloberflächenexpression von HLA-G in K-562-Transfektanten mit Ak gegen native HLA-G-Antigene

Je 2×10^5 untransfizierte K-562 und mit HLA-G1mut-, HLA-G1-, HLA-G2- bzw. HLA-G4mut-cDNA-Vektoren transfizierte K-562 wurden mit dem HLA-spezifischen mAk W6/32, den HLA-G-spezifischen mAk 87G und MEM-G/9 bzw. dem β 2m-spezifischen mAk BBM.1 gefärbt (durchgezogene Linie). Als sekundäres Reagenz wurde ein PE-gekoppeltes $F(ab')_2$ -Fragment eingesetzt. Die Inkubation ohne 1. Ak diente als Negativkontrolle (schattiert dargestellt). Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz 2 angegeben.

Da die Konformation der Domänen der verkürzten Isoformen möglicherweise von derjenigen von HLA-G1 abweicht, wurden zusätzlich FACS-Analysen mit Ak durchgeführt, die auch denaturierte HLA-G-Proteine z.B. in Westernblot-Analysen erkennen. Gezeigt sind Zelloberflächenfärbungen mit dem HLA-I-spezifischen mAk HCA2 und dem HLA-G-spezifischen mAk 4H84 (Abb. 5.4).

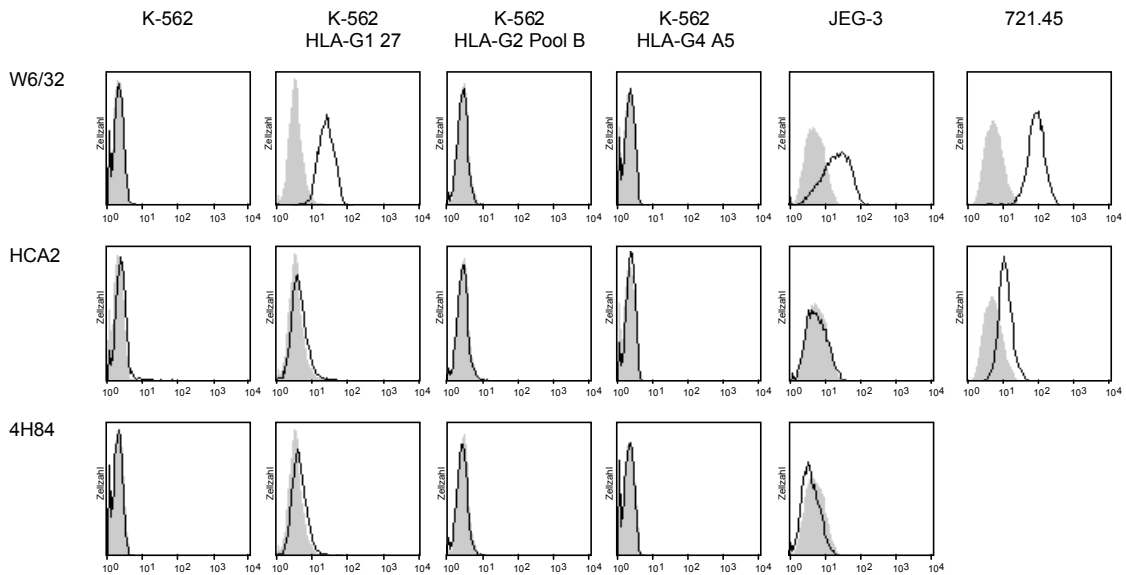


Abb. 5.4: Analyse der Zelloberflächenexpression von HLA-G mit Ak gegen entfaltete HLA-G-Antigene

Je 2×10^5 JEG-3, untransfizierte K-562 und HLA-G1 27-, HLA-G2 Pool B- und HLA-G4 A5-Transfektanten wurden mit dem gegen die HLA-I- α -Kette gerichteten mAk HCA2 und dem gegen die α 1-Domäne von HLA-G gerichteten mAk 4H84 gefärbt (durchgezogene Linie). Als Kontrolle für die HLA-I-Expression wurde der mAk W6/32 eingesetzt. Die B-Zelllinie 721.45 wurde als Positivkontrolle für den mAk HCA2 verwendet. Als sekundärer Ak wurde ein PE-gekoppeltes F(ab')₂-Fragment benutzt. Die Inkubation ohne 1. Ak diente als Negativkontrolle (schattiert dargestellt). Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz 2 angegeben.

Außerdem wurden die HLA-G-spezifischen Ak MEM-G/1, BFL.1, Ab704 und ein Kaninchen-Antiserum gegen rekombinantes α 1 von HLA-G eingesetzt. Mit keinem der verwendeten Ak konnten die verkürzten HLA-G-Moleküle auf der Zelloberfläche der K-562-Transfektanten nachgewiesen werden (Tab. 5.2). Auch entfaltete, nicht normal mit β 2m geformte Ketten von HLA-G1 waren mit Ak gegen die HLA-G-schwere Kette selbst auf der Zelloberfläche nicht oder nur in geringer Menge nachweisbar (Abb. 5.4, Abb. 5.6). Dies spricht für eine überwiegend korrekte Faltung der auf der Zelloberfläche exprimierten HLA-G1-Moleküle.

Wie die intrazelluläre FACS-Färbung zeigt (Abb. 5.5, Abschnitt 4.3.5.2) ist allerdings eine Bindung dieser Ak an alle verkürzten HLA-G-Proteine nicht zu erwarten, da den Isoformen HLA-G2 und HLA-G4 die α 2- bzw. α 3-Domäne fehlt. In der intrazellulären FACS-Analyse wurde zwar HLA-G1 von den mAk W6/32, MEM-G/9, HCA2 und 4H84 erkannt, aber die verkürzten Isoformen reagierten nur mit dem mAk HCA2, zum Teil mit MEM-G/9 und nicht mit W6/32 oder 4H84 (Abb. 5.5, Tab. 5.2). Der mAk W6/32 erkennt vorwiegend HLA-I-schwere Ketten, die mit β 2m assoziiert vorliegen. Das W6/32-Epitop setzt sich aus Aminosäuren der α 2- und α 3-Domänen der schweren Kette und Positionen in β 2m zusammen. Es wurde als konformationsabhängig beschrieben. Da W6/32 aber alle HLA-G-Isoformen aus .221-Transfektanten präzipitiert und auch β 2m-freie, Calnexin-assoziierte MHC-I-Polypeptide und einige HLA-I-Allele in partiell denaturierter Form erkennt, wurde er für die FACS-Analyse mit herangezogen (siehe 6.1.2). In den K-562-Transfektanten der verschiedenen HLA-G-Isoformen ließ sich auch durch intrazelluläre FACS-Färbung mit dem mAk W6/32 nur HLA-G1 nachweisen. Die Färbung von K-562 HLA-G2 und K-562 HLA-G4 entsprach der der untransfizierten K-562 (Abb. 5.5).

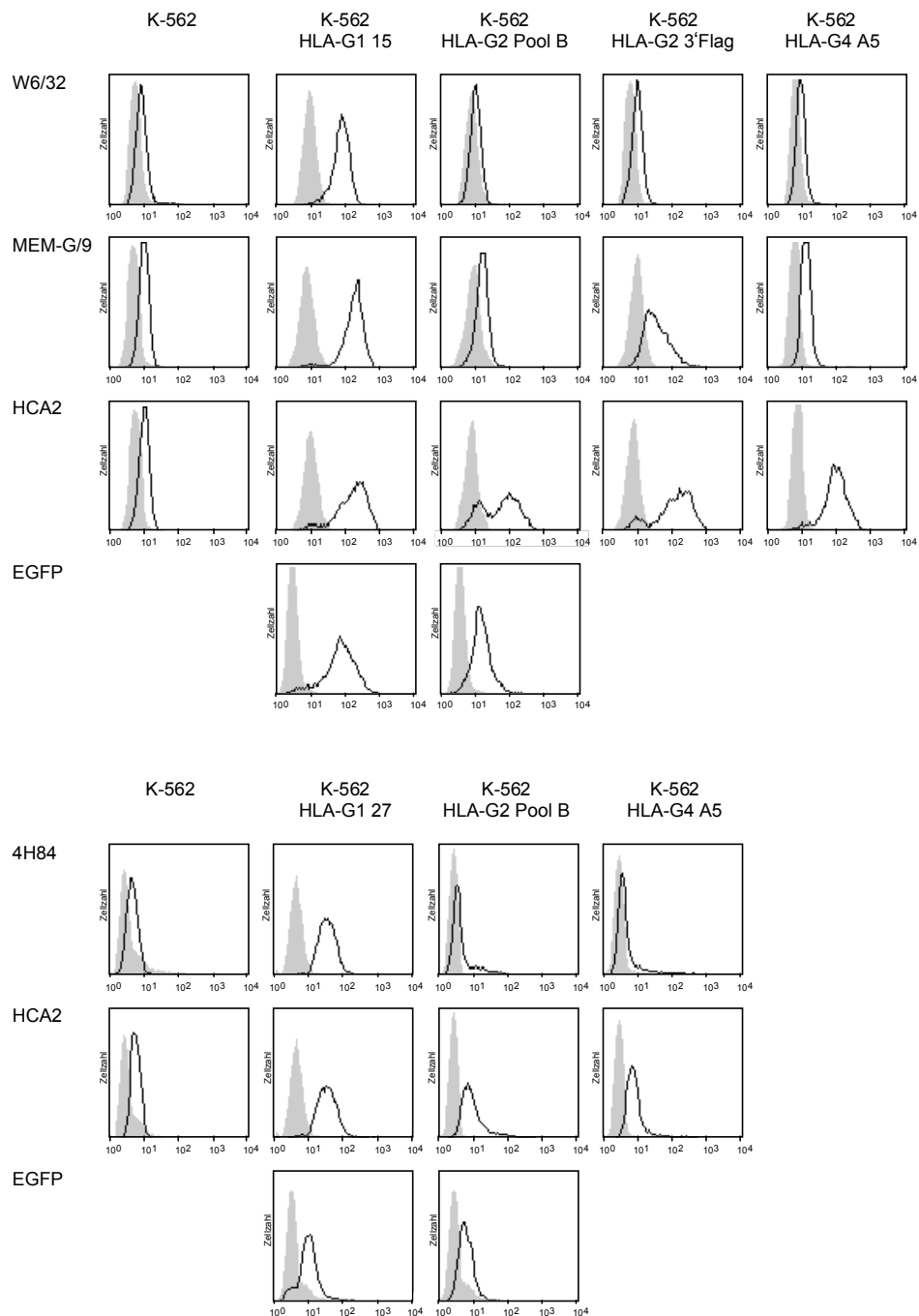


Abb. 5.5: Intrazelluläre FACS-Analyse der K-562 HLA-G-Transfektanten

Je 2×10^5 untransfizierte K-562 und mit HLA-G1 (pIRES2-EGFP)-, HLA-G2 (pIRES2-EGFP)-, HLA-G2 3'Flag bzw. HLA-G4mut-cDNA-Vektoren transfizierte K-562 wurden mit Saponin permeabilisiert und mit den HLA-I-spezifischen mAk W6/32 und HCA2 und dem HLA-G-spezifischen mAk MEM-G/9 bzw. 4H84 gefärbt (durchgezogene Linie). Als sekundäres Reagenz wurde ein PE-gekoppeltes $F(ab')_2$ -Fragment eingesetzt. Die Inkubation ohne 1. Ak diente als Negativkontrolle (schattiert dargestellt). Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz 2 angegeben. Die EGFP-Expression der Transfektanten mit dem pIRES2-EGFP-Vektor (durchgezogene Linie) ist im Vergleich zu den untransfizierten K-562 (schattierte Kurve) als Fluoreszenz 1 aufgetragen.

Gegen natives, $\beta 2m$ -assoziiertes HLA-G wurde der mAk MEM-G/9 generiert. Mit diesem mAk konnte HLA-G1 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. In der intrazellulären Färbung reagierte er mit HLA-G1 und HLA-G2 3'Flag, aber nicht mit der HLA-G2 Pool B- oder der HLA-G4-Transfektante. Das Epitop von MEM-G/9 ist nicht näher charakterisiert und könnte daher im Bereich der $\alpha 3$ -Domäne liegen, die der HLA-G4-Isoform fehlt. MEM-G/9

bindet wahrscheinlich konformationsabhängig, da er im Westernblot nicht mit HLA-G reagiert (Menier *et al.* 2003). Die unterschiedliche Färbung der HLA-G2- und HLA-G2 3'Flag-Transfektanten könnte auf einer Konformationsänderung durch das Flag-Epitop, das allerdings an das zytoplasmatische Ende angefügt ist, oder auf der geringeren Expressionsstärke von HLA-G2 beruhen, die in der intrazellulären Färbung mit dem mAk HCA2 und in der Westernblot-Analyse zutage tritt (Abb. 5.5 und 5.2). Der Ak HCA2 erkennt ein Epitop, das die Aminosäuren 78-83 der α 1-Domäne von HLA-G umfaßt, und damit in allen HLA-G-Isoformen enthalten ist (Sernee *et al.* 1998, Seitz *et al.* 1998). Dementsprechend konnte die intrazelluläre Expression der HLA-G-Isoformen mit diesem Ak nachgewiesen werden (Abb. 5.5). Der HLA-G-spezifische mAk 4H84 wurde gegen ein Peptid aus den Aminosäuren 61-83 generiert, das damit mit dem Epitop von HCA2 überlappt. Der Ak 4H84 erkennt alle HLA-G-Isoformen im Westernblot (McMaster *et al.* 1998, Abb. 5.2). Erstaunlicherweise ließ sich mit dem mAk 4H84 im Gegensatz zu dem mAk HCA2 in der Zelllinie K-562 mittels FACS-Analyse intrazellulär nur HLA-G1 nachweisen. Während die mAk HCA2, 4H84 und MEM-G/9 in etwa gleich gut HLA-G1 banden, war die Reaktivität von 4H84 und MEM-G/9 mit den verkürzten Isoformen deutlich geringer als die von HCA2 (Abb. 5.5). In der Zelllinie K-562 ist die Expression der HLA-G-Isoformen möglicherweise für einen Nachweis im FACS zu niedrig. Zieht man die Färbung mit HCA2 oder die EGFP-Expression als Maß für die Expressionsstärke heran, so exprimieren die K-562-Transfektanten der Isoformen weniger HLA-G als die K-562 HLA-G1-Transfektanten, die auf hohe HLA-G-Expression sortiert werden konnten. Daß die Stärke der EGFP-Expression als Indiz für die Menge an HLA-G dienen kann, verdeutlicht der Vergleich der HLA-G2 Pool B- mit den HLA-G1-Transfektanten in Abb. 5.5. Die Intensität der Färbung mit dem Ak HCA2 korreliert jeweils mit der Fluoreszenzintensität durch EGFP. Allerdings spiegeln sich die zweigipfeligen Kurven bei der Färbung mit HCA2 nicht in der EGFP-Expression wider. Insgesamt ergeben sich aus der FACS-Analyse keine Hinweise, daß die verkürzten HLA-G-Isoformen auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Tab. 5.2). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß sie eine Konformation einnehmen, die von den zur Verfügung stehenden Ak nicht erkannt wird, oder die Menge für die Detektion mittels FACS-Analyse zu gering ist.

Von HLA-E ist bekannt, daß die Zelloberflächenexpression durch Inkubation bei niedrigen Temperaturen (26°C), Zugabe von humanem β 2m oder exogenen Peptiden stabilisiert wird, gemessen als Expressionszunahme (Ulbrecht *et al.* 1992 a und b). Daher wurde untersucht, ob eine Stabilisierung von HLA-G-Antigenen unter entsprechenden Bedingungen möglich ist, die dann einen Nachweis der verkürzten Isoformen auf der Zelloberfläche erlaubt. Dazu wurden Zellen über Nacht bei 26°C mit oder ohne Zugabe von β 2m oder H2A-Peptid, welches als Peptidligand für HLA-G identifiziert wurde, inkubiert (Abschnitt 4.3.3). Anschließend wurden FACS-Analysen unter Verwendung verschiedener HLA-I- und HLA-G-spezifischer Ak durchgeführt (Abschnitt 4.3.5). Inkubation der K-562 HLA-G1 bei 26°C hatte keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die Bindung der Ak W6/32 (Abb. 5.7), BBM.1, MEM-G/1, 87G, Ab704, Kaninchen-Antiserum gegen HLA-G und 4H84. Auch bei den HLA-G2- und HLA-G4-Transfektanten ließen sich mit den Ak W6/32, 4H84 oder MEM-G/1 keine HLA-G-Antigene durch Inkubation bei 26°C auf der Zelloberfläche anfärben. Im Gegensatz zu den K-562 HLA-G2- und HLA-G4-Transfektanten war jedoch bei den HLA-G1-

Transfektanten bei 26°C gegenüber 37°C eine Hochregulation des HCA2-Epitops erkennbar. Die Stabilisierung des HCA2-Epitops zeigte sich sowohl in der Zelloberflächenfärbung als auch in der intrazellulären Färbung (Abb. 5.6).

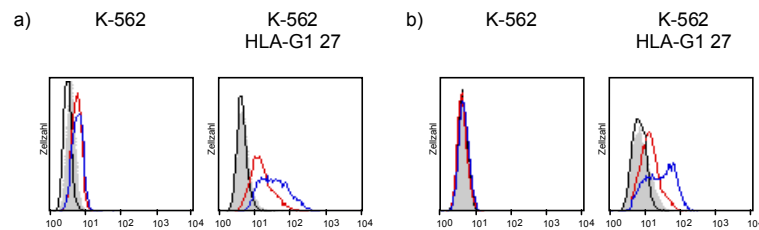


Abb. 5.6: Stabilisierung des HCA2-Epitops in K-562-Transfektanten nach Inkubation bei 26°C

Je 2×10^5 untransfizierte K-562 oder K-562 HLA-G1 27 wurden bei 37°C bzw. 26°C für 23 h inkubiert und anschließend einer intrazellulären (a) bzw. Zelloberflächenfärbung (b) mit den Ak HCA2 (rote Linie bei 37°C bzw. blaue Linie bei 26°C) unterzogen. Die Negativkontrollen wurden jeweils nur mit dem PE-gekoppelten F(ab')₂-Fragment gefärbt (schwarze Linie bei 37°C und ausgefüllte Kurve bei 26°C). Die x-Achse gibt die Intensität der Fluoreszenz 2 und die y-Achse die Zellzahl an.

Nach Inkubation für 1-6 h bei 26°C war eine schwache, nach Inkubation über Nacht bei 26°C ein deutlich gesteigerte Expression des Epitops für HCA2 nachweisbar. Daß es sich um keinen durch HLA-E vermittelten Effekt handelte, wird durch die negative Färbung mit dem Ak A1.4, der HLA-I aber kein HLA-G erkennt, verdeutlicht (Abb. 5.7).

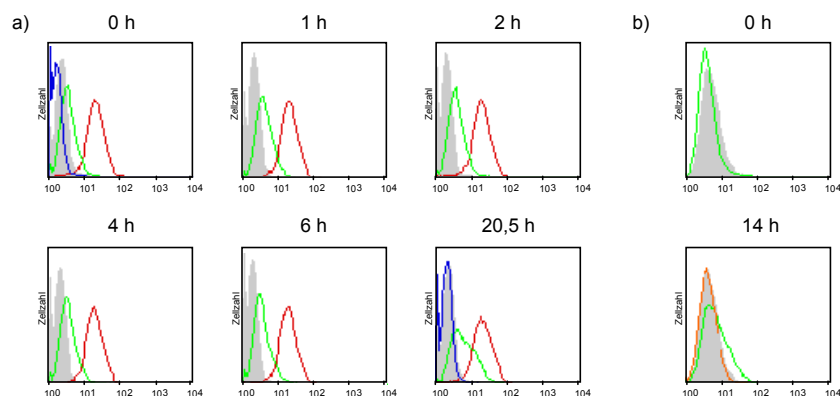


Abb. 5.7: Mit der Inkubationsdauer bei 26°C zunehmende Stabilisierung des HCA2-Epitops in K-562-Transfektanten

a) Je 2×10^5 K-562 HLA-G1 27 wurden bei 37°C (entspricht 0 h bei 26°C) bzw. für 1 h, 2 h, 4 h, 6 h oder 20,5 h bei 26°C in HEPES-gepuffertem Medium inkubiert und anschließend mit den mAk W6/32 (rote Linie), HCA2 (grüne Linie) und A1.4 (blaue Linie) gefärbt. b) Die K-562 HLA-G1 27 Transfektante wurde mit (orange Linie) oder ohne Brefeldin A (grüne Linie) für 14 h bei 26°C inkubiert und anschließend mit dem mAk HCA2 gefärbt. Als Negativkontrolle diente jeweils die Färbung nur mit dem PE-gekoppelten F(ab')₂-Fragment (ausgefüllte Kurve). Die x-Achse gibt die Fluoreszenzintensität und die y-Achse die Zellzahl an.

Für eine HLA-E-Proteinexpression in der Zelllinie K-562 konnte mit den mAk A1.4 weder auf der Zelloberfläche noch intrazellulär ein Nachweis erbracht werden. Eine Steigerung der HCA2-Bindung mit zunehmender Dauer der Inkubation bei 26°C spricht für eine kontinuierliche Stabilisierung von HLA-G-schweren Ketten über einen längeren Zeitraum und nicht für eine ausschließliche Stabilisierung der bereits an der Zelloberfläche vorhandenen HLA-G-Komplexe. Dies wird auch durch die Aufhebung der verstärkten Bindung von HCA2 nach Inkubation bei 26°C durch Behandlung der Zellen mit Brefeldin A bestätigt (Abschnitt 4.3.4).

Brefeldin A hemmt den anterograden Transport vom ER in den Golgi-Apparat und zur Plasmamembran und ruft eine Umordnung der intrazellulären Membranstrukturen hervor. Ein kontinuierlicher Transport von HLA-G an die Zelloberfläche ist für die Expression des HCA2-Epitops nötig.

Um zu kontrollieren, ob die HLA-G1-schwere Kette mit $\beta 2m$ und Peptid assoziiert an der Zelloberfläche vorliegt, wurde die K-562 HLA-G1-Transfektante mit $\beta 2m$ oder H2A-Peptid inkubiert. Auf die Bindung der Ak W6/32, 87G, 4H84, HCA2 und Ab704 war kein Einfluß festzustellen (nicht gezeigt). Zugabe von $\beta 2m$ und H2A-Peptid wirkten sich ebenfalls nicht auf die Zelloberflächenexpression von HLA-I-Antigenen der .221 HLA-G1-Transfektante oder der Zelllinie JEG-3 aus. Eine Zunahme der Oberflächenexpression von HLA-G wurde bei Färbung mit einem $\beta 2m$ -spezifischen mAk oder mit Ak, die den Komplex aus schwerer MHC-I-Kette und $\beta 2m$ erkennen, nicht beobachtet. Daher kann geschlossen werden, daß nur das HLA-G1-Polypeptid verstärkt auf der Oberfläche präsent ist. Ob dies lediglich auf einen durch Brefeldin A hemmbaren verstärkten Oberflächentransport der freien α -Kette zurückzuführen ist oder auch auf einen verminderten Turnover dieser Moleküle auf der Zelloberfläche ist unklar. Jedoch zeigt dieses Experiment, daß freie HLA-G1-Polypeptide auf der Zelloberfläche vorhanden sein können.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob auch die verkürzten Isoformen in Assoziation mit $\beta 2m$ und Peptid vorliegen. Da HLA-G2 und HLA-G4 sich nach Inkubation der Transfektanten mit $\beta 2m$ bei 26°C mit den mAk W6/32, 4H84, MEM-G/1 und HCA2 nicht auf der Zelloberfläche nachweisen ließen (nicht gezeigt), wurde an diese Fragestellung mittels Immunpräzipitation herangegangen.

5.1.2 Assoziation der HLA-G-Isoformen mit $\beta 2m$ und TAP

$\beta 2m$ und ein gebundenes Peptid sind wichtige Bestandteile der MHC-I-Komplexe. Klasse-I-schwere Ketten ohne gebundenes Peptid oder $\beta 2m$ sind bis auf wenige Ausnahmen instabil und werden abgebaut. In Zellen mit fehlendem oder mutiertem $\beta 2m$ -Gen ist die Assoziation mit dem Chaperon Calretikulin und daraus folgend auch mit dem Peptidladekomplex gestört. Dieser Ladekomplex enthält unter anderem auch das TAP-Dimer, das für den Transport von Peptiden ins ER zuständig ist (Abb. 1.2). Entsprechend werden in TAP-negativen Zellen oder Zellen, in denen die Peptidbildung oder der TAP-Transport inhibiert ist, auch Dimere aus schweren Ketten und $\beta 2m$ schlecht auf der Zelloberfläche exprimiert. Die Assoziation der schweren Ketten von HLA-G mit TAP und $\beta 2m$ kann so einen Hinweis auf ihre korrekte Faltung, die Beladung mit Peptid und die mögliche Zelloberflächenexpression der HLA-G-Isoformen liefern.

5.1.2.1 Assoziation der HLA-G-Isoformen mit β 2m

Um zu untersuchen, ob die HLA-G-Isoformen mit β 2m assoziiert sind, wurden K-562 HLA-G1-, HLA-G2 3'Flag-, HLA-G4- und HLA-G5-Transfektanten mit Digitonin-haltigem Lysepuffer lysiert (Abschnitt 4.4.4). Die HLA-G2 3'Flag-Transfektante wurde für die Untersuchung der HLA-G2-Isoform eingesetzt, da diese im Lysat mehr HLA-G2-Polypeptide aufwies als die HLA-G2-Transfektante. Da die Menge des sezernierten HLA-G5 in Lysaten der K-562-Transfektante gering war, wurde zur Untersuchung der Assoziation dieser Isoform mit β 2m auch die HLA-G5-Transfektante in der Zelllinie HeLa mit herangezogen.

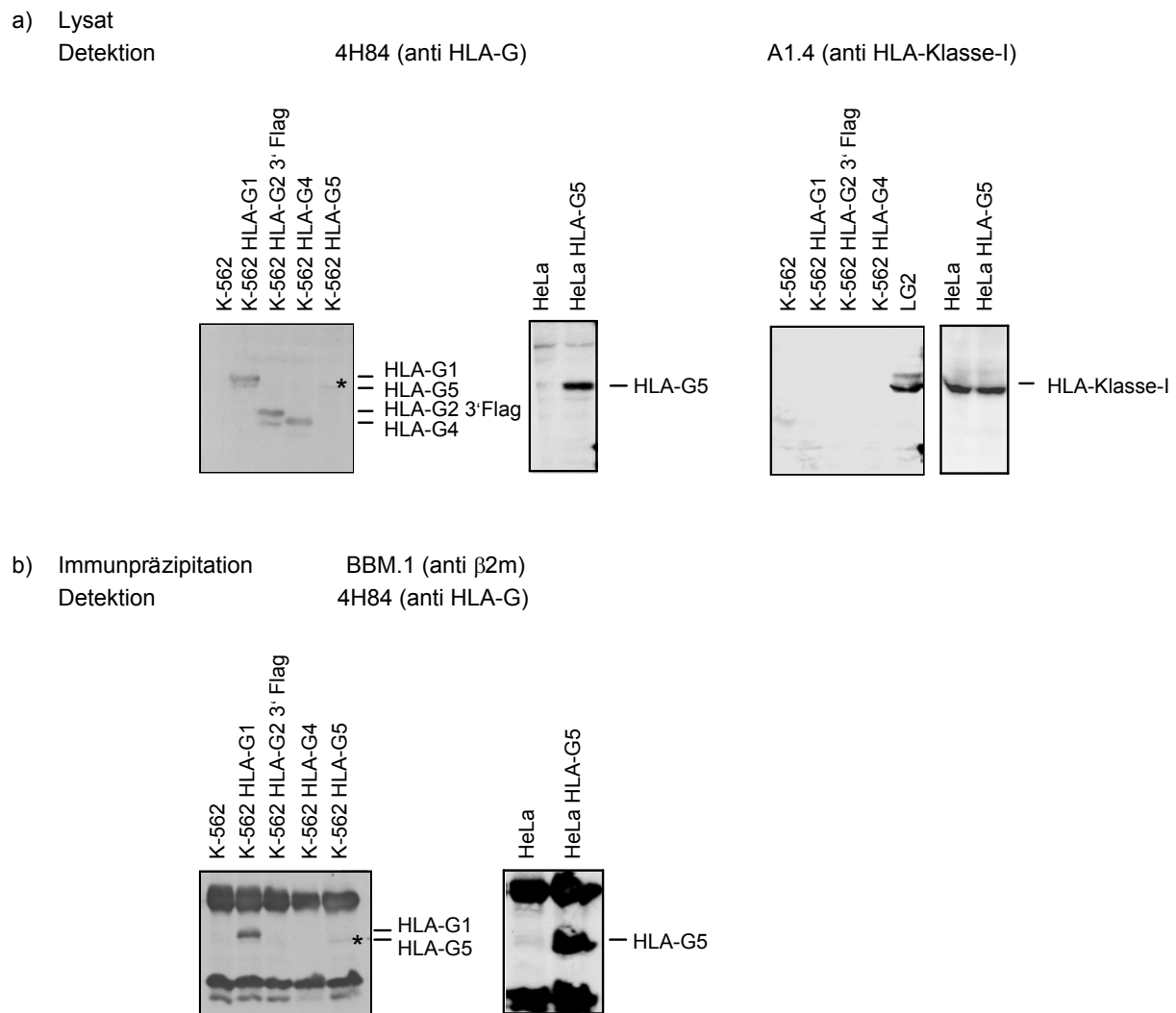


Abb. 5.8: Kopräzipitation der HLA-G-Isoformen mit β 2m

Untransfizierte K-562, K-562 HLA-G1-, HLA-G2 3'Flag-, HLA-G4- und HLA-G5-Transfektanten, sowie untransfizierte HeLa und HeLa HLA-G5-Transfektanten wurden einer Digitoninlyse unterzogen. Die Lysate wurden direkt oder nach Immunpräzipitation auf 10 %igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen übertragen und HLA-I-Antigene mit dem ECL-Kit nachgewiesen. a) Lysate von je 1×10^6 Zellen wurden zum Nachweis von HLA-G mit dem mAk 4H84 bzw. zum Nachweis von HLA-I-Antigenen mit dem mAk A1.4, der kein HLA-G erkennt, gefärbt. Als Positivkontrolle für HLA-I-Antigene wurde Lysat der Zelllinie LG2 mit aufgetragen. b) Mit Digitoninlysaten von je 1×10^7 Zellen wurde eine Immunpräzipitation mit dem β 2m-spezifischen mAk BBM.1 durchgeführt. Der Nachweis von HLA-G in den Präzipitaten erfolgte mit dem HLA-G-spezifischen mAk 4H84. Die HLA-G5-Bande in Lysaten der K-562 HLA-G5-Transfektante ist jeweils mit einem * gekennzeichnet.

Die Lysate wurden einer Immunpräzipitation mit dem β 2m-spezifischen mAk BBM.1 unterzogen und die Immunpräzipitate im Westernblot auf Kopräzipitation der HLA-G-Isoformen untersucht. Als Kontrolle, daß kein Präzipitat verlorengegangen war, diente die Stärke der Banden der IgH- und IgL-Ketten des zur Immunpräzipitation eingesetzten Ak BBM.1. Die HLA-G-Isoformen HLA-G1, HLA-G2 3'Flag, HLA-G4 und HLA-G5 konnten im Zellysat mit dem HLA-G-spezifischen mAk 4H84 nachgewiesen werden (Abb. 5.8 a). Bei den jeweils zusätzlich auftretenden, schneller laufenden Banden, handelt es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte. In der Zelllinie K-562 wurden wie erwartet im Gegensatz zu den Positivkontrollen LG2 oder HeLa mit dem HLA-I-spezifischen mAk A1.4 keine endogenen HLA-I-Polypeptide nachgewiesen (Abb. 5.8 a).

In Immunpräzipitaten mit dem β 2m-spezifischen mAk BBM.1 wurden nur die Isoformen HLA-G1 und HLA-G5 kopräzipitiert. HLA-G4 und HLA-G2 3'Flag hingegen konnten mit dem mAk 4H84 nicht nachgewiesen werden (Abb. 5.8 b). Während die HLA-G1 und HLA-G5 α -Ketten mit β 2m assoziiert sind, liegen HLA-G2 und HLA-G4 nicht in Komplexen mit β 2m vor.

5.1.2.2 Assoziation der HLA-G-Isoformen mit TAP

Um die Assoziation der HLA-G-Isoformen mit TAP zu untersuchen, wurden die K-562 HLA-G-Transfektanten mit Digitonin-haltigem Lysepuffer, in dem TAP/Tapasin-Klasse-I-Interaktionen aufrecht erhalten werden, lysiert (Abschnitt 4.4.4). Aus den Lysaten wurde TAP mit dem TAP.1-spezifischen Ak 148.3 präzipitiert. Die erhaltenen Immunpräzipitate wurden im Westernblot auf Kopräzipitation der HLA-G-Isoformen untersucht. Als Kontrolle, daß kein Präzipitat verlorengegangen war, diente wiederum die Stärke der Banden der IgH- und IgL-Ketten des Ak 148.3. Es lassen sich nur die HLA-G-Isoformen HLA-G1 und HLA-G2 3'Flag mit TAP kopräzipitieren. HLA-G5 und HLA-G4 waren in diesen Immunpräzipitaten nicht nachweisbar (Abb. 5.9).

Während HLA-G1, HLA-G2 3'Flag und HLA-G4 im Lysat der K-562-Transfektanten in gleichem Ausmaß nachgewiesen wurden, war die HLA-G5-Menge deutlich geringer, da dieses Molekül effizient sezerniert wird (Abb. 5.8 a). Die Signalstärke, die nach Immunpräzipitation mit dem TAP-spezifischen mAk und Detektion mit dem HLA-G-spezifischen mAk 4H84 erreicht wurde, war sehr gering. Um auszuschließen, daß der fehlende Nachweis der Assoziation von HLA-G5 mit TAP auf der geringen zellulären Konzentration von HLA-G5 beruht, wurden auch HLA-G5-Transfektanten in der HLA-Klasse-I-positiven Zervixkarzinomzelllinie HeLa hergestellt. In dieser Zelllinie wurde eine höhere HLA-G5-Proteinsekretion erreicht als in K-562. Allerdings konnte auch in der HeLa HLA-G5-Transfektante keine Assoziation von HLA-G5 mit TAP nachgewiesen werden (Abb. 5.9).

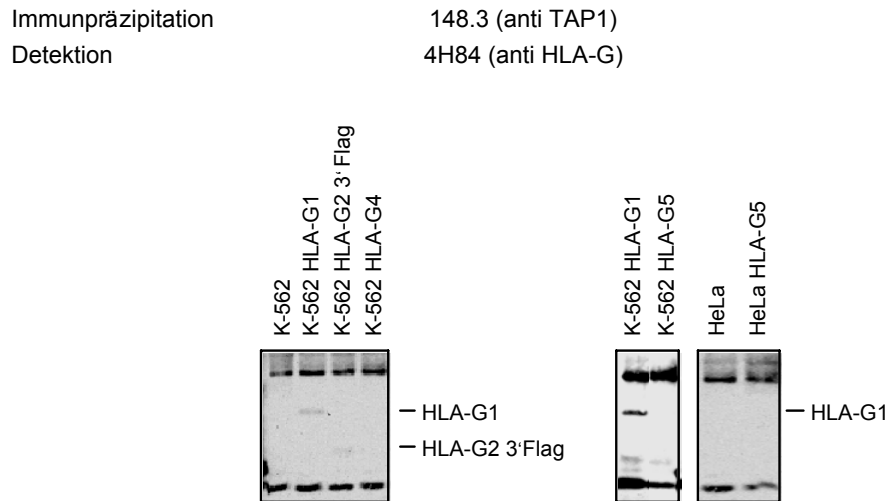


Abb. 5.9: Kopräzipitation der HLA-G-Isoformen mit TAP

Mit Digitoninlysaten von je 1×10^7 untransfizierten K-562, K-562 HLA-G1-, HLA-G2 3'Flag-, HLA-G4- und HLA-G5-Transfektanten und von HeLa und HeLa HLA-G5 (siehe Abb. 5.8 a) wurde eine Immunpräzipitation mit dem TAP1-spezifischen mAk 148.3 durchgeführt. Die Präzipitate wurden auf 10 %igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Der Nachweis von HLA-G in den Präzipitaten erfolgte mit dem HLA-G-spezifischen mAk 4H84.

Nur HLA-G1 ließ sich mit $\beta 2m$ und TAP kopräzipitieren. HLA-G5 war zwar mit $\beta 2m$ jedoch nicht mit TAP assoziiert. Im Gegensatz dazu ließ sich HLA-G2 mit TAP aber nicht mit $\beta 2m$ kopräzipitieren und ein Nachweis von HLA-G4 gelang weder in Assoziation mit $\beta 2m$ noch mit TAP.

5.1.3 Fehlende funktionelle Expression der verkürzten HLA-G-Isoformen in der HLA-I-negativen Zelllinie K-562

Die Expression von HLA-G kann direkt oder indirekt über HLA-E auf die Zytotoxizität von NK-Zellen und T-Zellen einwirken. Zum funktionellen Nachweis von HLA-G wurden Zytotoxizitätstests mit der Zelllinie NKL, PBL, NK-Zellen und LAK-Zellen aus dem peripheren Blut mehrerer Donoren durchgeführt.

Um die funktionelle Zelloberflächenexpression der HLA-G-Isoformen zu untersuchen, wurde die NK-Zelllinie NKL ausgewählt. Sie stammt von einem Patienten mit $CD3^+$, $CD56^+$ LGL (large granular lymphocyte) Leukämie ab und besitzt zytotoxische Aktivität (Robertson *et al.* 1996). Diese Zelllinie exprimiert eine Vielzahl von Rezeptoren, unter anderem die inhibitorischen Rezeptoren ILT2 und CD94/NKG2A, über die HLA-G direkt oder indirekt die Effektorfunktionen beeinflussen kann (siehe Abschnitt 1.2.1). Die Expression dieser beiden Rezeptoren, die mit HLA-G bzw. HLA-E in Wechselwirkung treten, wurde in der FACS-Analyse kontrolliert. Das Signal mit dem ILT2-spezifischen Ak war jeweils stärker als das mit dem CD94-spezifischen Ak (Abb. 5.12 a und 5.22 c).

Die spezifische Lyse von K-562 HLA-G-Transfektanten wurde mittels Europiumtest ermittelt (siehe 4.5.1). Während die als Kontrolle mitgeführte funktionelle HLA-E exprimierenden K-562-Transfektanten vor Lyse geschützt waren, wurden die K-562 HLA-G-Transfektanten in

den meisten Fällen lysiert (Abb. 5.10 a). Auch in den Ansätzen, bei denen eine deutliche Inhibition der Lyse durch die Expression von HLA-G1 auftrat, wirkte sich die Expression der verkürzten Isoformen HLA-G2-, HLA-G2 3'Flag- und HLA-G4 nicht schützend aus (Abb. 5.10 b).

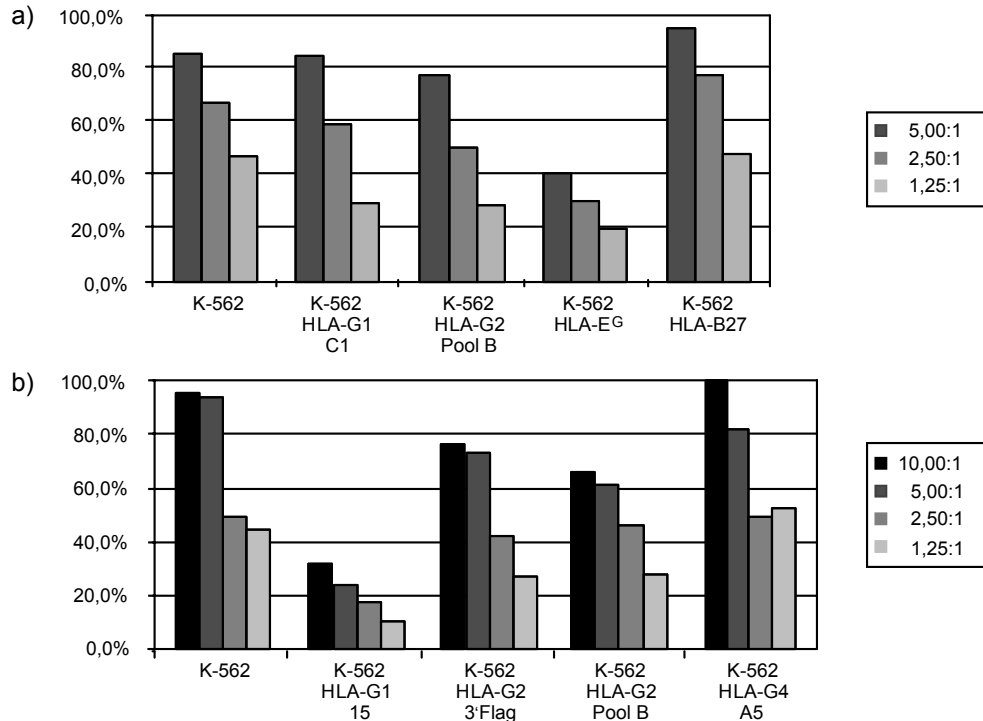


Abb. 5.10: Lyse der K-562 HLA-G-Transfektanten durch die Zelllinie NKL

Untransfizierte K-562, K-562 HLA-G1 C1, K-562 HLA-G2 Pool B, K-562 HLA-E^G sigA2 D3.4 und K-562 HLA-B27 (a) bzw. K-562, K-562 HLA-G1 15, K-562 HLA-G2 3'Flag, K-562 HLA-G2 Pool B und K-562 HLA-G4 A5 (b) wurden mit BATDA markiert und mit NKL in den Effektor zu Targetverhältnissen von 5:1, 2,5:1 und 1,25:1 (a) bzw. 10:1, 5:1, 2,5:1 und 1,25:1 (b) für 2 h kokultiviert. Die spezifische Lyse in Prozent wurde anhand der TDA-Freisetzung und Komplexbildung mit Europium ermittelt.

Bei den verschiedenen getesteten HLA-G1-Klonen trat eine Inhibition der Lyse durch die Zelllinie NKL in vereinzelt Experimenten auf, während sie für die Transfektante HLA-G1 15 reproduzierbar war. Da die Wirkung auf die NKL-Zytotoxizität von der Menge der HLA-I-Antigene abhängt, wurde die Oberflächenexpression von HLA-G in den K-562-Transfektanten durch FACS-Färbung kontrolliert. Abgesehen von der K-562 HLA-G2 3'Flag-Transfektante ist die Expression der verkürzten HLA-G-Isoformen geringer als die von HLA-G1 15, wie die Färbung mit dem mAk HCA2 zeigt (Abb. 5.5). Ein Vergleich der HLA-G1-Expression von K-562 HLA-G1 15 mit den Klonen K-562 HLA-G1 C1 und B3 ergibt, daß der Klon HLA-G1 15 eine deutlich stärkere Expression aufweist (Abb. 5.11).

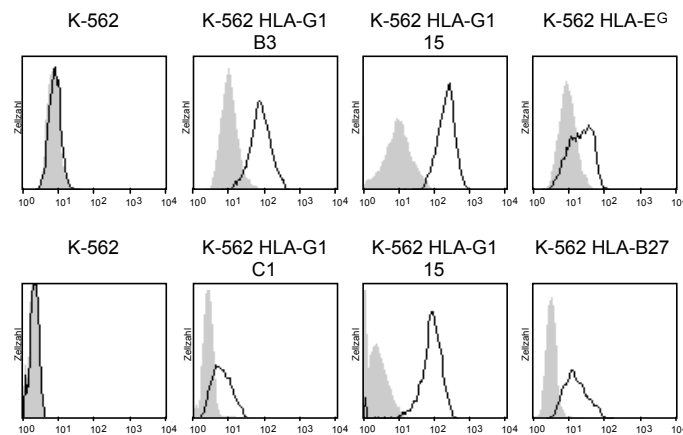


Abb. 5.11: Vergleich der Zelloberflächenexpression der K-562-Transfektante HLA-G1 15 mit K-562 HLA-G1 B3, HLA-G1 C1, HLA-E^G und HLA-B27

Untransfizierte K-562, K-562 HLA-G1 B3, K-562 HLA-G1 15 und K-562 HLA-E^G sigA2 D3.4 bzw. K-562, K-562 HLA-G1 C1, K-562 HLA-G1 15 und K-562 HLA-B27 wurden mit dem mAk W6/32 und einem PE-gekoppelten F(ab')₂-Fragment gefärbt (Linie). Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne Inkubation mit dem 1. Ak mitgeführt (schattiert dargestellt). Oben und unten sind Ergebnisse von zwei unabhängigen Durchflußzytometriemessungen dargestellt. Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz 2 aufgetragen, auf der y-Achse die relative Zellzahl.

Bei Transfektanten, die mit dem pIRES2-EGFP-Vektor hergestellt worden waren, wurde außerdem die EGFP-Expression als indirektes Maß für die Stärke der HLA-G-Expression herangezogen. Die EGFP-Expression von K-562 HLA-G1 15 und K-562 HLA-G2 Pool B verdeutlicht die höhere HLA-G Expression in der HLA-G1-Transfektante (Abb. 5.5). Auch die HLA-B27-Transfektante in der Zelllinie K-562, die als Kontrolle für die durch ILT2-vermittelte Inhibition der Lyse dienen sollte, war in den meisten Experimenten nicht vor Lyse geschützt (Abb. 5.10 a). Dies zeigt, daß nur ein geringer Anteil von HLA-G1- und auch von HLA-B27-Molekülen in einer Konformation vorliegt, in der sie die Zytotoxizität über ILT2 hemmen können oder daß für ein inhibitorisches Signal viele ILT2-Rezeptoren besetzt sein müssen.

Weiterhin wurde der Einfluß von löslichen HLA-Molekülen der Klasse I auf NKL und NK-Zellen untersucht. Neben der sezernierten Isoform HLA-G5 wurde auch lösliches HLA-B27 eingesetzt, da beide ILT2 binden. HLA-B27 wird natürlicherweise nicht aktiv sezerniert. Es wurde ein rekombinantes HLA-B27-Hybrid verwendet, das nach Exon 4 ($\alpha 3$) die 3'-terminale Sequenz des sezernierten Maus-Klasse-I-Moleküls Q10 trägt. Präinkubation von NKL mit HLA-G5- oder HLA-B27Q10-Überständen oder mit aus HeLa HLA-G5-Überständen aufgereinigtem HLA-G5 inhibierte ihre Zytotoxizität gegenüber K-562 nicht. Dabei spielte es keine Rolle, ob die HLA-G5- und B27Q10-Antigene in löslicher oder über die mAk BBM.1, W6/32 oder 16G1 gebunden in adhärenter, multivalenter Form vorlagen (nicht gezeigt, Abschnitte 4.4.8, 4.5.1).

Da nur in Ausnahmefällen ein Einfluß der HLA-G-Expression in der Zelllinie K-562 auf die Zytotoxizität der Zelllinie NKL festzustellen war, wurden als nächstes NK-Zellen aus dem Blut verschiedener Spender auf ihre zytotoxische Aktivität gegenüber K-562 HLA-G-Transfektanten getestet. Die NK-Zellen wurden mit MACS CD56 MicroBeads positiv selektiert. Um eine Aktivierung der NK-Zellen durch die Bindung der Ak bei der positiven Selektion zu

verhindern, wurden NK-Zellen auch durch negative Selektion mittels MACS NK Cell Isolation Kit bzw. des Rosette SepTM human NK enrichment cocktails angereichert (Abschnitt 4.3.6).

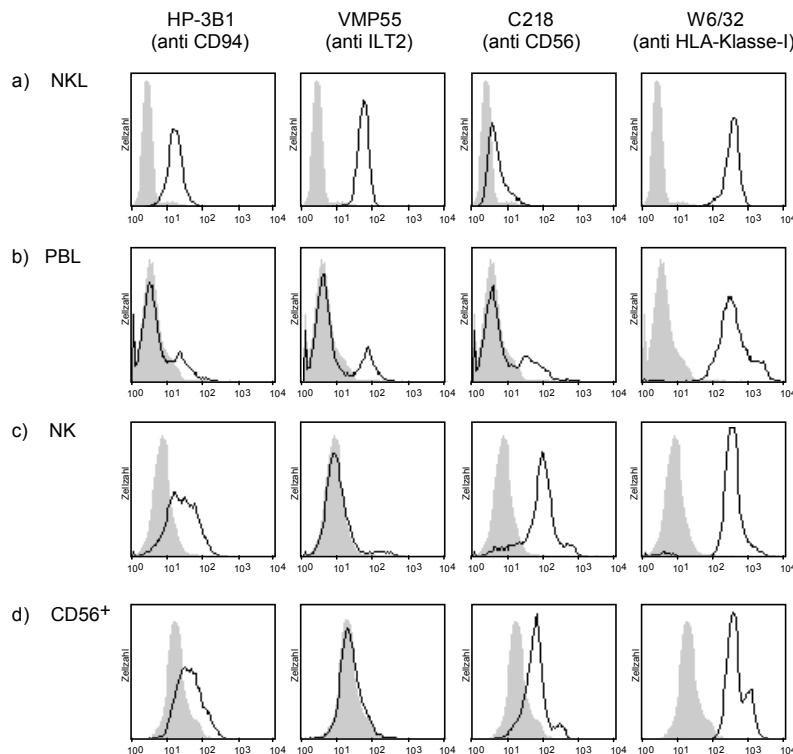


Abb. 5.12: Kontrolle der Aufreinigung von NK-Zellen aus PBL und der Expression von CD94 und ILT2

Je 2×10^5 NKL (a) bzw. PBL (b) und aus diesen PBL negativ (c) bzw. positiv (d) isolierte NK-Zellen wurden mit den mAk W6/32 (anti HLA-Klasse-I), HP-3B1(anti CD94), VMP55 (anti ILT2) und C218 (anti CD56) gefärbt (durchgezogene Linie). Als sekundäres Reagenz wurde ein PE-gekoppeltes F(ab')₂-Fragment eingesetzt. Die Inkubation ohne 1. Ak diente als Negativkontrolle (schattiert dargestellt). Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz 2 angegeben.

Die erfolgreiche Aufreinigung von NK-Zellen wurde anhand des NK-Zellmarkers CD56 im FACS überprüft (Abb. 5.12 c und d, Abb. 5.14). Die angereicherten Zellen waren alle in der CD56-Färbung positiv, wobei jeweils eine Subpopulation mit höherer CD56-Expression zu sehen war. Diese trat in der Färbung der PBL aufgrund des relativ geringeren Anteils an den gefärbten Zellen nicht zu Tage. Es handelt sich dabei um die CD56^{bright} NK-Zellen, die ca. 10 % der NK-Zellen aus dem peripheren Blut ausmachen. Die mit unterschiedlichen Methoden isolierten NK-Zellen variierten allerdings auch in der Färbung mit dem HLA-I-spezifischen mAk W6/32. Bei den positiv isolierten NK-Zellen traten hier ebenfalls zwei Subpopulationen auf. Außerdem wurde die Expression der Rezeptoren CD94 und ILT2 kontrolliert. Während jeweils ein Teil der PBL für CD94 bzw. ILT2 positiv waren, reagierten die isolierten NK-Zellen je nach Spender in unterschiedlichen Anteilen mit den CD94- und ILT2-spezifischen Ak (Abb. 5.12 und 5.14). Der Anteil von ILT2-positiven NK-Zellen variiert von 5-85 % (Vitale *et al.* 1999). Die erhöhte Fluoreszenz der Negativkontrolle bei den auf CD56-Expression positiv selektierten NK-Zellen beruht auf der Bindung des 2. Ak bei der FACS-Färbung an die zur Selektion eingesetzten Ak-Beads (Abb. 5.12 d). Die im FACS gegenüber den negativ selektierten NK-Zellen fehlende ILT2-positive Subpopulation kann mit der erhöhten Hintergrundfärbung erklärt werden (vgl. Abb. 5.12 c und d). Da HLA-G

neben ILT2 mit mehreren weiteren NK-inhibitorischen Rezeptoren reagiert, wurden alle NK-Zellpräparate verwendet. Die NK-Zellen wurden direkt im Anschluß an die Aufreinigung als Effektorzellen in den Zytotoxizitätstest eingesetzt. Die positive Selektion der NK-Zellen rief keine unspezifische Aktivierung der Zytotoxizität hervor. Die spezifische Lyse durch die negativ und positiv selektionierten NK-Zellen bewegte sich in der gleichen Größenordnung. In beiden Fällen war keine deutliche Inhibition der Lyse von K-562 HLA-G-Transfektanten nachweisbar, während K-562-Zellen durch HLA-E-Expression geschützt waren (Abb. 5.13).

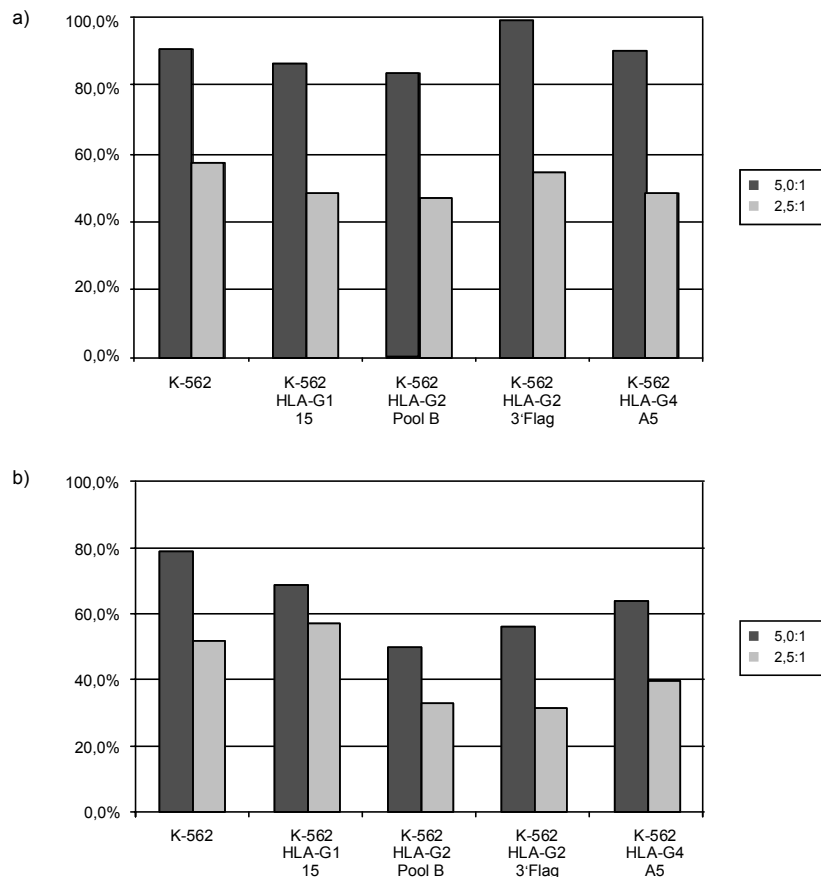


Abb. 5.13: Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber K-562 HLA-G-Transfektanten

Untransfizierte K-562, K-562 HLA-G1 15, K-562 HLA-G2 Pool B, K-562 HLA-G2 3'Flag und K-562 HLA-G4 A5 wurden mit BATDA markiert und mit negativ (a) bzw. positiv (b) isolierten CD56⁺ NK-Zellen (siehe Abb. 5.12) in den angegebenen Effektor zu Targetverhältnissen für 2 h koinkubiert. Die spezifische Lyse in Prozent wurde anhand der TDA-Freisetzung und Komplexbildung mit Europium durch Time resolved Fluorometrie ermittelt.

In den meisten Fällen waren die NK-Zellen negativ für den ILT2-Rezeptor, jedoch ließ sich auch keine Inhibition der Lyse feststellen, wenn ILT2-positive NK-Zellen eingesetzt wurden (Abb. 5.14). Dies bestätigt den Befund mit der NKL-Zelllinie, daß HLA-G über ILT2 die zytotoxische Funktion nicht sehr effizient hemmt. Auch die Lyse von K-562 durch PBL oder LAK-Zellen ließ sich durch die Expression von HLA-G1 nicht reduzieren (nicht gezeigt).

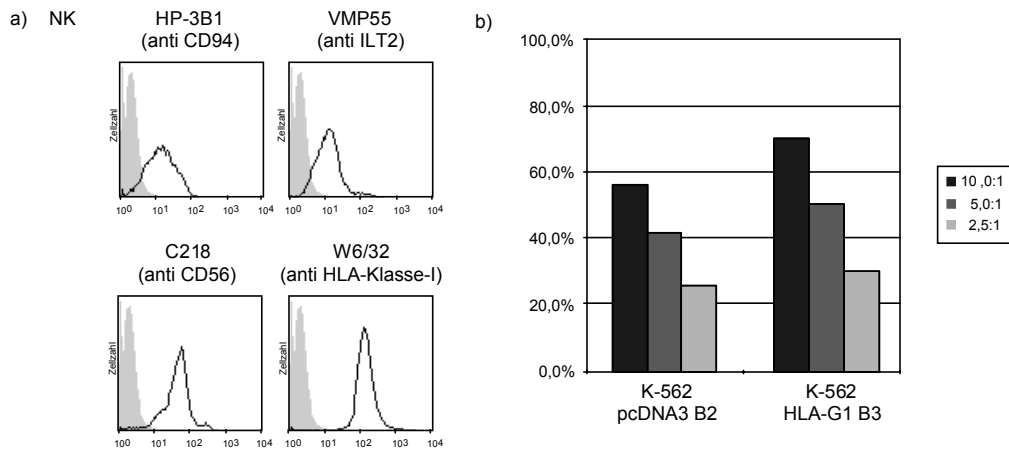


Abb. 5.14: Keine Inhibition der Zytotoxizität von ILT2⁺/CD94⁺ NK-Zellen gegenüber HLA-G1 exprimierenden K-562

a) NK-Zellen wurden durch negative Selektion von PBL angereichert und mit den mAk W6/32 (anti HLA-Klasse-I), HP-3B1(anti CD94), VMP55 (anti ILT2) und C218 (anti CD56) gefärbt (durchgezogene Linien). Als sekundäres Reagenz wurde ein PE-gekoppeltes F(ab')₂-Fragment eingesetzt. Die Inkubation ohne 1. Ak diente als Negativkontrolle (schattiert dargestellt). Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz 2 angegeben. b) K-562 pcDNA3 B2 und K-562 HLA-G1 B3 wurden mit BATDA markiert und mit negativ isolierten NK-Zellen in den angegebenen Effektor zu Targetverhältnissen für 2 h kokubiert. Die spezifische Lyse, angegeben in Prozent, wurde anhand der TDA-Freisetzung und Komplexbildung mit Europium ermittelt.

Eine starke Expression von HLA-G1 in der Zelllinie K-562 wirkte sich inhibierend auf die Lyse durch die Zelllinie NKL aus, während die Expression der verkürzten Isoformen keinen Schutz vor Lyse bot (Abb. 5.10). Die HLA-G-Isoformen besaßen auch keine inhibitorische Wirkung auf die Lyse durch PBL, NK- oder LAK-Zellen (Abb. 5.13 und 5.14).

5.2 Expression von HLA-G1 in Abwesenheit von β 2m in der Zelllinie Daudi

Die MHC-I-Expression von Tumorzellen ist häufig herunterreguliert, z. B. durch fehlende TAP-Expression, Mutationen in bestimmten HLA-I-Allelen, Haplotyp-Verlust oder Methylierung. Auch der Verlust der β 2m-Expression oder die Synthese eines verkürzten β 2m-Proteins können die Ursache einer fehlenden Zelloberflächenexpression der MHC-I-Antigene sein. Solche Veränderungen im β 2m-Gen wurden z.B. für Melanome, kolorektale Tumoren, Brustkrebs und Lymphome beschrieben (Bicknell *et al.* 1994, Hicklin *et al.* 1998, Ogretmen *et al.* 1998, Restifo *et al.* 1996). Der Vorteil für Tumorzellen weniger leicht durch T-Zellen als entartet erkannt zu werden wird jedoch mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber der Lyse durch NK-Zellen erkauft. Auf einigen Tumorzellen, u.a. auch in den oben genannten Tumoren aus Geweben, von denen der β 2m-Verlust als mögliche Ursache für die herunterregulierte HLA-I-Expression bekannt ist, konnte HLA-G-Expression nachgewiesen werden (Cabestre *et al.* 1999, Drénou *et al.* 2002, Fukushima *et al.* 1998, Lefebvre *et al.* 2002, Paul *et al.* 1999, Urosevic *et al.* 2002, Wagner *et al.* 2000). Da HLA-G mit inhibitorischen Rezeptoren auf NK-Zellen, CTL und Monozyten interagieren kann, lag die Vermutung nahe, daß zumindest einige Tumorzellen sich mittels Hochregulation der HLA-G-Expression vor Angriff durch diese Effektorzellen schützen. FACS-Analysen der K-562 HLA-G-Transfektanten mit dem Ak HCA2 hatten ergeben, daß ein Teil der HLA-G1-Antigene auf der

Zelloberfläche als freie schwere Ketten vorliegen können (siehe 5.1.1). Von HLA-B27 ist bekannt, daß Dimere aus β 2m-freien HLA-B27-schweren Ketten, die über die Cysteinreste an Aminosäureposition 67 in der Peptidbindestelle verknüpft sind, in TAP-defizienten Zellen an die Zelloberfläche gelangen können (Allen *et al.* 1999). Auch die schwere Kette von HLA-G enthält zwei ungepaarte zusätzliche Cysteinreste an den Aminosäurepositionen 42 und 147. Daher sollte untersucht werden, ob HLA-G auf der Zelloberfläche von β 2m-negativen Zellen – möglicherweise in Form von Homodimeren - funktionell exprimiert werden kann. Als Zielzelle wurde die Burkitt-Lymphomzelllinie Daudi gewählt. Diese exprimiert aufgrund einer Mutation im Translationsstartkodon des Gens kein β 2m (Rosa *et al.* 1983). Es wurden Transfektanten in der Zelllinie Daudi hergestellt. Als Kontrollen dienten Transfektanten in der Zelllinie K-562 bzw. die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3. Daudi und K-562 wurden mit der HLA-G1-cDNA im Vektor pIRES2-EGFP (HLA-G1/EGFP) transfiziert, um über die EGFP-Expression Transfektanten auswählen zu können.

Zur Kontrolle der HLA-G1-Transkription in den Transfektanten wurden sie im Northernblot mit der HLA-G4-Sonde getestet (Abschnitte 4.1.12 und 4.1.13). Dieser fehlt das zwischen HLA-I-Allelen am stärksten konservierte Exon, aber dennoch tritt eine Kreuzreaktion mit anderen HLA-I-Transkripten auf. In der Zelllinie JEG-3 ist HLA-I-mRNA nachweisbar. JEG-3-Zellen exprimieren neben HLA-G auch geringe Mengen von HLA-C und HLA-E (Guillaudeux *et al.* 1995, Rinke de Wit *et al.* 1990). In der Zelllinie Daudi sind HLA-I- und in der Daudi HLA-G1-Transfektante sind sowohl HLA-I- als auch HLA-G1/EGFP-Transkripte nachweisbar. Transkripte endogener HLA-I-Allele fehlen in der Zelllinie K-562, so daß in der HLA-G1-Transfektante nur die HLA-G1/EGFP-Transkripte detektiert werden (Abb. 5.15). Die Daudi-Transfektante enthält HLA-G-mRNA in einem mit JEG-3 oder der K-562 HLA-G1/EGFP-Transfektante vergleichbaren Ausmaß.

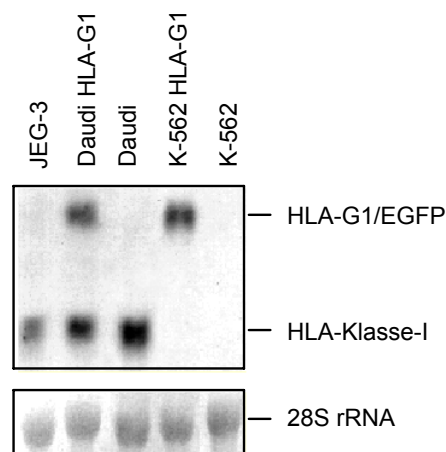


Abb. 5.15: Nachweis von HLA-G-mRNA in Daudi HLA-G1-Transfektanten

Je 10 μ g Gesamt-RNA von JEG-3, Daudi, Daudi transfiziert mit der HLA-G1-cDNA in pIRES2-EGFP, K-562 und K-562 transfiziert mit dem gleichen Vektor wurden auf einem 1,2 %igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, in 20xSSC über Nacht geblottet und mit einer Dig-markierten HLA-G4-cDNA-Sonde hybridisiert. Die Menge an aufgetrennter RNA ist durch die Ethidiumbromid-Färbung der 28S rRNA gezeigt, die revertiert dargestellt ist.

Die Zelllinie Daudi exprimiert HLA-I-Antigene, die im Zellysat mit dem HLA-I-spezifischen mAk A1.4, der nicht mit HLA-G reagiert, aufgezeigt werden können. Jedoch ist die Menge im Vergleich zur lymphoblastoiden B-Zelllinie LG2 gering. In der Zelllinie K-562 sind bei Detektion mit dem mAk A1.4 im Westernblot keine HLA-I-schweren Ketten nachweisbar (Abb. 5.16 a). Wie aufgrund der bekannten Mutation im $\beta 2m$ -Gen zu erwarten, erhält man mit dem $\beta 2m$ -spezifischen mAk BBM.1 in den Daudi-Zellen kein Signal (Abb. 5.16 b).

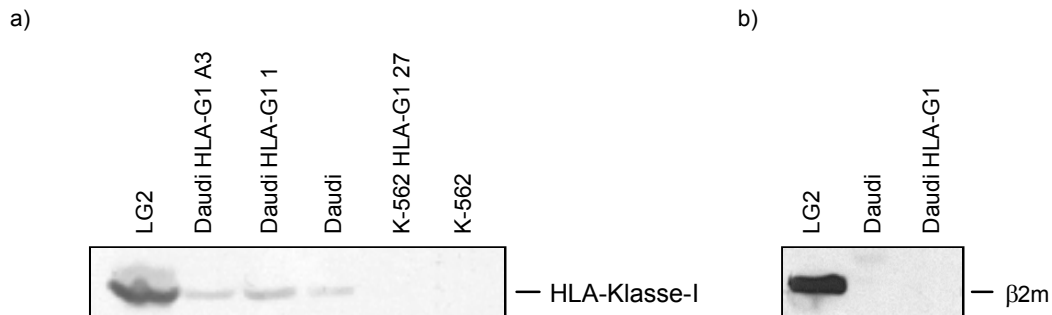


Abb. 5.16: Überprüfung der HLA-I-Expression der Zelllinie Daudi mittels Westernblot-Analyse

a) Je 100 μg der Zellysate von LG2, Daudi HLA-G1/EGFP Klone A3 und 1, Daudi, K-562 HLA-G1/EGFP 27 und untransfizierten K-562 wurden auf einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und mit dem HLA-I-spezifischen mAk A1.4 nachgewiesen. b) Zellysate von je 1×10^6 LG2, Daudi und Daudi HLA-G1/EGFP wurden auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und $\beta 2m$ wurde mit dem $\beta 2m$ -spezifischen mAk BBM.1 nachgewiesen.

Um die HLA-G1-Proteinexpression in den Daudi-Transfektanten zu untersuchen, wurden Westernblot-Analysen unter Verwendung des HLA-G-spezifischen mAk 4H84 zur Detektion durchgeführt (Abschnitt 4.4.5). Außerdem wurden Lysate von Daudi und K-562 HLA-G1 einer Inkubation mit Endo H unterzogen (Abschnitt 4.4.3, Abb. 5.17). Auf Proteinebene unterscheiden sich die K-562 und die Daudi HLA-G1-Transfektanten in der Menge der HLA-G-Antigene. Für Daudi HLA-G1 wurde die doppelte Proteinmenge aufgetragen. Die Menge an HLA-I-Polypeptiden ist in Zellen ohne $\beta 2m$ reduziert. Während ein Teil der HLA-G-Moleküle im Lysat der Zelllinie JEG-3 und der K-562 HLA-G1-Transfektante resistent gegenüber Endo H ist, sind die HLA-G-Polypeptide in der Daudi HLA-G1-Transfektante vollständig sensitiv gegenüber Verdau durch Endo H (Abb. 5.17).

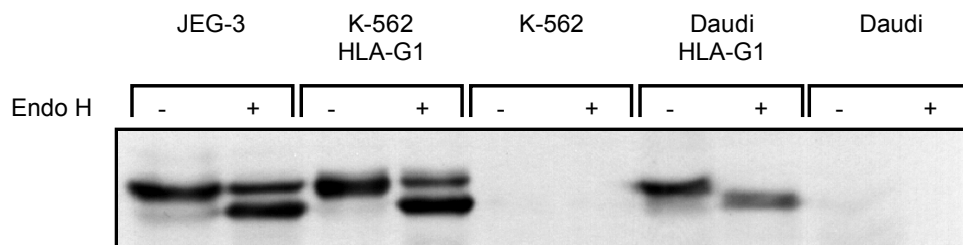


Abb. 5.17: Analyse der HLA-G-Expression und Sensitivität gegenüber Endo H in der Westernblot-Analyse

Zellysate von JEG-3, K-562 HLA-G1, K-562 (je 100 μg), Daudi HLA-G1 und Daudi (je 200 μg) wurden mit Endo H behandelt, durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und HLA-G mit dem mAk 4H84 nachgewiesen.

Neben der Überprüfung der Endo H-Sensitivität von HLA-G1 wurden die Daudi HLA-G1-Transfektanten mittels FACS-Analysen direkt auf eine mögliche Zelloberflächenexpression von HLA-G1 getestet. Dazu wurden MHC-I-spezifische (W6/32) und HLA-G-spezifische (87G und MEM-G/9) mAk eingesetzt, die gegen natives HLA-G1 gerichtet sind. Da die Konformation der HLA-I-schweren Ketten von ihrer Assoziation mit β 2m abhängt, wurden zur Färbung zusätzlich Ak herangezogen, die auch denaturierte schwere Ketten von HLA-I (HCA2) oder HLA-G (4H84, MEM-G/1, BFL.1, Ab704, Kaninchen-Antiserum gegen die α 1-Domäne von HLA-G) erkennen. Zur Kontrolle der Ak-Bindung wurde jeweils der Klon K-562 HLA-G1 27 mit vergleichbar starker EGFP-Expression mitgefärbt (nicht gezeigt und Abb. 5.18 c, siehe auch Abb. 5.3-5.5). Im Gegensatz zu der K-562 HLA-G1-Transfektante konnten auf der Zelloberfläche der Daudi HLA-G1-Transfektante keine HLA-G-Antigene nachgewiesen werden, beispielhaft anhand der Färbung mit den mAk W6/32 und HCA2 gezeigt (Abb. 5.18 a).

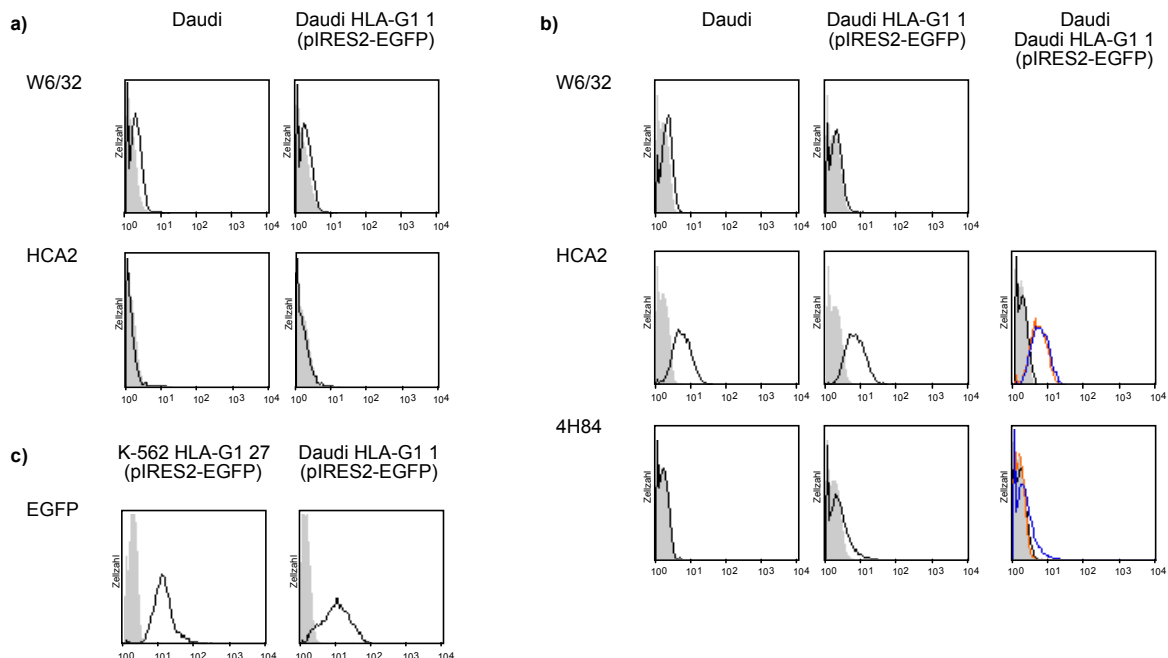


Abb. 5.18: Untersuchung der HLA-G1-Expression von Daudi-Transfektanten mittels FACS-Analyse

Je 2×10^5 Daudi und Daudi HLA-G1 wurden auf der Zelloberfläche (a) bzw. intrazellulär mit Fix&Perm (b) mit den HLA-I-spezifischen mAk W6/32 und HCA2 bzw. dem HLA-G-spezifischen mAk 4H84 gefärbt (durchgezogene Linien). Als sekundärer Ak wurde ein PE-gekoppeltes, gegen Maus IgG (H+L) gerichtetes F(ab')₂-Fragment eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die Inkubation ohne 1. Ak (schattiert dargestellt). Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz 2 angegeben. In Teilabbildung b sind die Negativkontrolle von Daudi (graue Kurve), bzw. von Daudi HLA-G1 1 (schwarze Kurve) und die Färbung mit dem jeweiligen Ak von Daudi (orange Kurve) und der HLA-G1-Transfektante (blaue Kurve) übereinandergelegt. c) Die Histogramme geben die EGFP-Expression der HLA-G1-Transfektanten in den Zelllinien Daudi und K-562 an (durchgezogene Linie). Als Negativkontrolle dienen untransfizierte Daudi bzw. K-562 (schattiert dargestellt). Die x-Achse gibt die Intensität der Fluoreszenz 1 an.

Es wurde auch untersucht, ob HLA-G nach Inkubation der Daudi HLA-G1-Transfektanten bei niedrigen Temperaturen und Zugabe von humanem β 2m oder exogenem Peptidliganden nachweisbar ist (Abschnitt 4.3.3). Es fand jedoch keine Stabilisierung der Epitope von W6/32, HCA2, 4H84 oder 87G nach Inkubation bei 26°C statt. Auch die Zugabe von hu β 2m (getestet mit den mAk W6/32, HCA2, MEM-G/1, 4H84 und BBM.1) oder des Peptidliganden

für HLA-G H2A führte zu keiner Bindung der verwendeten mAk (nicht gezeigt). In Abwesenheit von β 2m gelangt HLA-G1 nicht, zumindest nicht nachweisbar, auf die Zelloberfläche und kann dort demzufolge auch nicht stabilisiert werden.

Bei der intrazellulären Färbung mit dem mAk BBM.1 war wie erwartet in der Zelllinie Daudi keine β 2m-Expression feststellbar (nicht gezeigt). Entsprechend ergab die Färbung von Daudi HLA-G1 mit Ak gegen native HLA-I-Antigene, z.B. mit den mAk W6/32 und 87G keinen Nachweis von HLA-G1-Antigenen. Ak gegen entfaltete HLA-G-schwere Ketten wie z.B. HCA2 und 4H84 wiesen gegenüber untransfizierten Daudi jedoch auch keine oder eine nur geringfügig verstärkte Bindung auf (Abb. 5.18 b). Der mAk HCA2 reagierte in der Zelllinie Daudi mit den endogenen HLA-I-schweren Ketten. Sogar der mAk 4H84, der im Westernblot alle HLA-G-Isoformen erkennt, wies nur eine geringfügig verstärkte Bindung an die Daudi-HLA-G1-Transfektanten auf. Die geringe Bindung von HLA-G-spezifischen Ak an Daudi HLA-G1-Transfektanten stimmt mit den Ergebnissen der Westernblot-Analysen überein, bei denen in den Lysaten eine im Vergleich zu den K-562-Transfektanten niedrige HLA-G-Proteinmenge auftrat (Abb. 5.17).

Der Nachweis von HLA-G1 in der β 2m-defizienten Zelllinie Daudi fiel mit konformationsabhängigen Ak erwartungsgemäß negativ aus. Der mAk W6/32 erkennt HLA-I-schwere Ketten normalerweise nur in Assoziation mit β 2m. Er wurde dennoch für die Färbung der Daudi HLA-G1-Transfektante eingesetzt, weil dieser mAk auch an Calnexin-assoziierte, β 2m-freie HLA-schwere Ketten binden kann und einige HLA-I-Allele in partiell denaturierter Form erkennt (siehe auch 5.1.1 und 6.1.2). Vor allem wurde dieser Ak ausgewählt, weil er an β 2m-freie HLA-B27-Dimere bindet (Allen *et al.* 1999). Da die FACS-Analyse keinen Nachweis von HLA-G-Homodimeren auf der Zelloberfläche der Daudi-Transfektanten erbrachte, wurden Lysate von Daudi, Daudi HLA-G1, K-562, K-562 HLA-G1 und JEG-3 unter nicht reduzierenden Bedingungen, bei denen Disulfidbrücken erhalten bleiben, auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Es konnten mit dem mAk 4H84 auch bei Überexposition des Filmes keine Dimere nachgewiesen werden (Abb. 5.19 und nicht gezeigt). Auch in Immunpräzipitaten mit dem mAk MEM-G/1, der entfaltete HLA-G-schwere Ketten erkennt, waren bei folgender Detektion mit 4H84 in der Westernblot-Analyse keine HLA-G-Dimere nachweisbar (nicht gezeigt).

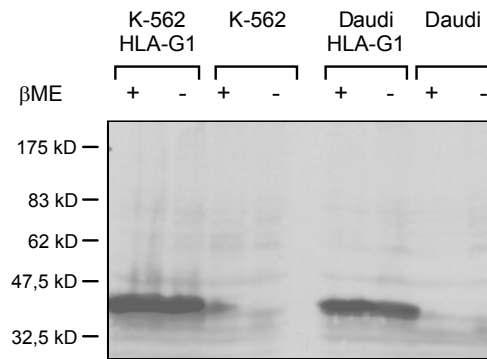


Abb. 5.19: In der K-562 und Daudi HLA-G1-Transfektante sind keine HLA-G1-Dimere nachweisbar

Je 300 µg Lysat von untransfizierten K-562 und Daudi bzw. von HLA-G1-Transfektanten wurden unter reduzierenden (+ βME) bzw. nicht reduzierenden Bedingungen (- βME) durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und HLA-G1 mit dem mAk 4H84 nachgewiesen.

Als Kontrolle wurden in der Zelllinie Daudi mit der HLA-B27-cDNA im Vektor pcDNA3.1 HLA-B27-Transfektanten hergestellt. Daudi-Zellen exprimieren HLA-B-Antigene auf mRNA- und Proteinebene. Die Expression der HLA-B27-mRNA wurde durch eine HLA-B27-spezifische RT-PCR nachgewiesen, die im Gegensatz zu der HLA-B-PCR lediglich für die HLA-B27-Daudi-Transfektante ein Signal ergab, nicht hingegen für die untransfizierte Zelllinie (Abb. 5.20 a). Bei Verwendung des mAk HC10 zur Detektion der HLA-B-Antigene in der Westernblot-Analyse war eine Zunahme der Signalstärke gegenüber den untransfizierten Daudi feststellbar (Abb. 5.20 b).

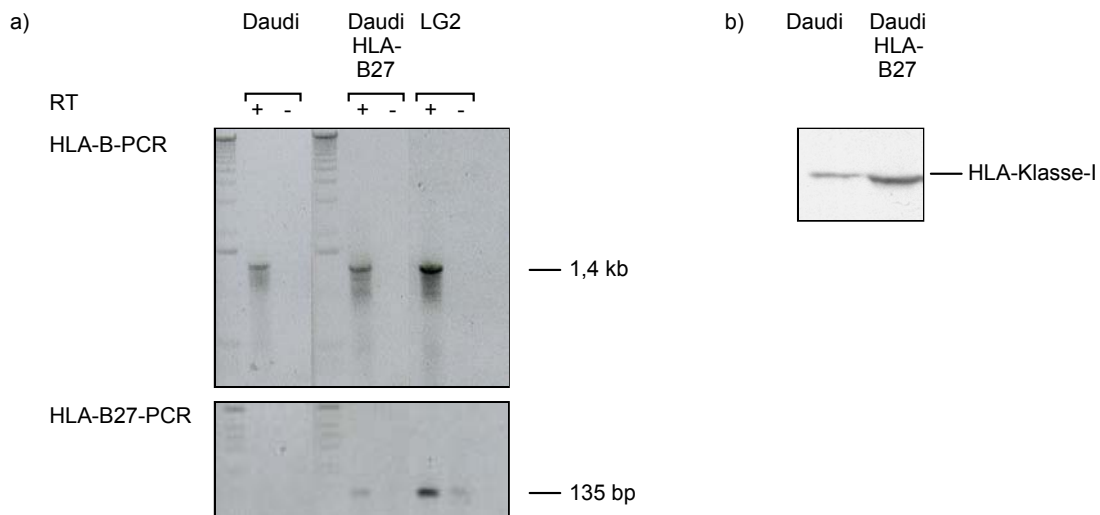


Abb. 5.20: HLA-B27 wird auf mRNA- und Proteinebene in der Daudi HLA-B27-Transfektante exprimiert

a) Je 1 µg Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben (+) bzw. in einem parallelen Ansatz ohne Reverse Transkriptase (RT) mitgeführt (-). Anschließend wurde je 1 µl in eine PCR-Reaktion mit den HLA-B-Primern HLA-5'UT und HLA-3UTB und dem HLA-B27-spezifischen Primerpaar E91s und E136as eingesetzt und der gesamte 20-µl-PCR-Ansatz auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Amplifikate haben eine Größe von 1,4 kb bzw. 135 bp. Als Größenstandard sind jeweils 200 ng des Molekulargewichtstandards M (1-kb-Leiter, Gibco BRL) aufgetragen. N gibt die PCR-Negativkontrolle an. Die Ethidiumbromid-färbungen der Gele sind revertiert dargestellt. b) Je 100 µg der Zellysate von Daudi und Daudi HLA-B27 wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und HLA-Klasse-I-Antigene mit dem HLA-B-spezifischen mAk HC10 nachgewiesen.

Aber auch HLA-B27-Dimere konnten mittels nicht reduzierender PAGE und anschließender Westernblot-Analyse unter Verwendung des mAk HC10 nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die intrazelluläre Färbung mit den mAk W6/32 oder HC10, sowie die Zelloberflächenfärbung mit den mAk W6/32, A1.4 oder HC10 ergab - auch nach Inkubation bei 26°C - keinen Nachweis der HLA-B27-Expression (Abb. 5.21 und nicht gezeigt).

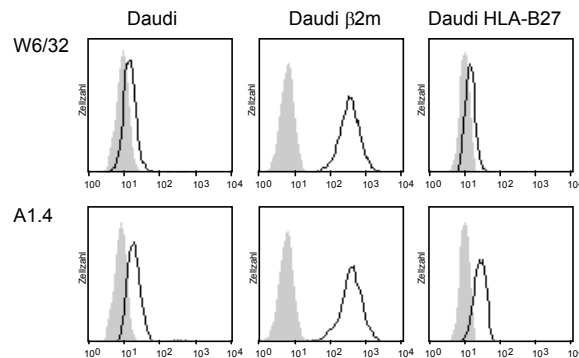


Abb. 5.21: Untersuchung der HLA-B27-Expression in Daudi

Je 2×10^5 Daudi, Daudi $\beta 2m$ bzw. Daudi HLA-B27 wurden mit den HLA-I-spezifischen mAk W6/32 und A1.4 gefärbt (durchgezogene Linien). Als sekundärer Ak wurde ein PE-gekoppeltes, gegen Maus IgG (H+L) gerichtetes $F(ab')_2$ -Fragment eingesetzt. Die Inkubation ohne 1. Ak diente als Negativkontrolle (schattiert dargestellt). Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz 2 angegeben.

Obwohl sich aus der FACS-Analyse und dem Endo H-Verdau kein Hinweis auf eine Oberflächenexpression von HLA-G ergab, konnte die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß HLA-G in mit den verwendeten Methoden nicht nachweisbaren Mengen auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Da bereits wenige HLA-I-Moleküle funktionelle Auswirkungen haben können, wurden abschließend die Daudi HLA-G1-Transfektanten funktionell getestet. Da die Zelllinie Daudi laut Literatur von der Zelllinie NKL erkannt und lysiert wird, wurden die ersten Versuche zur funktionellen Expression von HLA-G mit der Zelllinie NKL durchgeführt (Bauer *et al.* 1999). Die Daudi-Zellen wurden jedoch nur in seltenen Fällen von NKL lysiert (Ergebnisse nicht gezeigt). Daudi-Zellen sind auch gegenüber der Zytotoxizität von unstimulierten NK-Zellen resistent. Jedoch erfolgt eine Lyse durch IL-2 aktivierte Lymphozyten (Godoy-Ramirez *et al.* 2000). Daher wurden LAK-Zellen (lymphokine activated killer) von verschiedenen Spendern, die durch Kultivierung von PBL mit 1000 U huIL-2/ml im Medium induziert wurden, als Effektorzellen in Zytotoxizitätstests eingesetzt. Die als Zielzellen verwendeten HLA-G1- und pIRES2-EGFP-Transfektanten wurden auf eine vergleichbare EGFP-Expression getestet (Abb. 5.22 b). Die HLA-B27-Expression der Daudi HLA-B27-Transfektante wurde über Westernblot-Analyse kontrolliert. Die Lyse durch LAK verschiedener Spender wurde im Vergleich zu der Vektortransfektante oder der HLA-B27-Transfektante durch die HLA-G1-Expression nicht inhibiert (Abb. 5.22 a). Eine Teilpopulation der hier gezeigten LAK-Zellen exprimierte CD94, aber kein ILT2 (Abb. 5.22 c). Als Positivkontrolle für die Färbung diente die Zelllinie NKL. Auch bei ILT2 exprimierenden LAK war keine spezifische Inhibition durch HLA-G1 nachweisbar.

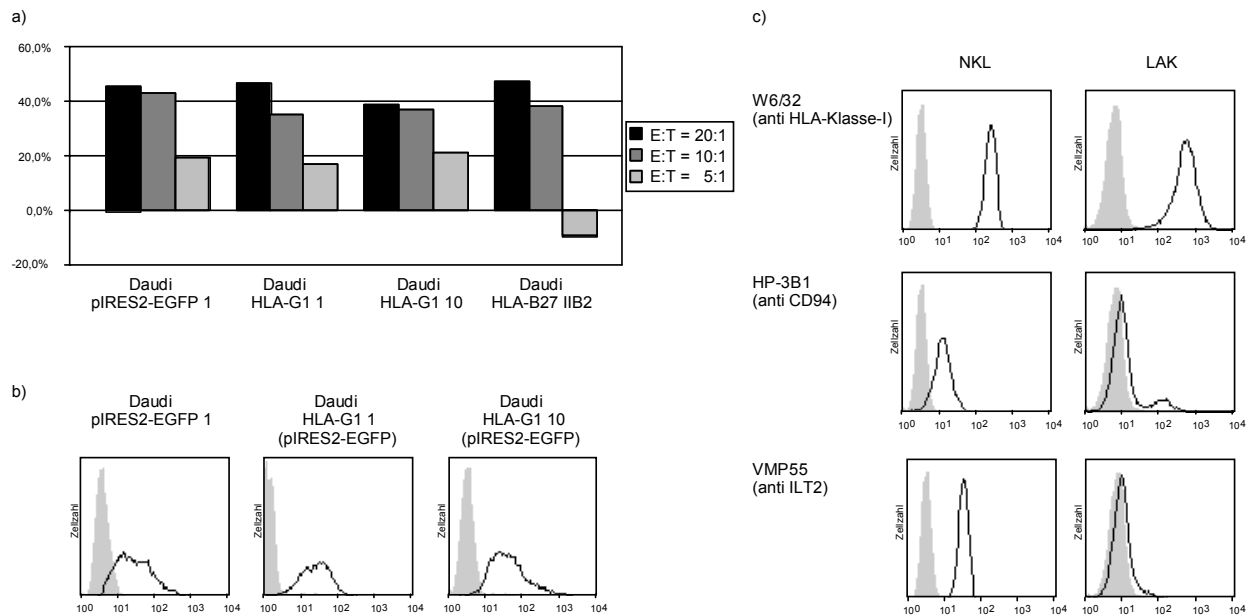


Abb. 5.22: Zytotoxizität von LAK-Zellen gegenüber Daudi-Transfektanten

a) LAK-Zellen wurden mit BATDA-markierten Daudi pIRES2-EGFP 1, Daudi HLA-G1 1, Daudi HLA-G1 10 und Daudi HLA-B27 IIB2 im Verhältnis 20:1, 10:1 und 5:1 für 2 h koinkubiert und die spezifische Lyse in % ermittelt. b) Daudi pIRES2-EGFP 1, Daudi HLA-G1 1 und Daudi HLA-G1 10 wurden bezüglich ihrer EGFP-Expression untersucht (durchgezogene Linie). Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Daudi (schattiert dargestellt). Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz 1 angegeben. c) Je 2×10^5 LAK-Zellen bzw. NKL wurden mit dem HLA-I-spezifischen mAk W6/32, dem CD94-spezifischen mAk HP-3B1 und dem ILT2-spezifischen mAk VMP55 gefärbt (durchgezogene Linien). Als sekundärer Ak wurde ein PE-gekoppeltes, gegen Maus IgG (H+L) gerichtetes F(ab')₂-Fragment eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die Inkubation ohne 1. Ak (schattiert dargestellt). Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz 2 angegeben.

Zusätzlich wurde der funktionelle Einfluß der HLA-G1-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen untersucht. $\gamma\delta$ T-Zellen stellen einen kleinen Anteil der T-Zellen in lymphoiden Organen und Geweben wie der Milz, Lymphknoten und dem peripheren Blut (meist < 5 % der Lymphozyten) dar (Groh *et al.* 1989, Parker *et al.* 1990). In Epithelien der Epidermis, des Verdauungstraktes und des Uterus sind sie jedoch häufiger. Die intraepithelialen Lymphozyten der Decidua werden zum Großteil durch $\gamma\delta$ T-Zellen gebildet (Mincheva-Nilsson *et al.* 1994). Während der Schwangerschaft ist der Anteil von aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen in der Decidua (bis zu 60 % der T-Zellen) und im peripheren Blut erhöht (Geiselhart *et al.* 1995, Mincheva-Nilsson *et al.* 1992, 1994 und 1997). In den meisten Fällen tragen über 90 % der $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem peripheren Blut den V γ 9/V δ 2-TCR (Parker *et al.* 1990, Sturm *et al.* 1990). Da diese den Großteil der $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem peripheren Blut ausmachen und sich durch Phosphoantigene wie Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) oder durch Daudi-Zellen zur Proliferation anregen lassen, wurden sie zur Kontrolle der funktionellen Expression von HLA-G in der Zelllinie Daudi verwendet (Burk *et al.* 1995, Fisch *et al.* 1990 a und 1990 b, Tanaka *et al.* 1995).

Durch Stimulation von PBMC mit IPP erfolge eine Anreicherung von $\gamma\delta$ T-Zellen (ca. 31 % V δ 2⁺, davon 40,6 % CD94⁺, 4,5 % ILT2⁺), die anschließend als Effektorzellen in den Zytotoxizitätstest eingesetzt wurden (Abschnitt 4.5.1). Auch mit diesen Effektorzellen war kein spezifischer Effekt der HLA-G1- oder HLA-B27-Expression gegenüber der Daudi pIRES2-EGFP-Vektorkontrolle feststellbar (Abb. 5.23).

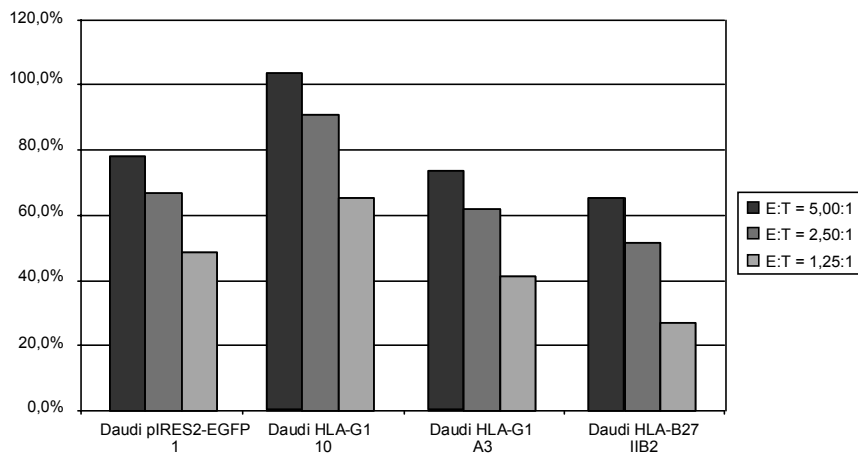


Abb. 5.23: Zytotoxizität von $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber Daudi-Transfektanten

Nach Stimulation von PBMC für 12 Tage mit $30 \mu\text{M}$ IPP/50 U hL2/ml wurden die mit $V\delta 2^+$ Zellen angereicherten PBMC (ca. 31 %) mit BATDA-markierten Daudi pIRES2-EGFP 1, Daudi HLA-G1 10, Daudi HLA-G1 A3 und Daudi HLA-B27 IIB2 im Verhältnis 5:1, 2,5:1 und 1,25:1 in einen Zytotoxizitätstest eingesetzt und die spezifische Lyse in % ermittelt.

$V\gamma 9/V\delta 2^+$ T-Zellen können durch Daudi-Zellen zur Proliferation, Zytokinproduktion und Zytotoxizität angeregt werden. Diese Aktivierung erfolgt unter Beteiligung des $V\gamma 9/V\delta 2$ -TCR und ist sensitiv gegenüber negativer Regulation durch HLA-I-Antigene (Bukowski *et al.* 1995, Fisch *et al.* 1990 b, L'Faqihi *et al.* 1999, Sturm *et al.* 1990). Um zu untersuchen, ob die HLA-G-Expression von Daudi-Transfektanten einen Einfluß auf die Expansion von $V\gamma 9/V\delta 2^+$ T-Zellen hat, wurden bestrahlte Daudi und Daudi HLA-G1-Transfektanten mit frisch isolierten PBMC verschiedener Spender koinkubiert und nach 5-22 Tagen der prozentuale Anteil der $V\delta 2^+$ T-Zellen an den PBMC über FACS-Analyse ermittelt (Abb. 5.24, Abschnitt 4.5.2). Als Positivkontrolle für die Inhibition der Proliferation wurde eine Daudi $\beta 2\text{m}$ -Transfektante, bei der die Expression von HLA-I-Antigenen auf der Zelloberfläche wieder hergestellt ist, verwendet. Als weitere Kontrollen wurden die Daudi HLA-B27- und die pIRES2-EGFP-Vektor-Transfektante mitgeführt. Mittels FACS-Analyse wurden die $V\delta 2^+$ Zellen auf die Koexpression von verschiedenen Zelloberflächenmarkern mit dem $V\delta 2$ -TCR untersucht. Sie waren positiv für CD3 (nicht gezeigt), negativ für CD8 und CD4, nicht oder nur zu einem kleinen Anteil positiv für ILT2 und trugen zu einem Großteil einen CD94/NKG2-Rezeptor (Abb. 5.24 a).

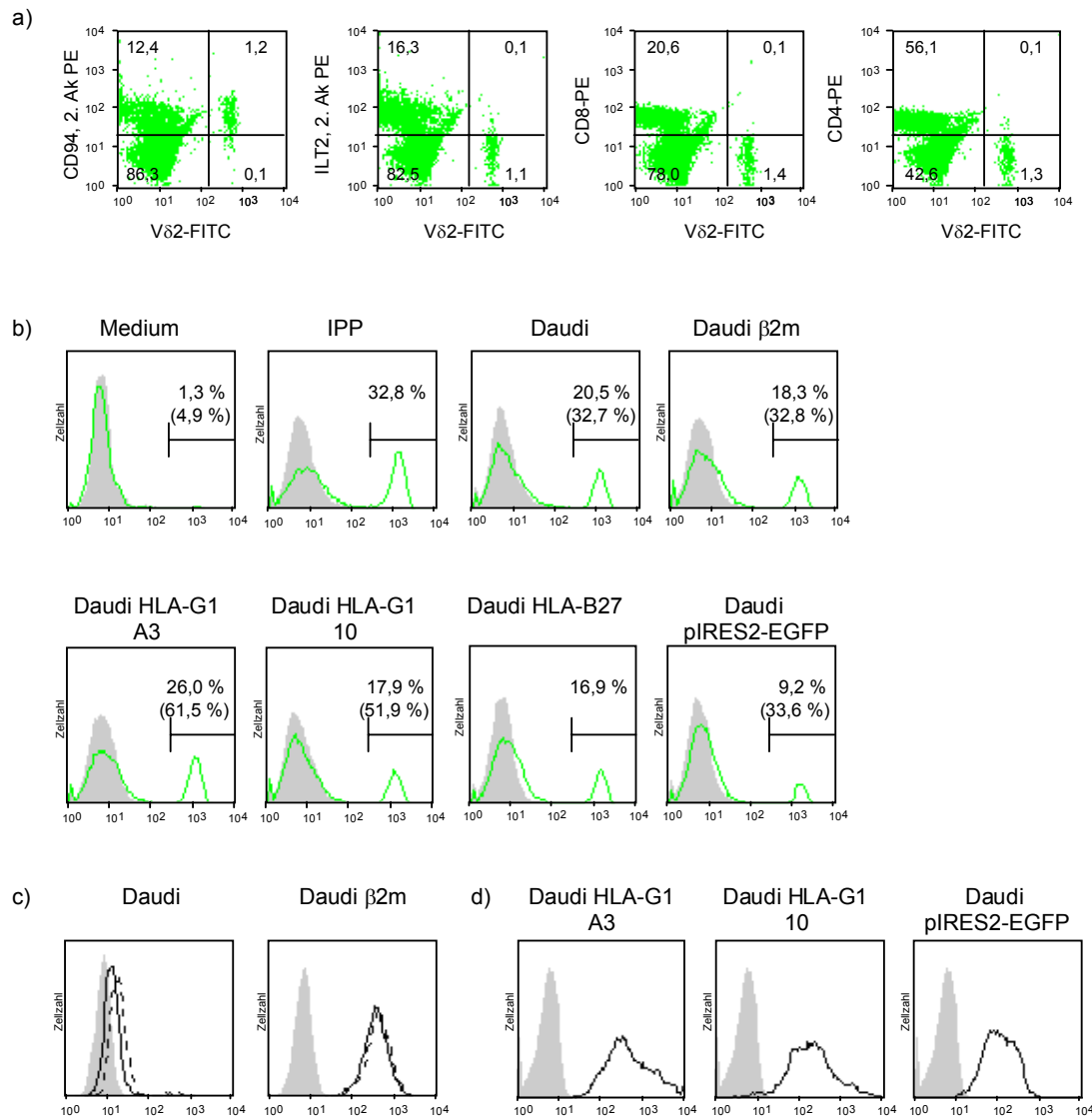


Abb. 5.24: Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen nach Inkubation mit Daudi und Daudi-Transfektanten

a) PBMC wurden mit dem FITC-gekoppelten $V\delta 2$ -spezifischen Ak und Ak gegen CD94 (HP-3B1), ILT2 (VMP55), CD8 (CD8-PE) bzw. CD4 (CD4-PE) gefärbt und der Anteil der einfach und doppelt positiven Zellen bestimmt. Als sekundärer Ak wurde ein PE-gekoppeltes, gegen Maus IgG (H+L) gerichtetes $F(ab')_2$ -Fragment eingesetzt. b) PBMC wurden mit 30 μ M IPP bzw. Daudi, Daudi $\beta 2m$, Daudi HLA-G1 A3 und 10, Daudi HLA-B27 IIB2 und Daudi pIRES2-EGFP 1, die zuvor mit 60 Gy bestrahlt worden waren, koinkubiert. Nach 7 bzw. 14 Tagen wurde der Anteil von $V\delta 2^+$ Zellen an der PBMC-Population mit dem $V\delta 2$ -spezifischen Ak bestimmt. Gezeigt ist die FACS-Analyse nach 7 Tagen, die Zahlen in Klammern geben den Anteil der $V\delta 2^+$ Zellen nach 14 Tagen an. Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz 2 angegeben. Als sekundärer Ak wurde ein PE-gekoppeltes, gegen Maus IgG (H+L) gerichtetes $F(ab')_2$ -Fragment eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die Inkubation ohne 1. Ak (schattiert dargestellt). c) Daudi und die Daudi-Transfektanten wurden mit den HLA-I-spezifischen mAk A1.4 (gestrichelte Linie) bzw. W6/32 (durchgezogene Linie) gefärbt. Als sekundärer Ak wurde ein PE-gekoppeltes, gegen Maus IgG (H+L) gerichtetes $F(ab')_2$ -Fragment eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die Inkubation ohne 1. Ak (schattiert dargestellt). Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz 2 angegeben. d) Die EGFP-Expression der Daudi HLA-G1- und der pIRES2-EGFP-Transfektanten (durchgezogene Linien) sind im Vergleich zu untransfizierten Daudi (schattiert) dargestellt. Die x-Achse gibt die Intensität der Fluoreszenz 1 an.

Einen Einfluß der HLA-G1-Expression auf die Proliferation von $V\delta 2^+$ T-Zellen festzustellen, gestaltete sich als schwierig, da sich die Proliferation durch Koinkubation mit Daudi nicht in allen Fällen stimulieren ließen. Dabei ergaben auch PBMC desselben Spenders, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen worden waren, variierende Ergebnisse. Die Überlebensrate der $\gamma\delta$ T-Zellen kann durch das Zytokininmilieu beeinflusst werden, so daß sich

möglicherweise unerkannte Infektionen der Spender auf die Resultate auswirkten (Wesch *et al.* 2001). Die erfolgreiche Stimulation der Proliferation war abhängig von den eingesetzten PBMC und nicht von den Stimulatorzellen, da ein entsprechend vorhandener oder fehlender Anstieg des $\gamma\delta$ T-Zellanteils jeweils auch nach Stimulation mit IPP feststellbar war. Für die Auswertung wurden daher nur die Experimente herangezogen, bei denen der Anteil der $V\delta 2^+$ T-Zellen nach 7-tägiger Koinkubation mit Daudi auf $\geq 10\%$ der Gesamt-PBL erhöht war (Ausgangswerte 0,3 %-2,6 % der PBMC vor Stimulation). Nur in zwei von fünf Versuchsansätzen wurde dieser Effekt durch die Expression von HLA-I-Antigenen in der Daudi $\beta 2m$ -Transfektante reduziert, wobei dieses Ergebnis auch vom Zeitpunkt der FACS-Analysen beeinflusst wurde. Trat in dem Zeitraum bis ca. 8 Tage nach Stimulationsbeginn eine Reduktion der Proliferation durch Expression von HLA-I-Antigenen auf, stieg im Folgenden der Anteil der $V\delta 2^+$ T-Zellen auf ein Niveau an, das dem der mit untransfizierten Daudi stimulierten PBMC entsprach (Abb. 5.24 b). Bei den Daudi HLA-G1-Transfektanten traten klonale Unterschiede auf. Daudi HLA-G1 1 wirkte inhibierend, Daudi HLA-G1 A3 aktivierend und Daudi HLA-G1 10 aktivierend oder inhibierend (Abb. 5.24 b). Auch die als Kontrollen eingesetzten Transfektanten Daudi HLA-B27 und Daudi pIRES2-EGFP inhibierten in einigen Experimenten die Proliferation. Die variable Auswirkung der Koinkubation der $V\delta 2^+$ T-Zellen mit Daudi-Transfektanten ist daher einerseits auf klonale Unterschiede z.B. in der Expression des von den $\gamma\delta$ T-Zellen erkannten Antigens auf den Daudi-Zellen und andererseits auf unterschiedliche Expression von Rezeptoren auf den $\gamma\delta$ T-Zellen zurückzuführen. Insgesamt betrachtet wirkte sich die Expression von HLA-G1 und HLA-B27 in der $\beta 2m$ -negativen Zelllinie Daudi nicht inhibierend auf die Zytotoxizität oder Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen aus.

In Untersuchungen mit LAK und $\gamma\delta$ T-Zellen wurde keine funktionelle Expression von HLA-G1 in Abwesenheit von $\beta 2m$ in der Zelllinie Daudi festgestellt.

5.3 HLA-G-Expression in HLA-I-positiven Gliomzelllinien und Myoblasten

Der Hauptexpressionsort von HLA-G, die Plazenta, wird als immunprivilegiertes Gewebe angesehen, da er sich unter anderem durch eine geringe HLA-I-Expression auszeichnet. Entsprechendes gilt auch für das Gehirn. Zu den zahlreichen Tumoren, in denen HLA-G-Expression nachgewiesen wurde, gehören auch zwei Glioblastomzelllinien (Maier *et al.* 1999). Da die HLA-G-Expression in Gliomzelllinien durch $IFN-\gamma$ verstärkt oder induziert werden kann, wurden 12 Gliomzelllinien mit $IFN-\gamma$ stimuliert und die Induktion der HLA-G-Transkription mittels Northernblot-Analyse getestet. Von den 12 untersuchten Gliomzelllinien exprimierten 6 HLA-G-mRNA konstitutiv. Nach Stimulation mit $IFN-\gamma$ waren HLA-G-Transkripte in 10 der Zelllinien nachweisbar (Abb. 5.25). Zur Kontrolle der Stimulation wurde parallel HLA-B-mRNA nachgewiesen. Die dafür eingesetzte Sonde kreuzreagiert mit HLA-C-Transkripten in JEG-3. RT-PCR-Analysen bestätigten die Stimulation der HLA-G-Transkripte durch $IFN-\gamma$ und zeigten auch Transkripte der alternativen Spleißvarianten HLA-G2/HLA-G4 (die Amplifikate besitzen die gleiche Größe) und HLA-G3 (nicht gezeigt).

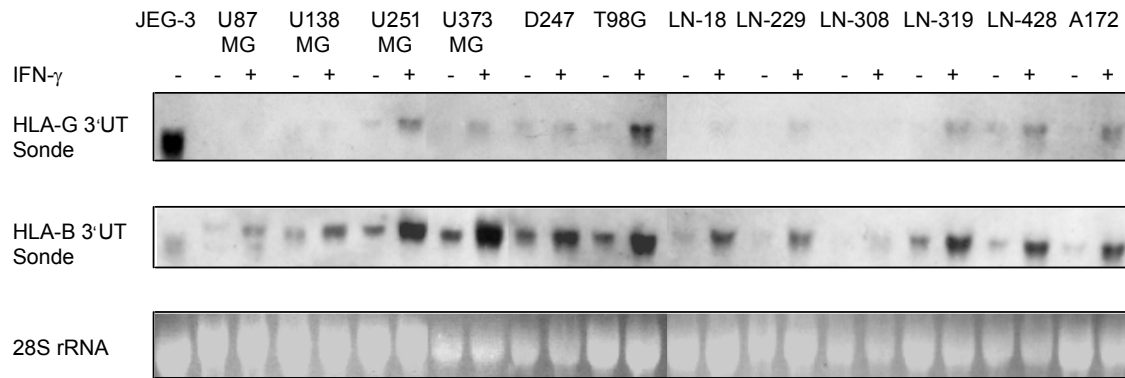


Abb. 5.25: Analyse der HLA-G-mRNA-Expression in Gliomzelllinien

Je 20 μ g Gesamt-RNA von unbehandelten oder mit IFN- γ stimulierten (500 U/ml, 48 h) Gliomzelllinien wurden auf einem 1,2 %igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, in 20xSSC über Nacht geblottet und mit einer Dig-markierten HLA-G 3'UT M13-Sonde bzw. der HLA-B 3'UT-Sonde hybridisiert (Abschnitt 3.9). JEG-3 RNA diente als Positivkontrolle. Die Menge an aufgetrennter RNA ist durch die Ethidiumbromid-Färbung der 28S rRNA gezeigt.

HLA-G-Zelloberflächenexpression wurde in 4 Zelllinien vor und in 8 nach IFN- γ Stimulation mittels FACS nachgewiesen. Um die funktionelle Expression von HLA-G in Gliomzelllinien unter definierten Bedingungen testen zu können, ohne die Notwendigkeit der Stimulation mit IFN- γ , wurde die HLA-G-negative Gliomzelllinie U87MG mit der HLA-G1- bzw. HLA-G5-cDNA im Vektor pIRES2-EGFP transfiziert (Transfektion durchgeführt von Dr. H. Wiendl). Die HLA-G-Expression wurde mittels Northern- und Westernblot-Analysen kontrolliert (nicht gezeigt und Abb. 5.26, siehe Abschnitte 4.1.12, 4.1.13 und 4.4.5).

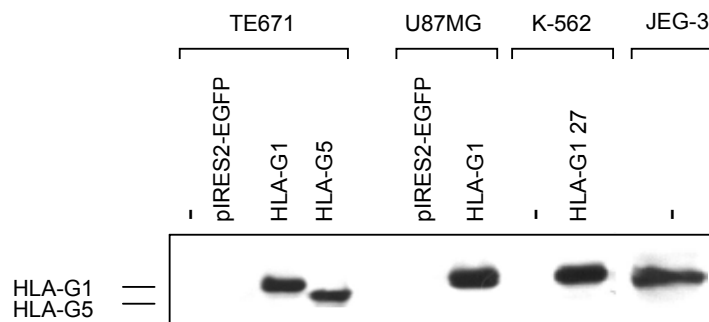


Abb. 5.26: Analyse der HLA-G-Proteinexpression in TE671- und U87MG-Transfektanten

Zellysate von untransfizierten (-), mit dem Vektor pIRES2-EGFP bzw. mit der HLA-G1- oder der HLA-G5-cDNA im Vektor pIRES2-EGFP transfizierten TE671 Rhabdomyosarkomzellen und U87MG Gliomzellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und mit dem HLA-G-spezifischen mAk 4H84 nachgewiesen. Lysate von K-562 bzw. K-562 HLA-G1 27 und JEG-3 wurden als Negativ- bzw. Positivkontrollen verwendet.

Expression von HLA-G wurde nicht nur in Tumorzellen sondern auch in Myoblasten bei inflammatorischen Myopathien und in kultivierten Myoblasten nachgewiesen (Wiendl *et al.* 2000). Um die funktionelle Expression in humanem Muskelgewebe untersuchen zu können, wurde die Rhabdomyosarkomzelllinie TE671 mit den HLA-G1- und HLA-G5-cDNA-Vektoren und als Vektorkontrolle mit pIRES2-EGFP transfiziert (die Transfektion erfolgte durch Dr. H. Wiendl). Die HLA-G-Expression in den Transfektanten wurde im Westernblot kontrolliert. Im Gegensatz zu den untransfizierten TE671 exprimieren die Transfektanten

hohe Mengen an HLA-G-Protein, wie im Westernblot gezeigt (Abb. 5.26). HLA-G1- und HLA-G5-Transfektanten in den Zelllinien TE671 und U87MG wurden funktionell getestet. Sowohl HLA-G1 als auch HLA-G5 inhibierten die primäre alloproliferative Antwort, reduzierten die alloreaktive Lyse durch PBMC und inhibierten das Priming von Ag-spezifischen T-Zellen (durchgeführt durch Dr. H. Wiendl, siehe Abschnitt 6.3.3). Dabei war ein kleiner Anteil HLA-G1⁺ Myoblastom- bzw. Gliomzellen für eine Inhibition der Lyse ausreichend.

6 Diskussion

6.1 Prozessierung und Lokalisation der HLA-G-Isoformen in der Zelle

HLA-G unterscheidet sich von anderen MHC-Molekülen der Klasse I durch alternatives Spleißen des Primärtranskriptes, welches die Synthese von verkürzten membranständigen und von sezernierten Molekülen erlaubt. Die Frage, ob die verkürzten HLA-G-Isoformen auf der Zelloberfläche exprimiert werden, wird noch immer kontrovers diskutiert. Die HLA-I-Zelloberflächenexpression erfordert verschiedene Schritte im ER, welche die Beladung mit Peptidliganden und den Transport durch den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche ermöglichen. HLA-I-schwere Ketten binden dabei in voneinander abhängigen Schritten an Calnexin, $\beta 2m$, Calretikulin, ERp57 und TAP/Tapasin (Diedrich *et al.* 2001, Hughes und Cresswell 1998, Lindquist *et al.* 1998, Morrice und Powis 1998, Ortmann *et al.* 1994 und 1997, Sadasivan *et al.* 1996). In Zellen, bei denen dieser Weg defekt ist, werden die meisten neu synthetisierten „leeren“ MHC-I-Moleküle abgebaut, bevor sie in den Golgi-Apparat gelangen. Den verkürzten HLA-G-Isoformen fehlt jeweils mindestens eine der Domänen $\alpha 2$ (HLA-G2, HLA-G6, HLA-G3, HLA-G7) und $\alpha 3$ (HLA-G4, HLA-G3, HLA-G7). Diese sind an der Assoziation mit den Proteinen beteiligt, die für die Ausbildung des Komplexes aus MHC-I-schwerer Kette, $\beta 2m$ und Peptidligand benötigt werden. Das wurde anhand ihrer Assoziation mit TAP und $\beta 2m$ untersucht. Die Unfähigkeit von HLA-G-schweren Ketten, mit $\beta 2m$ oder dem TAP/Tapasin-Komplex zu assoziieren, würde zu einer Störung in der Beladung mit Peptiden und in Folge des Transportes zur Zelloberfläche führen. Der Transport der HLA-G-Isoformen durch den Golgi-Apparat wurde anhand ihrer Sensitivität gegenüber Endo H verfolgt, und die Zelloberflächenexpression wurde durch Färbung mit HLA-I- und HLA-G-spezifischen Ak überprüft.

6.1.1 Fehlende Zelloberflächenexpression der verkürzten HLA-G-Isoformen in der Zelllinie K-562

Zur Kontrolle der Expression der verkürzten HLA-G-Isoformen auf der Zelloberfläche von K-562 HLA-G-Transfektanten wurden verschiedene HLA-G- und HLA-I-spezifische Ak in FACS-Analysen eingesetzt. Im Gegensatz zu der Volle-Länge-Isoform, dem klassischen Membranmolekül HLA-G1, sind HLA-G2- und HLA-G4-Moleküle mittels FACS-Analyse nicht auf der Zelloberfläche nachweisbar (Abb. 5.3 und 5.4, Tab. 5.2). Da nicht von allen verwendeten Ak die genauen Epitope bekannt sind, kann aus dem fehlenden Nachweis im FACS mit einzelnen Ak nicht zwangsläufig auf mangelnde Zelloberflächenexpression geschlossen werden. Den verkürzten Isoformen fehlen durch den Verlust von ein oder zwei Domänen wahrscheinlich die Bindungsstellen für die meisten Ak, bis auf HCA2 und 4H84, die Aminosäuren der ersten Domäne $\alpha 1$ erkennen. Es war erwartet worden, daß die Domänen sich unabhängig vom weiteren Proteinkontext falten. Die Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, daß die Konformation der in den verkürzten HLA-G-Isoformen enthaltenen Domänen von derjenigen der HLA-G1-Isoform abweicht. Diese Schlußfolgerung ergibt sich

aus der unterschiedlichen Reaktivität verschiedener HLA-I- und HLA-G-spezifischer Ak in der intrazellulären FACS-Analyse. Während die mAk HCA2, 4H84 und MEM-G/9 gleich gut an HLA-G1 banden, war die Reaktivität von 4H84 und MEM-G/9 im Vergleich zu HCA2 mit den verkürzten Isoformen geringer (Abb. 5.5).

Der mAk HCA2 erkennt ein Epitop, das die Aminosäuren 78-83 in der α 1-Domäne von HLA-G umfaßt (Sernee *et al.* 1998, Seitz *et al.* 1998). Er bindet an alle HLA-G-Isoformen in der intrazellulären Durchflußzytometrie und der Westernblot-Analyse. Dabei korreliert seine Bindung mit der EGFP-Expression in den Transfektanten, die mit HLA-G-cDNA im bicistronischen Vektor pIRES2-EGFP etabliert wurden, und mit den in Lysaten der Transfektanten nachgewiesenen Mengen der HLA-G-Isoformen (Abb. 5.5 und 5.2). Im Unterschied dazu konnte mittels FACS-Analyse mit dem mAk 4H84 kein Nachweis für die Expression der verkürzten HLA-G-Isoformen erbracht werden. Dies war erstaunlich, da dieser Ak im Westernblot alle HLA-G-Isoformen erkennt (Abb. 5.2). Er wurde gegen ein Peptid aus den Aminosäuren 61-83 generiert, das auch das von HCA2 erkannte Epitop (As 78-83) enthält (McMaster *et al.* 1998). Während sich die As 61-83 über den Großteil der α -Helix der α 1-Domäne erstrecken, liegt das Epitop für HCA2 am Ende des α -helikalen Bereichs (Abb. 6.1). Der Ak 4H84 ist daher möglicherweise stärker davon abhängig, daß das von ihm erkannte Epitop in linearer Form vorliegt. Außerdem könnte durch die Assoziation mit anderen Proteinen die Bindung von 4H84 in der Zelle behindert sein, während das Epitop von HCA2 zugänglich bleibt. Die Chaperone Calretikulin und Calnexin assoziieren unter Beteiligung des glykosylierten Asn 86 in der α 1-Domäne mit HLA-I-Ketten. Ob diese Proteine oder andere das Epitop von 4H84 maskieren, ohne die Bindung von HCA2 zu behindern, ist allerdings noch nicht geklärt. Im Gegensatz zu Transfektanten in der Zelllinie K-562 bindet der mAk 4H84 in der intrazellulären FACS-Analyse an alle Isoformen von .221 HLA-G-Transfektanten. Die HLA-G-Mengen in den .221-Transfektanten sind größer als die in K-562. In der Zelllinie K-562 ist die Expression der HLA-G-Isoformen in passender Konformation möglicherweise für einen Nachweis mit diesem Ak im FACS zu niedrig. Daß der mAk MEM-G/9 HLA-G1 intrazellulär und auf der Zelloberfläche aufzeigte, aber HLA-G2 nur intrazellulär, spricht gegen eine Zelloberflächenexpression von HLA-G2 (Abb. 5.3 und 5.5). Da in der intrazellulären FACS-Analyse dieser Ak nicht an die HLA-G4-Transfektante band, kann über die Zelloberflächenexpression von HLA-G4 mit Hilfe des Ak MEM-G/9 keine Aussage gemacht werden. Das Epitop von MEM-G/9 ist nicht näher charakterisiert. Es könnte daher im Bereich der α 3-Domäne liegen, die der HLA-G4 Isoform fehlt.

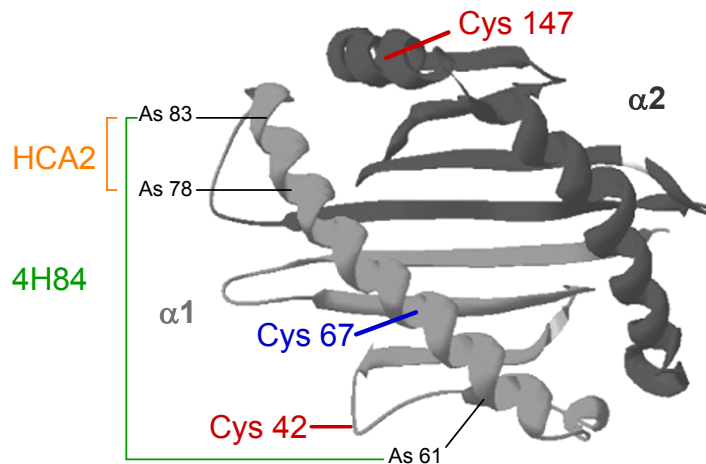


Abb. 6.1: Lage der Epitope von HCA2 und 4H84 und der freien Cysteinreste in HLA-G- und HLA-B27-schweren Ketten

Die α 1- (hellgrau) und α 2-Domäne (dunkelgrau) von HLA-G sind in der Aufsicht gezeigt. Die Positionen der freien Cysteinreste von HLA-G (As 42 und As 147) und HLA-B27 (As 67) sind in rot bzw. blau gekennzeichnet. Die Bereiche in der α 2-Domäne von HLA-G, an welche die mAK HCA2 und 4H84 binden, sind in orange bzw. grün markiert (abgeändert aus Hunt *et al.* 2003).

Andere Arbeitsgruppen haben die Expression der HLA-G-Isoformen mit Hilfe von Fusionsproteinen untersucht, die den Nachweis durch Ak gegen die entsprechenden „Tags“, also unabhängig von der Konformation der HLA-G-Anteile erlauben. Durch Westernblot-Analyse und Immunhistochemie von Zellen, die mit cDNA transfiziert worden waren, die für Fusionsproteine von HLA-G2, -G3 oder -G4 mit EGFP kodieren, wurde gezeigt, daß diese Proteine translatiert werden. Aber im Gegensatz zu HLA-G1-EGFP konnten sie durch FACS-Analyse nicht auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Mit konfokaler Zwei-Farben-Mikroskopie wurde demonstriert, daß die HLA-G-Isoformen mit Calnexin im ER kolokalisieren, aber nur HLA-G1-EGFP auch in äußeren Bereichen der Zelle zu finden ist (Mallet *et al.* 2000). Auch bei HLA-G-Proteinen, die mit einem viralen Tag versehen wurden, sind die Isoformen intrazellulär, jedoch nicht auf der Zelloberfläche durch FACS-Analyse oder Biotinylierung nachweisbar (Bainbridge *et al.* 2000 b). Diese Daten korrelieren mit der Endo H-Sensitivität der HLA-G-Isoformen. Nur von HLA-G1 und der sezernierten Isoform HLA-G5 ist ein Anteil Endo H-resistenter Moleküle nachweisbar, während die verkürzten Isoformen vollständig sensitiv sind (Abb. 5.2). Es gibt allerdings auch Proteine, die mit unreifen Oligosaccharidketten an die Zelloberfläche transportiert werden können. Über diese Eigenschaft wurde von dem HLA-I-ähnlichen Molekül CD1d berichtet. CD1d gelangt in Assoziation mit β 2m als reifes Molekül und in β 2m-negativen Zellen als Endo H-sensitives Protein an die Zelloberfläche (Kim *et al.* 1999). Von HLA-G-Transfektanten einer HLA-I-positiven Melanomzelllinie wurde berichtet, daß die verkürzten Isoformen HLA-G2, -G3 und -G4 als unreife Glykoproteine auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Menier *et al.* 2003, Riteau *et al.* 2001). Die Expression von HLA-G wurde meist in Zelllinien wie .221 und K-562 untersucht, die keine oder kaum endogene HLA-I-Antigene exprimieren. MHC-I-Antigene können Dimere aus schweren Ketten und Multimere bilden (Triantafilou *et al.* 2000). Die Zelloberflächenexpression der HLA-G-Isoformen in der Melanomzelllinie könnte durch eine Assoziation mit als Chaperon wirkenden Molekülen, wie klassischen HLA-I-Molekülen, zustande kommen, die es den verkürzten Isoformen erlauben, der ER-Retention zu entkommen. In Cytotrophoblasten kämen dafür allerdings nur HLA-E und HLA-C in Frage, da diese Zellen negativ für

HLA-A und HLA-B sind (Hutter *et al.* 1996, King *et al.* 2000 a und b). Jedoch ist es auch denkbar, daß die HLA-G-Polypeptide in Assoziation mit anderen Proteinen an die Zelloberfläche gelangen. So assoziiert das Maus CMV Glykoprotein gp34 mit MHC-I-Molekülen und trägt zwei Endo H-sensitive Oligosaccharide (Kleijnen *et al.* 1997). Auch das Hitzeschockprotein BiP (Glucose regulated protein 78 = GRP78) tritt auf der Zelloberfläche im Komplex mit vollständigen HLA-I-Komplexen auf, und Calretikulin wurde auf der Zelloberfläche in Assoziation mit HLA-I-schweren Ketten nachgewiesen (Arosa *et al.* 1999, Triantafilou *et al.* 2001).

Zelltypabhängig könnten die verkürzten Isoformen unter bestimmten Bedingungen, z.B. bei Hochregulation von als Chaperon wirkenden Molekülen, möglicherweise an die Zelloberfläche transportiert werden. In den HLA-Ia-negativen Zelllinien K-562 und .221 werden sie im Unterschied zu HLA-G1 jedoch nicht auf der Zelloberfläche exprimiert.

6.1.2 Assoziation der HLA-G-Isoformen mit $\beta 2m$

HLA-I-Polypeptide gelangen in der Regel als Komplexe mit $\beta 2m$ und Peptid auf die Zelloberfläche. Die MHC-I-ähnlichen Antigene MICA (MHC class I related chain A) werden jedoch ohne $\beta 2m$ und Peptid auf der Zelloberfläche exprimiert (Groh *et al.* 1996). Sie sind hoch polymorph und weisen eine 30%ige Homologie zu HLA-Ia-Antigenen auf. Sie besitzen wie die HLA-I-Antigene drei extrazelluläre Domänen. Von alternativen Transkripten ohne Exon 3 werden Varianten translatiert, denen wie der Isoform HLA-G2 die $\alpha 2$ -Domäne fehlt und die dennoch auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Zou und Stastny 2002). Außerdem entstehen durch proteolytische Abspaltung von der Zelloberfläche auch lösliche Formen (Salih *et al.* 2002). Daher wurde untersucht, ob die HLA-G-Isoformen in Assoziation mit $\beta 2m$ vorliegen. HLA-G1 kann auf der Zelloberfläche von K-562-Transfektanten nicht nur mit HLA-I- und HLA-G-spezifischen Ak, sondern auch mit dem $\beta 2m$ -spezifischen Ak BBM.1 nachgewiesen werden (Abb. 5.3). Eine Inkubation mit $\beta 2m$ erhöhte die Bindung HLA-I- oder HLA-G-spezifischer Ak nicht, und der Nachweis mit Ak gegen denaturierte schwere Ketten fiel abgesehen von HCA2 negativ aus, so daß die meisten HLA-G1-Moleküle auf der Zelloberfläche in Assoziation mit $\beta 2m$ vorliegen. Die HLA-G-Isoformen HLA-G1 und HLA-G5 konnten mit $\beta 2m$ kopräzipitiert werden (Abb. 5.8 b). Es handelt sich dabei um die beiden Isoformen, die alle drei extrazellulären Domänen $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ besitzen. An der Interaktion von MHC-I-schweren Ketten mit $\beta 2m$ sind alle drei extrazellulären Domänen beteiligt. Vor allem die $\alpha 3$ -Domäne enthält Aminosäurereste, die für die nicht-kovalente Assoziation mit $\beta 2m$ wichtig sind (Bjorkman *et al.* 1987 b, Saper *et al.* 1991, Tysoe-Calnon *et al.* 1991). Dies zeigt sich darin, daß $\beta 2m$ -Moleküle an isolierte $\alpha 3$ -Domänen binden können (Whitman *et al.* 2000). Alle für die Interaktion mit $\beta 2m$ verantwortlichen Reste in der $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Domäne sind bei HLA-G konserviert (Tysoe-Calnon *et al.* 1991). HLA-G4 fehlt die $\alpha 3$ -Domäne. Mit einem um diese Domäne verkürzten Maus MHC-I-Antigen H-2D^b läßt sich kein $\beta 2m$ kopräzipitieren (Williams *et al.* 1989). So scheint auch die Wechselwirkung von $\beta 2m$ nur mit der $\alpha 1$ - und der $\alpha 2$ -Domäne von HLA-G für eine feste Assoziation nicht ausreichend zu sein, so daß HLA-G4 in $\beta 2m$ -Präzipitaten nicht nachweisbar ist (Abb. 5.8 b). Im HLA-G2-

Molekül ist die für die Interaktion mit $\beta 2m$ wichtige $\alpha 3$ -Domäne enthalten. Dennoch konnten auch hier keine Dimere aus HLA-G2-schwerer Kette und $\beta 2m$ nachgewiesen werden (Abb. 5.8 b). HLA-G2 fehlt die $\alpha 2$ -Domäne der Volle-Länge-HLA-G-Isoform. Es existieren keine Daten über die Kristallstruktur der verkürzten HLA-G-Isoformen. Diese nehmen möglicherweise Konformationen ein, die trotz des Vorhandenseins einer zur Interaktion mit $\beta 2m$ theoretisch ausreichenden Anzahl von Resten keine stabile Assoziation erlauben. Für HLA-G2 hat es Hinweise auf eine Assoziation mit $\beta 2m$ gegeben, die auf dem Nachweis dieser Isoform durch den mAk W6/32 beruhen. Dieser mAk erkennt ein konformationsabhängiges Epitop, das von der HLA-I-schweren Kette und $\beta 2m$ gemeinsam gebildet wird. Auf der Seite der HLA-I-schweren Kette sind dabei die $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Domäne beteiligt (Jefferies und MacPherson 1987, Shields und Ribaudo 1998, Tanabe *et al.* 1992). HLA-G2 wurde nach Biotinylierung der Zelloberflächenmoleküle mit W6/32 präzipitiert (Rouas-Freiss *et al.* 1997). Dieses Ergebnis wurde als Zelloberflächenexpression von HLA-G2/ $\beta 2m$ -Dimeren interpretiert, widerspricht jedoch der Zerstörung des W6/32-Epitops durch Biotinylierung (Malik *et al.* 1999). HLA-G2 wird allerdings auch in der immunzytochemischen Färbung von dem mAk W6/32 erkannt (Mallet *et al.* 2000). Diese Bindung könnte allerdings auf eine veränderte Konformation durch die Fixierung in Aceton zurückzuführen sein. Außerdem ist bekannt, daß W6/32 auch $\beta 2m$ -freie HLA-I-schwere Ketten, die mit Calnexin assoziiert vorliegen, und einige HLA-I-Allele in partiell denaturierter Form erkennt (Tran *et al.* 2001, Zhang und Salter 1998). In der intrazellulären FACS-Analyse von HLA-G1-, HLA-G2-, HLA-G3- und HLA-G4-Transfektanten reagierte W6/32 jedoch nur mit HLA-G1 (Abb. 5.5, Mallet *et al.* 2000).

Im Unterschied zu den Isoformen HLA-G1 und HLA-G5 sind HLA-G2 und HLA-G4 nicht in nachweisbaren Mengen mit $\beta 2m$ assoziiert. Eine Assoziation von HLA-G3 mit $\beta 2m$ ist durch das Fehlen der $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Domäne ebenfalls unwahrscheinlich.

6.1.3 Assoziation der HLA-G-Isoformen mit dem Peptidladekomplex und Präsentation von Peptiden

Nach der Assoziation der HLA-I-schweren Kette mit $\beta 2m$ und Calretikulin interagiert der Komplex mit dem Peptidtransporter TAP, der im Zytoplasma produzierte Peptide ins ER transloziert (siehe 1.1.2). Diese Assoziation wurde mittels Immunpräzipitation untersucht (Abb. 5.9). Wie schon von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, kopräzipitiert HLA-G1 mit TAP (Gobin *et al.* 1997, Lee *et al.* 1995). Im Gegensatz zu den Isoformen HLA-G1 und HLA-G2 ($\Delta\alpha 2$) konnte die Isoform HLA-G4 ($\Delta\alpha 3$) nicht mit TAP kopräzipitiert werden. Dieses Ergebnis entspricht der Assoziation von MHC-I-Antigenen mit dem TAP/Tapasin-Komplex über ihre $\alpha 3$ -Domäne (Carreno *et al.* 1995, Kulig *et al.* 1998, Suh *et al.* 1999, Yu *et al.* 1999). Die Isoformen HLA-G1 und HLA-G2 enthalten die $\alpha 3$ -Domäne, die bei der Isoform HLA-G4 fehlt. Es gibt auch Daten, welche die Beteiligung der $\alpha 2$ -Domäne an der Interaktion mit dem TAP/Tapasin-Komplex belegen (Beißbarth *et al.* 2000, Lewis *et al.* 1996, Neisig *et al.* 1996, Peace-Brewer *et al.* 1996, Yu *et al.* 1999). Die Interaktion über die $\alpha 2$ -Domäne von HLA-G4 ist für eine stabile Assoziation mit TAP/Tapasin jedoch nicht ausreichend. Während von HLA-G1 bekannt ist, daß es Peptide präsentiert, ist fraglich, ob die Assoziation von HLA-G2

mit TAP auch zu einer Beladung mit Peptid führt (Lee *et al.* 1995). HLA-G2 fehlt die $\alpha 2$ -Domäne, so daß diese Isoform wahrscheinlich keine geeignete Konformation besitzt, um Peptide zu binden. Anderen HLA-I-Antigenen entsprechend wird die Peptidbindegrube von HLA-G aus der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne gebildet (Geraghty *et al.* 1987). Allerdings wäre es möglich, daß zwei HLA-G2-Ketten miteinander kooperieren und ähnlich wie bei MHC-II-Molekülen die beiden $\alpha 1$ -Domänen eine gemeinsame Peptidbindungsstelle bilden. MHC-II-Moleküle bestehen aus einem Komplex aus einer 32-34 kDa schweren α - und einer 29-32 kDa schweren β -Kette mit je zwei extrazellulären Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ bzw. $\beta 1$ und $\beta 2$. Die Peptidbindungsfurche setzt sich aus der $\alpha 1$ - und $\beta 1$ -Domäne zusammen. Die Bedeutung der TAP-Assoziation von HLA-G2 bei fehlendem Zelloberflächentransport bleibt unklar.

In Übereinstimmung mit den Resultaten von Lee *et al.* lassen sich die sezernierten HLA-G5-Moleküle nicht mit TAP kopräzipitieren, obwohl sie alle extrazellulären Domänen, also auch die $\alpha 3$ -Domäne von HLA-G besitzen (Abb. 5.9). Daß HLA-G1 mit TAP kopräzipitiert werden kann, HLA-G5 aber nicht, muß auf Unterschieden dieser beiden Isoformen beruhen. Gegen eine entscheidende Beteiligung der TM-Region und des C-terminalen Anteils von HLA-G1 an der Assoziation mit dem TAP/Tapasin-Komplex sprechen Befunde, nach denen lösliche MHC-I-Moleküle an TAP/Tapasin binden können (Carreno *et al.* 1995, Suh *et al.* 1996). Dahingegen könnte sich der für die löslichen HLA-G-Isoformen spezifische, Intron 4-kodierte C-Terminus störend auf die Interaktion mit dem TAP/Tapasin-Komplex auswirken. Bei der Interpretation von Kopräzipitationen, die eine fehlende TAP-Assoziation mit MHC-I-schweren Ketten zeigen, muß berücksichtigt werden, daß einige HLA-I-Allele nur schlecht mit TAP assoziieren und dennoch Peptide auf der Zelloberfläche präsentieren (Neisig *et al.* 1996). Die erfolgte oder nicht erfolgte Kopräzipitation muß nicht die Situation *in vivo* widerspiegeln. Eine schwache Bindung an den TAP/Tapasin-Komplex kann für die Beladung mit Peptid ausreichend sein, aber durch die Lysebedingungen gelöst werden. So reduzieren oder verhindern Mutationen in der $\alpha 2$ -Domäne von HLA-A2 zwar die nachweisbare Interaktion mit dem TAP-Komplex, erlauben jedoch eine starke und stabile Zelloberflächenexpression bei normalem Peptidrepertoire (Beißbarth *et al.* 2000). Es ist also möglich, daß eine schwache Assoziation zwischen HLA-G5 und TAP zur Beladung mit Peptiden ausreicht, aber die Komplexe während der Lyse und Immunpräzipitation auseinanderfallen. Für diese Argumentation spricht, daß das Peptidrepertoire von HLA-G5 weitgehend dem von HLA-G1 gleicht (Ishitani *et al.* 2003, Lee *et al.* 1995).

Auf der Zelloberfläche exprimierte HLA-G1-Antigene sind mit hochaffinen Peptiden beladen. Die Expression läßt sich durch Inkubation mit Peptid nicht erhöhen (siehe 5.1.1). Die Bindung von niedrigaffinen Peptiden an HLA-G1 ist unabhängig von Tapasin (Park und Ahn 2003). HLA-G hat gegenüber anderen HLA-I-schweren Ketten eine verkürzte zytoplasmatische Domäne mit einem Dilysinmotiv, das zu einer partiellen Rückführung vom cis-Golgi zum ER führt, solange HLA-G1 mit suboptimalen Peptiden beladen ist (Park *et al.* 2001). In der Tapasin-defizienten Zelllinie 721.220 ist die Zelloberflächenexpression von HLA-G1 gering (Park und Ahn 2003). HLA-G1 und HLA-G5 können zwar in TAP-defizienten Zellen exprimiert werden, aber ihre Zelloberflächenexpression bzw. Sekretion ist auf ca. 20 % bzw. 5 % reduziert (Lee *et al.* 1995). Die Beladung mit hochaffinen Peptiden und der folgende

Transport zur Zelloberfläche von HLA-G1 sind abhängig von Tapasin. Durch Beladung mit hochaffinen Peptiden entkommt HLA-G1, möglicherweise über eine Konformationsänderung, die sich auf den zytoplasmatischen Anteil überträgt, der Rückführung ins ER (Park *et al.* 2001). Im Gegensatz zu HLA-G1 besitzt HLA-G5 aufgrund seines spezifischen Intron-kodierten C-terminalen Anteils nicht das Rückführungssignal der membranständigen HLA-G-Isoformen, so daß es nach Beladung mit niedrigaffinen Peptiden nicht ins ER zurück transportiert wird und in einem gewissen Ausmaß der TAP-Abhängigkeit entgeht. Durch einen Aminosäureaustausch an Position 114 (Glu114His) von HLA-G wird über eine möglicherweise dadurch hervorgerufene Konformationsänderung die Beladung mit hochaffinen Peptiden und der Transport von HLA-G1 unabhängig von Tapasin (Park und Ahn 2003). Die HLA-G5-Komplexe könnten entsprechend durch eine gegenüber HLA-G1 minimal abweichende Konformation der Peptidbindegrube die Bindung von hochaffinen Peptiden unabhängig von TAP/Tapasin erlauben. Dies wiederum würde die Notwendigkeit der Assoziation mit TAP reduzieren und so die fehlende Kopräzipitation mit TAP erklären. Umgekehrt könnte die Domänenstruktur der verkürzten Isoformen oder ihre Unfähigkeit, hochaffine Peptide zu binden, eine Inaktivierung des Rückführungssignal verhindern, so daß diese Moleküle zwischen ER und frühem Golgi rezirkulieren. Dies würde mit dem Ergebnis des Endo H-Verdau übereinstimmen, mit dessen Hilfe kein Transport der verkürzten Isoformen in den medialen Golgi nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.2).

Daß in der K-562-Transfektante nur HLA-G1 und HLA-G2, aber nicht HLA-G4 nachweisbar mit TAP assoziiert sind, steht im Widerspruch zu Ergebnissen in der Zelllinie .221. In .221 HLA-G-Transfektanten lassen sich die Isoformen HLA-G1, -G2, -G3 und -G4 mit dem TAP1-spezifischen mAk 148.3 kopräzipitieren (Maier 2000). Die Unterschiede in der Assoziation von HLA-G-Isoformen mit TAP in den .221- und den K-562-Transfektanten könnten auf die fehlende HLA-E- und HLA-F-Expression in der Zelllinie K-562 zurückzuführen sein. In .221 HLA-G-Transfektanten werden die HLA-G-Isoformen mit HLA-E durch den HLA-I-spezifischen mAk A1.4, der kein HLA-G erkennt, kopräzipitiert (Maier 2000). Dies könnte auf der Tatsache beruhen, daß je vier Tapasinmoleküle mit einem TAP-1/TAP-2-Heterodimer assoziiert sind und je ein MHC-I/ β 2m-Komplex pro Tapasin vorliegt. Daher können auch gemischte Komplexe auftreten, die HLA-G- und HLA-E-Antigene enthalten (Androlewicz *et al.* 1994, Ortmann *et al.* 1997). Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß die Assoziation der verkürzten HLA-G-Isoformen mit TAP nicht direkt über den TAP/Tapasin-Komplex, sondern über HLA-E stattfindet (siehe auch 6.1.1).

6.2 Die Zelloberflächenexpression und Dimerisierung von HLA-G1 ist abhängig von β 2m

Die Zelloberflächenexpression der meisten HLA-I-schweren Ketten ist von der Assoziation mit β 2m abhängig. Analysen von β 2m-negativen Zellen haben gezeigt, daß diese Untereinheit der MHC-I-Komplexe für korrekte Faltung, Bindung an Calretikulin und TAP, zur Peptidbeladung, zum Transport und zur Zelloberflächenexpression der HLA-I-schweren Ketten nötig ist (D'Urso *et al.* 1991, Solheim *et al.* 1997, Wang *et al.* 1993). Es gibt jedoch einige

HLA-I-schwere Ketten, die ohne $\beta 2m$ exprimiert werden können. Dazu gehört HLA-B27. Freie HLA-B27-schwere-Ketten, die nicht mit $\beta 2m$ assoziiert sind, wurden auf Tapasin-defizienten Zelllinien nachgewiesen (Peh *et al.* 1998). In der mit HLA-B27 transfizierten, TAP-defizienten Zelllinie T2 wurde gezeigt, daß sie dabei Homodimere bilden (Allen *et al.* 1999). Die Dimerisierung von HLA-B27 hängt von freien Cysteinresten an der Aminosäureposition 67 und von Resten in der B-Tasche der Peptidbindungsgrube ab (Allen *et al.* 1999, Dangoria *et al.* 2002). Die HLA-G-schwere Kette besitzt sogar zwei ungepaarte Cysteinreste. Sie liegen in der $\alpha 1$ -Domäne an der Aminosäureposition 42 und in der $\alpha 2$ -Domäne an der Aminosäureposition 147. Das Cystein an der Position 42 ist sehr leicht zugänglich, so daß eine Dimerisierung unter weitgehender Beibehaltung der Konformation denkbar ist (Abb. 6.1). Obwohl die meisten HLA-G1-Antigene in der Zelllinie K-562 als vollständige Komplexe mit $\beta 2m$ und Peptid auf der Zelloberfläche exprimiert werden, könnte ein Teil auch als freie HLA-G-schwere Ketten auftreten, da bei niedrigen Temperaturen die Bindung des mAk HCA2 stabilisiert wurde (Abb. 5.6, Abschnitt 5.1.1).

Um festzustellen, ob HLA-G1 in Abwesenheit von $\beta 2m$, möglicherweise als Homodimer, auf der Zelloberfläche exprimiert werden kann, wurden Experimente mit der $\beta 2m$ -negativen Burkitt-Lymphomzelllinie Daudi und einem bicistronischen cDNA-Expressionsvektor HLA-G1/EGFP durchgeführt. Daudi-Zellen exprimieren HLA-I-schwere Ketten, die aber aufgrund der fehlenden $\beta 2m$ -Proteinexpression schneller abgebaut werden und nicht auf die Zelloberfläche gelangen (Abb. 5.16 a). Trotz vergleichbarer HLA-G-Transkriptmengen in der Zelllinie JEG-3 und den HLA-G1/EGFP-Transfektanten der Zelllinien Daudi und K-562 (Abb. 5.15) ist die HLA-G-Polypeptidmenge in Abwesenheit von $\beta 2m$ erniedrigt, wie im Westernblot und der intrazellulären FACS-Analyse gezeigt (Abb. 5.17 und 5.18 b). Die Stärke der EGFP-Expression der HLA-G1/EGFP-Transfektanten in den Zelllinien K-562 und Daudi entsprechen sich (Abb. 5.18 c). Dies weist darauf hin, daß der Unterschied in der HLA-G1-Proteinexpression nicht auf einem allgemeinen Defekt in der Translationsmaschinerie der Daudi-Zellen, sondern auf einem Abbau der nicht korrekt gefalteten HLA-I-schweren Ketten beruht. HLA-G1-Moleküle der Daudi-Transfektante tragen nur unreife Oligosaccharidketten. Aus der Behandlung der Lysate mit Endo H ergibt sich somit kein Hinweis auf Transport der HLA-G-Antigene zur Zelloberfläche (Abb. 5.17). Außerdem ist HLA-G1 auf der Zelloberfläche der Daudi HLA-G1-Transfektanten mittels FACS-Analyse nicht nachweisbar (Abb. 5.18 a). Auch durch Inkubation mit humanem $\beta 2m$ können keine HLA-G-Antigene auf der Zelloberfläche stabilisiert werden. Die HLA-G1-schweren Ketten werden in Abwesenheit von $\beta 2m$ also im ER/Golgi zurückgehalten und anschließend abgebaut.

Der Nachweis der HLA-G1-Moleküle im Lysat der Daudi-Transfektanten erfolgte mit dem mAk 4H84. Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnte jedoch keine Homodimerbildung festgestellt werden (Abb. 5.19). Da die freien Cysteinreste des HLA-G-Polypeptids an den Aminosäurepositionen 42 und 147, die für eine Dimerisierung in Frage kommen, nicht im Bereich des Epitops für 4H84 (As 61-83) liegen, war es unwahrscheinlich, daß die Bindestelle für den mAk 4H84 durch die Dimerisierung verloren geht (Abb. 6.1). Auch in Immunpräzipitaten mit dem mAk MEM-G/1 konnten keine Dimere nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob eine HLA-G-Dimerbildung in Zellen mit normaler $\beta 2m$ -Expression

erfolgt, wurden entsprechende Untersuchungen auch mit K-562 HLA-G1-Transfektanten und der Zelllinie JEG-3 durchgeführt. Auch die dabei erhaltenen Resultate sprachen gegen eine Ausbildung von HLA-G-Homodimeren.

Später wurde durch andere Arbeitsgruppen gezeigt, daß sich in .221 HLA-G1-Transfektanten in Abhängigkeit von Cysteinresten an den Aminosäurepositionen 42 bzw. 42 und 147 HLA-G-Homodimere und -Homotrimere bilden. Die Homodimere können mit den Ak W6/32 und MEM-G/9 präzipitiert werden (Boyson *et al.* 2002, Gonen-Gross *et al.* 2003). Ihre Ausbildung und ihr Nachweis sind jedoch von der Anzahl der HLA-G-Antigene auf der Zelloberfläche abhängig. In .221 HLA-G-Transfektanten liegt nur ein geringer Teil der HLA-G-Antigene im Lysat als Dimere vor. In Übereinstimmung mit den oben diskutierten Ergebnissen wurden in der Zelllinie JEG-3 jedoch keine HLA-G-Dimere nachgewiesen (Boyson *et al.* 2002). Bei dem geringen Anteil der Dimere im Lysat reicht die Sensitivität des Westernblots für den Nachweis in der Zelllinie JEG-3 und in den K-562-Transfektanten möglicherweise nicht aus. Die Dimere machten im Lysat der .221 HLA-G-Transfektante zwar nur einen kleinen Prozentsatz, auf der Zelloberfläche jedoch den Großteil der schweren HLA-G-Ketten aus (Boyson *et al.* 2002). Dies spricht für eine Dimerisierung auf der Zelloberfläche in Abhängigkeit von der HLA-G1-Antigendichte und liefert eine zusätzliche Erklärung für den fehlenden Nachweis der Homodimere in den Daudi-Transfektanten, bei denen HLA-G1 nicht an die Zelloberfläche gelangt. Außerdem konnten die Dimere in der Zelllinie .221 mit dem β 2m-spezifischen mAk BBM1 präzipitiert werden (Boyson *et al.* 2002). Dies spricht ebenfalls gegen eine Ausbildung der Dimere in β 2m-negativen Zellen.

Daß die Ausbildung von Homodimeren und die Zelloberflächenexpression von HLA-I-Antigenen abhängig von der Assoziation mit β 2m ist, zeigen auch die Experimente mit der Daudi HLA-B27-Transfektante. Zur Detektion der HLA-B27-Dimere wurde der mAk HC10 eingesetzt, der gegen denaturierte HLA-B- und -C-Allele gerichtet ist. Das Epitop liegt in der α 1-Domäne im Bereich um die Aminosäure 60 (Sernee *et al.* 1998). Es wird durch die Dimerisierung nicht zerstört, da dieser mAk an HLA-B27-Dimere in T2-HLA-B27-Transfektanten bindet (Allen *et al.* 1999). Dennoch konnten mittels Westernblot-Analyse in der Daudi HLA-B27-Transfektante keine HLA-B27-Homodimere nachgewiesen werden. Wie auch bei der HLA-G1-Transfektante ergaben FACS-Analysen der HLA-B27-Transfektante keinen Nachweis von HLA-I-schweren Ketten auf der Zelloberfläche, obwohl Ak wie W6/32 eingesetzt wurden, deren Reaktivität mit HLA-B27-Dimeren belegt ist (Abb. 5.18 a, Abb. 5.21, Allen *et al.* 1999). Anhand von Milzzellen aus β 2m-defizienten, HLA-B27-transgenen Mäusen wurde gezeigt, daß die Expression von W6/32-reaktiven HLA-B27-Dimeren in Zellen ohne β 2m ausbleibt (Dangoria *et al.* 2002). Dies bestätigt, daß in Abwesenheit von β 2m keine Dimerisierung von HLA-B27 erfolgt.

Da geringe Mengen an HLA-I-Antigenen ausreichen können, um die Aktivität von Effektorzellen zu beeinflussen, wurden die Daudi-Transfektanten abschließend funktionell getestet. Eine Voraussetzung für die Funktion von MHC-I-Molekülen ist ihre Bindung an Rezeptoren von Effektorzellen. Wechselwirkungen von Rezeptoren mit MHC-I-Antigenen können von der Anwesenheit von β 2m abhängig sein, wie dies in der Maus für den Ly-49-Rezeptor der Fall

ist (Michaelsson *et al.* 2001). HLA-B27-Homodimere können zwar nicht mehr an den inhibitorischen Rezeptor ILT2, jedoch noch an ILT4 binden und beeinflussen wahrscheinlich die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen (Allen *et al.* 2001, Boyle *et al.* 2001). Es stellte sich daher die Frage, ob HLA-G in Abwesenheit von β 2m funktionell exprimiert werden kann. Da NK-Zellen Daudi nicht lysieren, wurden LAK als Effektorzellen ausgewählt. Die Expression von HLA-G1 wirkte sich gegenüber der Vektorkontrolltransfektante jedoch nicht inhibierend auf die Lyse von Daudi aus (Abb. 5.22 a). Da die Rezeptoren ILT2 und BY55 auf bis zu 48 % bzw. den meisten zirkulierenden $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert werden, wurde die HLA-G-Expression der Daudi-Transfektanten auch auf ihre Wirkung auf $\gamma\delta$ T-Zellen getestet (Anumanthan *et al.* 1998, Maiza *et al.* 1993, Young *et al.* 2001). Die HLA-G1-Expression in Daudi inhibierte jedoch auch nicht die Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 5.23). Daudi-Zellen aktivieren V γ 9/V δ 2 T-Zellen, was sich nicht nur in einer erhöhten Zytotoxizität, sondern auch in der Stimulation der Proliferation zeigt (Abb. 5.24). Bei den Daudi HLA-G1 traten klonale Unterschiede auf, die nicht mit der HLA-G1-Expression korrelierten. Möglicherweise beruhen sie auf unterschiedlich starker Expression des stimulatorisch wirkenden Antigens auf den Daudi-Zellen. Art und Ausmaß der Effektorfunktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen, die durch Stimulation zustande kommen, sind abhängig von der V γ 9/V δ 2-Subpopulation (TCR), der klonal verteilten Expression von passenden KIR und der Expression von kostimulatorischen Molekülen und Adhäsionsmolekülen. So wird der aktivierende Rezeptor NKG2D auf $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert und kann mit ULBP1 (UL16 binding protein 1) auf Daudi-Zellen interagieren (Bauer *et al.* 1999, Pende *et al.* 2002). Das Expressionsniveau von ULBP1 auf Daudi ist zwar gering, aber die Interaktion mit NKG2D auf $\gamma\delta$ T-Zellen kann als zusätzliches, aktivierendes Signal zur Lyse von Daudi durch V γ 9/V δ 2 T-Zellen beitragen (Pende *et al.* 2002). Klonale Unterschiede in der Expression von ULBP1 können so das Ausmaß der Aktivierung mit bestimmen. Die fehlende Funktion von HLA-G1 in den Daudi-Transfektanten bestätigt die β 2m-abhängige Zelloberflächenexpression der HLA-G1-Antigene.

6.3 Funktion von HLA-G

6.3.1 Geringe inhibitorische Wirkung der HLA-G1-Expression in der Zelllinie K-562 auf die zytotoxische Aktivität von Effektorzellen

In dieser Arbeit sollte der Einfluß der Expression der HLA-G-Isoformen auf die zytotoxische Aktivität der Zelllinie NKL, NK-Zellen und LAK untersucht werden. Während die HLA-E-Expression ausreichte, um die Lyse von K-562 HLA-E-Transfektanten zu inhibieren, reduzierten HLA-G1-Transfektanten die zytotoxische Aktivität von NKL nur in Ausnahmefällen (Abb. 5.10). Nur der HLA-G1-Klon 15, der das höchste Expressionsniveau aufwies, war reproduzierbar vor Lyse geschützt (Abb. 5.10 b). Dies war überraschend, da auf den K-562 die HLA-G1-Expression stärker als die HLA-E-Expression war und auf den NKL die ILT2-Expression gegenüber der CD94-Expression überwog (Abb. 5.11 und 5.12 a). Die inhibitorische Signalweiterleitung über den CD94/NKG2A-Rezeptor scheint effektiver zu sein als die über ILT2. Dies zeigt sich auch darin, daß die K-562 HLA-B27-Transfektante meist nicht vor Lyse geschützt war (Abb. 5.10 a). Das Signalpeptid aus HLA-B27 bindet nicht an HLA-E und inhibiert daher nicht über CD94/NKG2A (Borrego *et al.* 1998). HLA-B27

interagiert aber mit ILT2 (Chapman *et al.* 1999, Colonna *et al.* 1997, Navarro *et al.* 1999). Die Rezeptoren CD94/NKG2A und ILT2 unterscheiden sich in den Affinitäten zu ihren jeweiligen Liganden. HLA-E gefaltet mit dem Peptid aus der Signalsequenz von HLA-G oder HLA-B7 bindet mit Dissoziationskonstanten K_D von ca. 2,3 μM bzw. 11,2 μM an CD94/NKG2A (Valés-Gómez *et al.* 1999). Die Dissoziationskonstanten K_D für HLA-G1 bzw. HLA-B27 und ILT2 betragen ca. 100 μM bzw. 90 μM (Chapman *et al.* 1999). Die Affinität von CD94/NKG2A zu HLA-E ist damit größer als die von ILT2 zu seinen Liganden und könnte die gegenüber HLA-G effektivere Inhibition der Lyse durch HLA-E erklären. Außerdem wurde auch eine Bindung von HLA-E an ILT2 nachgewiesen ($K_D = 40 \mu\text{M}$), so daß man spekulieren könnte, daß HLA-E sowohl über CD94/NKG2A als auch über ILT2 die Zytotoxizität der NKL beeinflusst (Chapman *et al.* 1999). Allerdings steht dies im Widerspruch zu funktionellen Analysen, in denen HLA-E keine ILT2-vermittelte Inhibition induzieren konnte (Navarro *et al.* 1999). Neben der Affinität zu ihren Liganden könnten sich auch die Signalwege der Rezeptoren unterscheiden. Die von ILT2 und CD94/NKG2A ausgehenden Signalwege sind nicht im Detail bekannt, aber beide Rezeptoren wirken über Tyrosinphosphorylierung der zytoplasmatischen ITIM und Rekrutierung von SHP-1 (Carretero *et al.* 1998, Colonna *et al.* 1997, Cosman *et al.* 1997, Fanger *et al.* 1998). Im Gegensatz zu NKG2A wurde für ILT2 bisher keine Assoziation mit SHP-2 nachgewiesen (Colonna *et al.* 1997, Le Drean *et al.* 1998). Die im Vergleich zu HLA-E geringere Inhibition durch HLA-G1 könnte damit auf der fehlenden Aktivierung des Signalweges über SHP-2 beruhen. Außerdem unterscheidet sich der zytoplasmatische Anteil von HLA-G von dem von HLA-E. HLA-G fehlt ein hoch konservierter Tyrosinrest, der als Substrat für Tyrosinkinase dient. Dies könnte funktionelle Auswirkungen auf die Signalvermittlung in der Zielzelle haben (Geraghty *et al.* 1987).

Abgesehen von den inhibitorischen Rezeptoren CD94/NKG2A und ILT2 exprimiert die Zelllinie NKL auch aktivierend wirkende Rezeptoren. CD94 kann in Assoziation mit NKG2C, NKG2E und NKG2H aktivierende Korezeptoren bilden. CD94/NKG2C bindet an HLA-E. Die Expression der NKG2C-Transkripte ist in der Zelllinie NKL nachgewiesen, aber tritt in weit geringeren Mengen als NKG2A/B-mRNA auf (Brostjan *et al.* 2002). Wahrscheinlich spielt die Zelloberflächenexpression keine große Rolle, weil die detektierbaren CD94-Moleküle auf der Zelloberfläche mit NKG2A assoziiert sind (Le Dréan *et al.* 1998). Da zu dem Zeitpunkt keine spezifischen Ak für die NKG2-Formen existierten, konnte die Expression auf der Zelloberfläche nicht kontrolliert werden. Außerdem treten in der Zelllinie NKL aktivierende Rezeptoren auf, die mit HLA-G interagieren können. Es wurde eine schwache Expression von KIR2DL4 und des noch wenig charakterisierten, kostimulatorisch wirkenden Rezeptors CD160 (BY55) beschrieben (Anumanthan *et al.* 1998, Menier *et al.* 2002, Rajagopalan *et al.* 2001). Zusätzlich sind K-562 positiv für ULBP1, einen Liganden des aktivierenden Rezeptors NKG2D, der ebenfalls auf NKL nachweisbar ist (Bauer *et al.* 1999, Cosman *et al.* 2001). Inhibitorische Signale über KIR können dominant über das aktivierende Signal durch NKG2D sein (Pende *et al.* 2001). Für die MICA exprimierende Melanomzelllinie M8 wurde gezeigt, daß Lyse durch die Zelllinie NKL zu einem großen Teil durch die Interaktion von MICA und NKG2D vermittelt wird. Transfektion der M8-Zellen mit HLA-G1 reduzierte die MICA-vermittelte Lyse durch die Zelllinie NKL (Menier *et al.* 2002). Die Expression der Rezeptoren KIR2DL4, BY55, CD94/NKG2A und NKG2D auf den NKL einerseits und der Liganden MHC-I und ULBP1 auf

den K-562 andererseits legen, möglicherweise im Zusammenspiel mit weiteren noch nicht charakterisierten Rezeptoren, die Schwelle für die Aktivierung der NKL fest.

Diese Schwelle wird in den .221-Transfektanten leichter als in den K-562-Transfektanten erreicht. Ob Zielzellen durch NK-Zellen lysiert werden, ist abhängig von der Ligandendichte für die KIR und KAR. NK-Zellen, die aktivierend und inhibierend wirkende Rezeptoren für den gleichen Liganden koexprimieren, werden bei hoher Ligandendichte inhibiert und bei niedriger Ligandendichte aktiviert (Warren *et al.* 2001). Die geringe inhibitorische Wirkung der HLA-G-Expression in der Zelllinie K-562 beruht daher zum Teil auf einer geringeren Anzahl von MHC-I-Antigenen auf der Zelloberfläche dieser Zelllinie. Die Expressionsstärke von HLA-G, die in der Zelllinie K-562 erreicht wurde, war auch durch mehrmalige Sortierung der Zellen auf hohe HLA-G-Expression nicht zu steigern. Für die Herstellung der Transfektanten in den Zelllinien .221 und K-562 waren verschiedene Vektoren verwendet worden. Für die .221 HLA-G-Transfektanten waren die Vektoren pREP7 und pREP10 eingesetzt worden, die den starken 3'-LTR-Promotor („long terminal repeat“) des Rous-Sarcoma Virus enthalten. Da diese Vektoren nicht ins Genom integrieren und leichter ein Verlust der HLA-I-Expression eintritt, wurden für die Herstellung stabiler Transfektanten in der Zelllinie K-562 die Vektoren pcDNA3.1 und pIRES2-EGFP gewählt, die beide einen HCMV-Promotor besitzen. Dieser ist normalerweise stärker als der RSV-Promotor (Foecking und Hofstetter 1986). Die unterschiedlich starke Expression von HLA-G in den Zelllinien K-562 und .221 treten auch in Veröffentlichungen von anderen Gruppen zutage, bei denen Transfektanten in beiden Zelllinien verwendet wurden. Allerdings kamen dabei auch unterschiedliche Vektoren zum Einsatz (K-562 mit Vektor pcDNA, .221 mit genomischer DNA vom HLA-G-Locus) (Münz *et al.* 1997, Riteau *et al.* 1999).

Nicht nur HLA-G1, sondern auch HLA-B27 und HLA-Cw03 werden nur in geringem Ausmaß auf der Zelloberfläche von K-562-Transfektanten exprimiert (Abb. 5.11 und nicht gezeigt). Während die K-562 HLA-B27-Transfektante lysiert wurde, kann in .221-Transfektanten ILT2 an HLA-B27 binden und die Lyse durch NKL inhibieren. Die Inkubation mit Ak gegen ILT2 kann die Inhibition der Lyse aufheben (Colonna *et al.* 1997). Außerdem besitzt die Koexpression von HLA-E mit HLA-G in der Zelllinie .221 einen additiven inhibitorischen Effekt auf die Zytotoxizität der Effektorzellen (Navarro *et al.* 1999). Zudem sind .221 negativ für die NKG2D-Liganden MICA, ULBP1, ULBP2, ULBP3 und ULBP4 (Pende *et al.* 2002). Das fehlende stimulatorische Signal über NKG2D und die höheren Expressionsmengen von HLA-G und HLA-E könnten für die leichtere Inhibition der Lyse von .221-Transfektanten verantwortlich sein. Die Erkennung von HLA-E und HLA-Ia-Antigenen durch CD94/NKG2A bzw. KIR kann auch vom gebundenen Peptid abhängen (Brooks *et al.* 1999, Garcia *et al.* 2002, Malnati *et al.* 1995, Michaelsson *et al.* 2002, Peruzzi *et al.* 1996; Rajagopalan und Long 1997). Bisher wurden hauptsächlich HLA-G-Peptidliganden aus .221 HLA-G-Transfektanten untersucht, und es existieren keine Daten über HLA-G gebundene Peptide in K-562 HLA-G-Transfektanten (Diehl *et al.* 1996, Lee *et al.* 1995). Die Möglichkeit, daß zwischen den Zelllinien .221 und K-562 eine Variabilität in den für HLA-G zur Verfügung stehenden Peptidliganden eine unterschiedlich gute Erkennung verursachen könnte, wird durch eine kürzlich erschienene Veröffentlichung unterstützt. Die Analyse von aus Plazenta isolierten

HLA-G1- und HLA-G5-Komplexen ergab Unterschiede in der Anzahl und der relativen Häufigkeit der gebundenen Peptide gegenüber den Ergebnissen mit .221 HLA-G-Transfektanten (Ishitani *et al.* 2003).

Auf .221 HLA-G1-Transfektanten führt die Dimer- und Trimerisierung von HLA-G1-Molekülen zu einer erhöhten Avidität für ILT2 und einer verstärkten Inhibition der Lyse durch NK-Zellen (Boyson *et al.* 2002, Gonen-Gross *et al.* 2003). Die Mengenverhältnisse zwischen Monomeren, Dimeren und Trimeren sind dabei variabel (Gonen-Gross *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu konnten in Lysaten von K-562-Transfektanten keine Dimere nachgewiesen werden, was die geringe inhibitorische Funktion der HLA-G-Expression in den K-562 über ILT2 mit erklären kann (Abb. 5.19). Aber auch in der natürlicherweise HLA-G exprimierenden Zelllinie JEG-3 wurde keine Dimerisierung festgestellt (Abschnitt 5.2, Boyson *et al.* 2002). Das stellt die Notwendigkeit der Oligomerisierung von HLA-G, um Effektorfunktionen modulieren zu können, in Frage. Allerdings könnte die Dimerisierung von HLA-G eine Möglichkeit sein, die Avidität von HLA-G für verschiedene Rezeptoren, z.B. ILT2, KIR2DL4 und BY55 unterschiedlich zu regulieren. So ist eine optimale Bindung von BY55 von der Aggregation von MHC-I-Komplexen abhängig (Agrawal *et al.* 1999). In der Zelllinie K-562 liegt nur eine geringe Menge von HLA-G1- und auch von HLA-B27-Molekülen in einer Konformation vor, in der sie die Zytotoxizität über ILT2 hemmen können.

6.3.2 Funktion der verkürzten HLA-G-Isoformen

Die Frage, ob die verkürzten HLA-G-Isoformen eine biologische Funktion ausüben, wird noch immer kontrovers diskutiert. Die Isoformen HLA-G2 ($\Delta\alpha2$) und -G4 ($\Delta\alpha3$) werden nicht mit $\beta2m$ kopräzipitiert (Abb. 5.8). Darin gleichen diese verkürzten Isoformen den Klasse-I-ähnlichen Molekülen MICA und ULBP. Die ULBP sind Glykoproteine, deren $\alpha1$ - und $\alpha2$ -Domänen zu 20 % aus hoch konservierten Resten in den entsprechenden Domänen von MHC-Ia- und -Ib-Polypeptiden bestehen. Die meisten in den MHC-I-Antigenen konservierten Reste für die Peptidbindung fehlen ihnen jedoch, so daß sie wahrscheinlich keine Peptide präsentieren. ULBP werden auf der Zelloberfläche exprimiert, wo sie im Unterschied zu den MHC-I-Antigenen über einen Glykosylphosphatidylinositolanker befestigt sind. ULBP sind nicht mit $\beta2m$ assoziiert und besitzen keine $\alpha3$ -Domäne (Cosman *et al.* 2001). Damit ist die Übereinstimmung mit HLA-G4 ($\Delta\alpha3$) besonders groß. Von den MICA- und MICB-Antigenen wiederum existieren auf der Zelloberfläche exprimierte Varianten, denen wie der Isoform HLA-G2 die $\alpha2$ Domäne fehlt (Zou und Stastny 2002). Entsprechend ist theoretisch vorstellbar, daß die verkürzten HLA-G-Isoformen auch ohne Assoziation mit $\beta2m$ auf die Zelloberfläche gelangen. Wie unter 6.1.1 diskutiert, war mittels FACS-Analyse jedoch keine Zelloberflächenexpression der Isoformen in der Zelllinie K-562 nachweisbar. Auch ergaben die funktionellen Analysen keine Inhibition der Lyse durch die Zelllinie NKL, PBL, NK- oder LAK-Zellen (Abschnitt 5.1.3). Allerdings erzielte auch schon die nachweisbare Expression von HLA-G1 in K-562 nicht immer einen Effekt. Für HLA-G2 wurde ein inhibitorischer Einfluß auf NK-Zellen beschrieben, der nicht durch CD94 vermittelt wird (Rouas-Freiss *et al.* 1997). In Transfektanten einer Melanomzelllinie inhibierten die verkürzten Isoformen HLA-G2, -G3

und -G4 die lytische Aktivität von NK-Zellen und Antigen-spezifischen CTL. Die Inhibition ließ sich durch HLA-G-spezifische Ak allerdings nicht aufheben. Ein Effekt von HLA-E wurde ausgeschlossen, da Ak gegen NKG2A die Hemmung nicht aufhoben und die Isoformen auch die CD94/NKG2A-negative Zelllinie YT2C2 inhibierten (Riteau *et al.* 2001). Der inhibitorische Effekt der verkürzten Isoformen kann zum Überleben von Föten beitragen, die homozygot für das Allel HLA-G*0105N sind, das eine Leserasterdeletion in der $\alpha 2$ -Domäne kodiert, welche die HLA-G1-Expression verhindert (Castro *et al.* 2000, Matte *et al.* 2000, Ober *et al.* 1998). Die Allelfrequenzen für dieses Allel betragen zwischen 2,3% in kaukasischer und 7,4% in der amerikanischen Bevölkerung afrikanischer Abstammung (Ober *et al.* 1998, van der Ven *et al.* 1998 a). HLA-G2 ($\Delta\alpha 2$), HLA-G6 („lösliches“ HLA-G2, $\Delta\alpha 2$), HLA-G3 ($\Delta\alpha 2$, $\Delta\alpha 3$) und HLA-G7 („lösliches“ HLA-G3, $\Delta\alpha 2$, $\Delta\alpha 3$) können auch von der mRNA des Allels HLA-G*0105N translatiert werden. In diesen Isoformen wirkt sich die Deletion eines Cytosins im Exon 3 nicht aus, da dieses Exon herausgepleißt wird. HLA-G6 könnte besonders wichtig für die Schwangerschaft sein, da es auch im Blut von Schwangeren nachgewiesen wurde (Hunt *et al.* 2000, Rebmann *et al.* 1999). Die verkürzten Isoformen könnten also über einen bisher noch nicht charakterisierten Mechanismus eine inhibierende Funktion ausüben. Jedoch wurden in Plazenta- oder Blutproben bisher nur die Proteine HLA-G1, -G2, -G5 und -G6, aber nicht HLA-G3, -G4 oder -G7 nachgewiesen (Abb. 5.2, Blaschitz *et al.* 1997, Hunt *et al.* 2000, Puppo *et al.* 1999, Rebmann *et al.* 1999, McMaster *et al.* 1998, Morales *et al.* 2003).

Selbst wenn man von einer Zelloberflächenexpression der verkürzten HLA-G-Isoformen ausgeht, ist nicht bei allen eine stabile Bindung an die bekannten Rezeptoren zu erwarten. Die Bindung von ILT2 an MHC-I erfolgt über die N-terminale D1-Domäne von ILT2 und die konservierte $\alpha 3$ -Domäne der HLA-I-Moleküle (Abb. 1.4, Chapman *et al.* 1999 und 2000). Daher ist auch bei Zelloberflächenexpression der verkürzten HLA-G-Isoformen eine Interaktion von HLA-G4 ($\Delta\alpha 3$) und HLA-G3 ($\Delta\alpha 2$, $\Delta\alpha 3$) mit ILT2 unwahrscheinlich. Eine Bindung von HLA-G2 ($\Delta\alpha 2$) wäre jedoch möglich. Aus der Kristallstruktur von KIR2DL2 im Komplex mit HLA-Cw3 und von KIR2DL1 im Komplex mit HLA-Cw4 ergibt sich, daß die Rezeptoren über die „hinge“-Region zwischen den extrazellulären Domänen mit der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne und dem Peptid des HLA-I-Antigens in Kontakt treten (Abb. 1.4, Boyington *et al.* 2000, Fan *et al.* 2001). Die Kristallstruktur und die Bindestelle von KIR2DL4 für HLA-G wurden bisher nicht ermittelt. Dieser Rezeptor soll nur mit HLA-G reagieren (Rajagopalan und Long 1999). Die Domänenstruktur von KIR2DL4 (DO-D2 Konfiguration) unterscheidet sich von derjenigen der Rezeptoren KIR2DL1 und KIR2DL2 (D1-D2) (Selvakumar *et al.* 1996). Geht man jedoch von einer Assoziation aus, die der von anderen KIR2DL-Rezeptoren entspricht, könnten die HLA-G-Isoformen HLA-G2 ($\Delta\alpha 2$) und HLA-G3 ($\Delta\alpha 2$, $\Delta\alpha 3$) durch das Fehlen der $\alpha 2$ -Domäne keine oder eine reduzierte Bindung aufweisen. Auch die Bindungsstelle von HLA-I-Antigenen für den koaktivierenden Rezeptor BY55 ist noch nicht charakterisiert. Durch die unterschiedliche Domänenstruktur der HLA-G-Isoformen könnten sie sich in der Wechselwirkung mit verschiedenen Rezeptoren unterscheiden.

HLA-G besitzt ein Signalpeptid, welches an HLA-E binden kann (Pende *et al.* 1997, Perez-Villar *et al.* 1997). Da diese Sequenz in allen Isoformen von HLA-G enthalten ist, wird den verkürzten HLA-G-Isoformen eine Rolle als Peptidlieferant für HLA-E zugesprochen. Die

HLA-G-Signalsequenz kodiert durch Exon 1 ist zwischen den HLA-G-Allelen auf Aminosäureebene konserviert. Auf DNA-Ebene tritt ein Polymorphismus auf, der mit synonymen Mutationen einhergeht (Hviid *et al.* 1999, Ober und Aldrich 1997). Unter normalen Umständen sind die Peptidliganden für die HLA-E-Expression nicht limitierend, da in den meisten Körperzellen mehrere verschiedene HLA-I-Antigene exprimiert werden. In Trophoblasten könnte die HLA-E-Expression stärker von dem HLA-G-Peptid abhängen, da diese Zellen ansonsten nur HLA-C exprimieren (King *et al.* 1996 und 2000 a, Zemmour und Parham 1992). Die verkürzten HLA-G-Isoformen treten jedoch in geringeren Mengen als HLA-G1 auf (Abb. 5.2). Außerdem wirken sie sich nur bei Überexpression auf die HLA-E-Zelloberflächenexpression und die Inhibition der Lyse aus, wie in der Zelllinie .221 gezeigt wurde (Maier 2000, Ulbrecht *et al.* 2004). Die geringe Auswirkung auf die Zytotoxizität von NK-Zellen könnte zum Teil darauf beruhen, daß HLA-E-Antigene, die das von HLA-G stammende Peptid gebunden haben, nicht nur mit hoher Affinität an den inhibitorischen Rezeptor CD94/NKG2A, sondern auch an den aktivierenden Rezeptor CD94/NKG2C binden (Llano *et al.* 1998, Valés-Gómez *et al.* 1999).

Der in den meisten Testsystemen fehlende Nachweis von Zelloberflächenexpression und Inhibition der NK-Zytotoxizität durch die verkürzten HLA-G-Isoformen macht einen biologischen Effekt dieser HLA-G-Isoformen in diesem Zusammenhang unwahrscheinlich. NK-Zellen müssen jedoch nicht die Zellpopulation sein, auf welche die HLA-G-Expression den größten Einfluß hat. So ist die HLA-G-negative Gliomzelllinie U87MG nicht sensitiv gegenüber Lyse durch NK-Zellen, da sie auch positiv für HLA-I-Antigene ist. Transfektion mit HLA-G1- oder HLA-G5-cDNA-Vektoren vermittelt dennoch Schutz vor Lyse durch PBMC, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Wiendl *et al.* 2002). Auch ist nicht auszuschließen, daß die verkürzten HLA-G-Isoformen so wie HLA-G1 eine immunsuppressive Funktion ausüben, die nicht direkt mit Zytotoxizität assoziiert ist. Die Interaktion von HLA-G exprimierenden Zellen mit Rezeptoren wie ILT2 und ILT4 kann die Zytokinsekretion beeinflussen. Kokultivierung von LGL aus dem 1. Trimester mit K-562 HLA-G1-Transfektanten reduziert die Produktion der Zytokine TNF- α , IL-10, GM-CSF, IFN- γ und IL-13 (Rieger *et al.* 2002). Auch in T-Zellen wird durch ILT2 nicht nur die zytotoxische Aktivität und die Proliferation, sondern auch die Zytokinsekretion beeinflusst (Saverino *et al.* 2000 und 2002). Außerdem kann die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen von Monozyten durch ILT2 oder ILT4 herunterreguliert werden (Bellón *et al.* 2002, Colonna *et al.* 1997, 1998 und 1999, Fanger *et al.* 1998). Wie oben diskutiert, wäre für HLA-G2 eine Interaktion mit ILT2 denkbar. Dafür, daß den HLA-G-Isoformen eine biologische Bedeutung zukommt, spricht die Existenz von alternativ gespleißten Transkripten, die den Isoformen von HLA-G entsprechen, in den Plazenten von Pavian und Rhesusaffe (Boyson *et al.* 1997, Langat *et al.* 2002, Ryan *et al.* 2002, Slukvin *et al.* 1999).

6.3.3 Rolle der HLA-G-Hochregulation in Tumoren für eine Inhibition der antitumoralen Immunantwort

Eine Voraussetzung für die Entwicklung von Tumoren ist ihre Fähigkeit, der Immunüberwachung durch Abwesenheit von Tumorantigenen, Nichtreaktivität oder Nichterkennung von Tumorantigenen durch ungenügende Kostimulation, Anergie, Toleranz oder Immunsuppression zu entkommen. Die extravillösen Cytotrophoblasten, die den Hauptexpressionsort von HLA-G darstellen, haben ihre proliferativen und invasiven Eigenschaften mit Tumoren gemeinsam. Daher stellte sich die Frage, ob HLA-G eine Rolle bei der Tumorprogression spielt. Diese Rolle wird kontrovers diskutiert. HLA-G-Expression wurde in mehreren Studien in Tumoren und Tumor-infiltrierenden Zellen nachgewiesen. In einigen Melanomzelllinien, in Biopsien und in Serum von Melanompatienten konnte HLA-G detektiert werden (Cabestre *et al.* 1999, Paul *et al.* 1998 und 1999, Ugurel *et al.* 2001, Wagner *et al.* 2000). Außerdem wurde HLA-G in Biopsien von Nieren-, Darm-, Brust- und Lungenkrebspatienten entdeckt (Fukushima *et al.* 1998, Ibrahim *et al.* 2001, Lefebvre *et al.* 2002, Urosevic *et al.* 2001). Auch in Lymphomen wurde eine Hochregulation der HLA-G-Expression und Sekretion von HLA-G festgestellt (Amiot *et al.* 2003, Drénou *et al.* 2002, Urosevic *et al.* 2002). Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Rolle von HLA-G bei der Inhibition der antitumoralen Immunantwort hin. Da in vielen Tumoren $\beta 2m$ herunterreguliert ist, wurde die HLA-G-Expression in der $\beta 2m$ -negativen Zelllinie Daudi untersucht. Wie im Abschnitt 6.2 diskutiert, war in den Daudi-Transfektanten die HLA-G1-Expression weder auf der Zelloberfläche nachweisbar noch wirkte sie sich im Vergleich zur Vektorkontrolle inhibierend auf die Lyse bzw. Proliferation durch LAK-Zellen oder $\gamma\delta$ T-Zellen aus (Abb. 5.18 a, 5.22 a und 5.23). Zumindest in Tumoren, welche die MHC-I-Expression aufgrund von Verlust von $\beta 2m$ herunterreguliert haben, trägt die HLA-G-Expression nicht zur Tumorprogression bei. Daß die Bedeutung der HLA-G-Expression für die Tumorentwicklung zunächst überschätzt wurde, zeigt sich in mehreren umfangreicheren Untersuchungen, in denen zwar z. T. die Transkription, jedoch nicht die HLA-G-Proteinexpression in Tumoren bestätigt werden konnte (Davies *et al.* 2001, Frumento *et al.* 2000, Hurks *et al.* 2001, Palmisano *et al.* 2002, Pangault *et al.* 1999, Poláková und Russ 2000, Poláková *et al.* 2003, Real *et al.* 1999 a und b). Auch wurde die HLA-G-Expression hauptsächlich über RT-PCR und Hybridisierung mit HLA-G-Sonden untersucht. Die Hochregulation von HLA-G in myelogenen Leukämien ist kein häufiges Ereignis (Amiot *et al.* 1998). Jedoch konnte in einigen IFN- γ stimulierten akuten myelogenen Leukämien HLA-G-Expression nachgewiesen werden (Mizuno *et al.* 2000). In frühen chronisch myeloischen Leukämien, untersucht hier anhand von HLA-G-Transfektanten der humanen Erythroleukämiezelllinie K-562, besitzt die Expression von HLA-G nur eine eingeschränkte, inhibitorische Wirkung auf zytotoxische Effektorzellen. Auch Zugabe von isoliertem HLA-G5 wirkte sich nicht inhibierend auf die Lyse von K-562 durch die Zelllinie NKL aus (siehe 5.1.3). Die Expression und Funktion von HLA-G auf Tumorzellen variiert je nach Herkunftsgewebe der Tumoren und kann durch lokale Faktoren wie IL-10, IFN- γ oder IFN- α beeinflusst werden (Amiot *et al.* 1998, Lefebvre *et al.* 2001, Moreau *et al.* 1999, Ugurel *et al.* 2001, Wiendl *et al.* 2002, Yang *et al.* 1996). Die Induktion der HLA-G-Expression ist zwar keine Voraussetzung für die Tumorentwicklung, kann aber in einzelnen Fällen zur Abschwächung der Immunabwehr beitragen. So kann die HLA-G-Expression in

Gliomzelllinien durch IFN- γ verstärkt oder induziert werden und wirkt sich inhibierend auf die alloreaktive Lyse durch PBMC aus (Abb. 5.25, Maier *et al.* 1999, Wiendl *et al.* 2002). Zur Analyse der funktionellen HLA-G-Expression in Gliomzellen wurden auch HLA-G1- bzw. HLA-G5-Transfektanten der Gliomzelllinie U87MG verwendet. HLA-G1 und HLA-G5 unterdrückten nicht nur die Lyse durch PBMC, sondern auch die alloproliferative Antwort (Wiendl *et al.* 2002). Dies stimmt mit Ergebnissen überein, die zeigen, daß beide Isoformen die allogene proliferative T-Zellantwort unterdrücken (Bainbridge *et al.* 2000 a, Lila *et al.* 2001, Riteau *et al.* 1999). HLA-G5 hat die Fähigkeit, über CD95/CD95-Ligand in aktivierten CD8⁺ T-Zellen Apoptose zu induzieren (Contini *et al.* 2000 und 2003, Fournel *et al.* 2000, Solier *et al.* 2002). Der antiproliferative Effekt der HLA-G⁺ Gliomzelllinie beruht jedoch nicht auf einer Induktion der Apoptose der CD4⁺ oder CD8⁺ Effektorzellen (Wiendl *et al.* 2002). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die Effektorzellen vor Kontakt mit dem löslichen HLA-G nicht prästimuliert worden waren. Entsprechende Ergebnisse wurden auch bei Experimenten mit HLA-G1- und HLA-G5-Transfektanten in der Rhabdomyosarkomzelllinie TE671 erzielt, die bestätigen, daß die Induktion von HLA-G in Myoblasten zum Schutz vor alloreaktiver Lyse durch PBMC, CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen oder NK-Zellen beiträgt und die antiproliferative Antwort unterdrückt. In beiden Testsystemen inhibierten membranständiges HLA-G1 und sezerniertes HLA-G5 sekundäre alloreaktive Antworten, da das „Priming“ von Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen blockiert wurde. Studien mit HLA-G1-Transfektanten in den Zelllinien U87MG und TE671 deuten darauf hin, daß ein geringer Anteil HLA-G1 exprimierender Zellen ausreichend für eine Inhibition der alloreaktiven Lyse durch PBMC ist (Wiendl *et al.* 2002, Wiendl *et al.* 2003). Ein durch wenige HLA-G1⁺ Zellen in einer heterogenen Population von Tumorzellen vermittelter Schutz vor Lyse könnte damit zur Immunflucht beitragen. Vorläufige Untersuchungen in Glioblastompatienten ergaben, daß die Monozyten und T-Zellen selber zu einer erhöhten Produktion von löslichem HLA-G beitragen. Eine negative Korrelation zwischen der Konzentration von sezerniertem HLA-G im Blut und der Überlebensrate von Glioblastompatienten unterstreicht die Relevanz dieser HLA-G-Expression in vivo (Rebmann *et al.* 2003).

HLA-G1 und HLA-G5 wirken auf so verschiedene Effektorzellpopulationen wie NK-Zellen, T-Zellen und Monozyten ein. Ihre immunsuppressive Funktion können sie über verschiedene Mechanismen, wie Inhibition der Zytotoxizität und der Proliferation, Induktion von Apoptose und Modulation der Zytokinproduktion ausüben. Die Aufklärung der Funktion der verkürzten HLA-G-Isoformen bleibt ein spannendes Forschungsgebiet.

7 Zusammenfassung

Das nicht polymorphe HLA-Klasse-I-Antigen HLA-G wird hauptsächlich in der Plazenta exprimiert, wo es vermutlich den semiallogenen Fötus vor Angriff des mütterlichen Immunsystems schützt. Eine Besonderheit von HLA-G ist das Auftreten von mehreren verkürzten Isoformen, die von alternativ gespleißten Transkripten translatiert werden. Neben dem kompletten membranständigen HLA-G1 mit den extrazellulären Domänen $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ existieren die verkürzten Isoformen HLA-G2 ($\Delta\alpha 2$), HLA-G3 ($\Delta\alpha 2$, $\Delta\alpha 3$) und HLA-G4 ($\Delta\alpha 3$). Außerdem wurden die löslichen Isoformen HLA-G5 (HLA-G1s), HLA-G6 (HLA-G2s, $\Delta\alpha 2$) und HLA-G7 (HLA-G3s, $\Delta\alpha 2$, $\Delta\alpha 3$) beschrieben.

Um die Expression und Funktion einzelner Isoformen getrennt voneinander und ohne Beeinflussung durch andere MHC-Klasse-I-Moleküle untersuchen zu können, wurden Transfektanten für die Isoformen HLA-G1, HLA-G2, HLA-G4 und HLA-G5 in der HLA-Klasse-I-negativen humanen Zelllinie K-562 generiert. HLA-G kann mit inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren auf NK- und T-Zellen in Wechselwirkung treten und so Effektorfunktionen beeinflussen. Die Expression von HLA-G kann außerdem indirekt über HLA-E auf die Zytotoxizität von NK-Zellen und T-Zellen einwirken. Die HLA-E-Expression ist abhängig von Peptiden aus den Signalsequenzen von HLA-Klasse-I-schweren Ketten. Zum Ausschluß der Koexpression des HLA-Klasse-I-Antigens HLA-E auf der Zelloberfläche wurden HLA-G1mut- und HLA-G4mut-cDNA-Vektoren eingesetzt, deren Exon 1 so verändert ist, daß kein Ligand für HLA-E zur Verfügung gestellt wird.

Während in der Zelllinie K-562 HLA-G1 und HLA-G5 auf der Zelloberfläche exprimiert bzw. sezerniert werden, waren die verkürzten Isoformen HLA-G2 und HLA-G4 mittels FACS-Analyse mit einer Reihe HLA-Klasse-I- und HLA-G-spezifischer Ak nicht auf der Zelloberfläche nachweisbar. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Sensitivität dieser verkürzten Isoformen gegenüber Endo H. Aus der fehlenden Resistenz der HLA-G2- und HLA-G4-Polypeptide gegenüber Endo H ergibt sich kein Hinweis auf ihren Transport zur Zelloberfläche. Diese fehlende Oberflächenexpression von HLA-G2 und HLA-G4 könnte auf einer gestörten Assoziation mit $\beta 2m$ oder Bestandteilen der MHC-Klasse-I-Prozessierungsmaschinerie beruhen. Kopräzipitationsexperimente ergaben, daß nur die HLA-G1-schwere Kette mit $\beta 2m$ und TAP assoziiert ist. HLA-G2 ließ sich zwar mit TAP, jedoch nicht mit $\beta 2m$ kopräzipitieren und HLA-G4 ließ sich weder in Assoziation mit $\beta 2m$ noch mit TAP nachweisen, so daß diesen Isoformen ein wichtiger Bestandteil der vollständigen HLA-I-Komplexe fehlt und bei HLA-G4 außerdem die Beladung mit Peptiden gestört ist. Diese Daten sprechen gegen eine Zelloberflächenexpression der verkürzten HLA-G-Isoformen. Im Unterschied zu HLA-G1 war HLA-G5 nicht in Kopräzipitaten mit TAP zu finden. Daher scheint für diese Isoform eine stabile Assoziation mit TAP für die Peptidbeladung nicht essentiell zu sein.

Zum funktionellen Nachweis von HLA-G wurden Zytotoxizitätstests mit der Zelllinie NKL sowie mit PBL, NK-Zellen und LAK-Zellen aus dem peripheren Blut mehrerer Donoren durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die Expression der verkürzten Isoformen HLA-G2 und

HLA-G4 die Zytotoxizität der verschiedenen Effektorzellen nicht beeinflusste. HLA-G1 inhibierte die Lyse von K-562 in Abhängigkeit von der HLA-G1-Expressionsstärke und wirkte sich weniger deutlich als eine entsprechende HLA-E-Expression auf die Zytotoxizität aus.

Neben der Plazenta wird HLA-G auch in zahlreichen anderen Geweben exprimiert und kann in Tumoren induziert oder hochreguliert werden. Da bei verschiedenen Tumoren die MHC-Klasse-I-Expression aufgrund von Mutationen im $\beta 2m$ -Gen gestört ist, wurden HLA-G1-Transfektanten in der $\beta 2m$ -negativen humanen Zelllinie Daudi etabliert. Daudi HLA-G1-Transfektanten weisen gegenüber K-562 HLA-G1-Transfektanten eine reduzierte HLA-G-Proteinmenge auf. In Abwesenheit von $\beta 2m$ ist HLA-G1 außerdem nicht resistent gegenüber Endo H und kann auch nach Inkubation der Zellen bei niedrigen Temperaturen und Zugabe von $\beta 2m$ oder Ligand nicht auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Da von HLA-B27 bekannt war, daß $\beta 2m$ -freie Homodimere auf der Zelloberfläche exprimiert werden können und eine Dimerisierung von HLA-G über ungepaarte Cysteinreste möglich ist, wurden die Daudi HLA-G1-Transfektanten auf Anwesenheit von HLA-G1-Dimeren untersucht. In Abwesenheit von $\beta 2m$ waren jedoch keine Dimere nachweisbar. Auch in funktionellen Experimenten mit LAK oder $\gamma\delta$ T-Zellen hatte die HLA-G-Expression in Daudi HLA-G1-Transfektanten keine Auswirkung auf die Zytotoxizität oder Proliferation der Effektorzellen. Die HLA-G1-Expression in $\beta 2m$ -negativen Tumoren trägt daher nicht zur Tumorprogression bei.

Eine Analyse der Unterschiede in der Expression und der Auswirkungen der HLA-G-Isoformen in verschiedenen Zelllinien könnte Hinweise auf die Regulation und die Funktion der HLA-G-Expression liefern.

8 Literatur

- Agrawal, S., Marquet, J., Freeman, G. J., Tawab, A., Bouteiller, P. L., Roth, P., Bolton, W., Ogg, G., Bomsell, L. und Bensussan, A. (1999). Cutting Edge: MHC class I triggering by a novel cell surface ligand costimulates proliferation of activated human T cells. *J Immunol* **162**, 1223-1226.
- Ahn, J. Y., Tanahashi, N., Akiyama, K., Hisamatsu, H., Noda, C., Tanaka, K., Chung, C. H., Shibmara, N., Willy, P. J., Mott, J. D. *et al.* (1995). Primary structures of two homologous subunits of PA28, a γ -interferon-inducible protein activator or the 20S proteasome. *FEBS Lett* **366**, 37-42.
- Aldrich, C. L., Stephenson, M. D., Karrison, T., Odem, R. R., Branch, D. W., Scott, J. R., Schreiber, J. R. und Ober, C. (2001). HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* **7**, 1167-1172.
- Alizadeh, M., Legras, C., Semana, G., Le Bouteiller, P., Genetet, B. und Fauchet, R. (1993). Evidence for a polymorphism of HLA-G gene. *Hum Immunol* **38**, 206-212.
- Allan, D. S., Colonna, M., Lanier, L. L., Churakova, T. D., Abrams, J. S., Ellis, S. A., McMichael, A. J. und Braud, V. M. (1999). Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J Exp Med* **189**, 1149-1156.
- Allen, R. L., O'Callaghan, C. A., McMichael, A. J. und Bowness, P. (1999). Cutting Edge: HLA-B27 can form a novel β 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J Immunol* **162**, 5045-5048.
- Allen, R. L., Raine, T., Haude, A., Trowsdale, J. und Wilson, M. J. (2001). Cutting Edge: Leukocyte receptor complex-encoded immunomodulatory receptors show differing specificity for alternative HLA-B27 structures. *J Immunol* **167**, 5543-5547.
- Alvarez, M., Santos, P., Martinho, A., Simoes, O., Abade, A. und Breda-Coimbra, H. (1999). HLA-G genetic polymorphism in 57 Portuguese white families studied by PCR-RFLP and PCR-SSOP. *Transplant Proc* **31**, 1829-1831.
- Amiot, L., Onno, M., Drénou, B., le Marchand, B., Lamy, T., Semana, G. und Fauchet, R. (1996). Distribution of HLA-G alternative mRNAs including soluble forms in normal lymphocytes and in lymphoid cell-derived leukemia. *Eur J Immunogenet* **23**, 311-320.
- Amiot, L., Onno, M., Drénou, B., Monvoisin, C. und Fauchet, R. (1998). HLA-G class I gene expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Hum Immunol* **59**, 524-528.
- Amiot, L., Le Fricq, G., Sebti, Y., Drénou, B., Pangault, C., Guilloux, V., Leleu, X., Bernard, M., Facon, T. und Fauchet, R. (2003). HLA-G and lymphoproliferative disorders. *Semin Cancer Biol* **13**, 379-385.
- Androlewicz, M. J., Anderson, K. S. und Cresswell, P. (1993). Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 9130-9134.
- Androlewicz, M. J. und Cresswell, P. (1994). Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity* **1**, 7-14.
- Androlewicz, M. J., Ortmann, B., van Endert, P. M., Spies, T. und Cresswell, P. (1994). Characteristics of peptide and major histocompatibility complex class I/ β 2-microglobulin binding to the transporters associated with antigen processing (TAP1 and TAP2). *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 12716-12720.
- Anumanthan, A., Bensussan, A., Bomsell, L., Christ, A. D., Blumberg, R., S., Voss, S. D., Patel, A. T., Robertson, M. J., Nadler, L. M. und Freeman, G. J. (1998). Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* **161**, 2780-2790.
- Aractingi, S., Briand, N., Le Danff, C., Viguier, M., Bachelez, H., Michel, L., Dubertret, L. und Carosella, E. D. (2001). HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells? *Am J Pathol* **159**, 71-77.
- Aramburu, J., Balboa, M. A., Izquierdo, M. und Lopez-Botet, M. (1991). A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and $\gamma\delta$ TCR⁺ T lymphocytes. II. Modulation of natural killer cytotoxicity by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J Immunol* **147**, 714-721.
- Arosa, F. A., de Jesus, O., Porto, G., Carmo, A. M. und de Sousa, M. (1999). Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood lymphocytes in association with major histocompatibility complex class I molecules. *J Biol Chem* **274**, 16917-16922.
- Athanassakis, I., Pafis, M., Ranella, A. und Vassiliadis, S. (1999). Detection of soluble HLA-G levels in maternal serum can be predictive for a successful pregnancy. *Transplant Proc* **31**, 1834-1837.
- Bainbridge, D. R., Ellis, S. A. und Sargent, I. L. (1999). Little evidence of HLA-G mRNA polymorphism in Caucasian or Afro-Caribbean populations. *J Immunol* **163**, 2023-2027.
- Bainbridge, D. R., Ellis, S. A. und Sargent, I. L. (2000 a). HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. *J Reprod Immunol* **48**, 17-26.
- Bainbridge, D. R., Ellis, S. A. und Sargent, I. L. (2000 b). The short forms of HLA-G are unlikely to play a role in pregnancy because they are not expressed at the cell surface. *J Reprod Immunol* **47**, 1-16.

- Barnstable, C. J., Bodmer, W. F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A. F. und Ziegler, A. (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* 14, 9-20.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L. und Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-729.
- Beißbarth, T., Sun, J., Kavathas, P. B. und Ortmann, B. (2000). Increased efficiency of folding and peptide loading of mutant MHC class I molecules. *Eur J Immunol* 30, 1203-1213.
- Belich, M. P., Glynn, R. J., Senger, G., Sheer, D. und Trowsdale, J. (1994). Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr Biol* 4, 769-776.
- Bellón, T., Heredia, A. B., Llano, M., Minguela, A., Rodriguez, A., Lopez-Botet, M. und Aparicio, P. (1999). Triggering of effector functions on a CD8+ T cell clone upon the aggregation of an activatory CD94/kp39 heterodimer. *J Immunol* 162, 3996-4002.
- Bellón, T., Kitzig, F., Sayos, J. und Lopez-Botet M. (2002). Mutational analysis of immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs of the Ig-like transcript 2 (CD85j) leukocyte receptor. *J Immunol* 168, 3351-3359.
- Beninga, J., Rock, K. L. und Goldberg, A. L. (1998). Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem* 273, 18734-18742.
- Bensussan, A., Mansur, I. G., Mallet, V., Rodriguez, A. M., Girr, M., Weiss, E. H., Brem, G., Bousmell, L., Gluckman, E., Dausset, J. *et al.* (1995). Detection of membrane-bound HLA-G translated products with a specific monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 10292-10296.
- Biassoni, R., Falco, M., Cambiaggi, A., Costa, P., Verdiani, S., Pende, D., Conte, R., Di Donato, C., Parham, P. und Moretta, L. (1995). Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of the serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones. *J Exp Med* 182, 605-609.
- Biassoni R, Cantoni C, Falco M, Verdiani S, Bottino C, Vitale M, Conte R, Poggi A, Moretta A, Moretta L. (1996). The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J Exp Med* 183, 645-650.
- Biassoni, R., Pessino, A., Malaspina, A., Cantoni, C., Bottino, C., Sivori, S., Moretta, L. und Moretta, A. (1997). Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur J Immunol* 27, 3095-3099.
- Bicknell, D.C., Rowan, A. und Bodmer, W.F. (1994). Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4751-4756.
- Binstadt, B. A., Brumbaugh, K. M., Dick, C. J., Scharenberg, A. M., Williams, B. L., Colonna, M., Lanier, L. L., Kinet, J. P., Abraham, R. T. und Leibson, P. J. (1996). Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. *Immunity* 5, 629-638.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. und Wiley, D. C. (1987 a). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329, 512-518.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. und Wiley, D. C. (1987 b). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-512.
- Blaschitz, A., Lenfant, F., Mallet, V., Hartmann, M., Bensussan, A., Geraghty, D. E., Le Bouteiller, P. und Dohr, G. (1997). Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. *Eur J Immunol* 27, 3380-3388.
- Borges, L., Hsu, M. L., Fanger, N., Kubin, M. und Cosman, D. (1997). A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J Immunol* 159, 5192-5196.
- Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E. H., Coligan, J. E. und Brooks, A. G. (1998). Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 187, 813-818.
- Boyington, J. C., Motyka, S. A., Schuck, P., Brooks, A. G. und Sun, P. D. (2000). Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 405, 537-543.
- Boyle, L. H., Goodall, J. C., Opat, S. S. und Gaston, J. S. (2001). The recognition of HLA-B27 by human CD4(+) T lymphocytes. *J Immunol* 167, 2619-2624.
- Boyson, J. E., Iwanaga, K. K., Golos, T. G. und Watkins, D. I. (1997). Identification of a novel MHC class I gene, Mamu-AG, expressed in the placenta of a primate with an inactivated G locus. *J Immunol* 159, 3311-3321.
- Boyson, J. E., Erskine, R., Whitman, M. C., Chiu, M., Lau, J. M., Koopman, L. A., Valter, M. M., Angelisova, P., Horejsi, V. und Strominger, J. L. (2002). Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 16180-16185.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72, 248-254.
- Braud, V., Jones, E. Y. und McMichael, A. (1997). The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol* 27, 1164-1169.

- Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Söderström, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H. *et al.* (1998 a). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **391**, 795-799.
- Braud, V. M., Allan, D. S., Wilson, D. und McMichael, A. J. (1998 b). TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol* **8**, 1-10.
- Brodsky, F. M., Bodmer, W. F. und Parham, P. (1979). Characterization of a monoclonal anti-beta 2-microglobulin antibody and its use in the genetic and biochemical analysis of major histocompatibility antigens. *Eur J Immunol* **9**, 536-45.
- Brooks, A. G., Posch, P. E., Scorzelli, C. J., Borrego, F. und Coligan, J. E. (1997). NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. *J Exp Med* **185**, 795-800.
- Brooks, A. G., Borrego, F., Posch, P. E., Patamawenu, A., Scorzelli, C. J., Ulbrecht, M., Weiss, E. H. und Coligan, J. E. (1999). Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA class I molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells. *J Immunol* **162**, 305-313.
- Brostjan, C., Bellón, T., Sobanov, Y., Lopez-Botet, M. und Hofer, E. (2002). Differential expression of inhibitory and activating CD94/NKG2 receptors on NK cell clones. *J Immunol Meth* **264**, 109-119.
- Bukowski, J. F., Morita, C. T., Tanaka, Y., Bloom, B. R., Brenner, M. B. und Band, H. (1995). V γ 2/V δ 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. *J Immunol* **154**, 998-1006.
- Burk, M. R., Mori, L., De Libero, G. (1995). Human V γ 9/ δ 2 cells are stimulated in a cross-reactive fashion by a variety of phosphorylated metabolites. *Eur J Immunol* **25**, 2052-2058.
- Burshtyn, D. N., Lam, A. S., Weston, M., Gupta, N., Warmerdam, P. A. und Long, E. O. (1999). Conserved residues amino-terminal of cytoplasmic tyrosines contribute to the SHP-1-mediated inhibitory function of killer cell Ig-like receptors. *J Immunol* **162**, 897-902.
- Bushkin, Y., Posnett, D. N., Pernis, B. und Wang, C. Y. (1986). A new HLA-linked T cell membrane molecule, related to the β chain of the clonotypic receptor, is associated with T3. *J Exp Med* **164**, 458-473.
- Cabestre, F. A., Moreau, P., Riteau, B., Ibrahim, E. C., Le Danff, C., Dausset, J., Rouas-Freiss, N., Carosella, E. D. und Paul, P. (1999). HLA-G expression in human melanoma cells: protection from NK cytolysis. *J Reprod Immunol* **43**, 183-193.
- Campbell, K. S., Dessing, M., Lopez-Botet, M., Cella, M. und Colonna, M. (1996). Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* **184**, 93-100.
- Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., Pessino, A., Cilli, M., Conte, R., Pende, D., Ponte, M., Mikaelsson, M. S., Moretta, L. und Biassoni, R. (1998 a). p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur J Immunol* **28**, 1980-1990.
- Cantoni, C., Biassoni, R., Pende, D., Sivori, S., Accame, L., Pareti, L., Semenzato, G., Moretta, L., Moretta, A. und Bottino, C. (1998 b). The activating form of CD94 receptor complex: CD94 covalently associates with the Kp39 protein that represents the product of the NKG2-C gene. *Eur J Immunol* **28**, 327-338.
- Carreno, B. M., Solheim, J. C., Harris, M., Stroynowski, I., Connolly, J. M. und Hansen, T. H. (1995). TAP associates with a unique class I conformation, whereas calnexin associates with multiple class I forms in mouse and man. *J Immunol* **155**, 4726-4733.
- Carretero, M., Palmieri, G., Llano, M., Tullio, V., Santoni, A., Geraghty, D. E. und Lopez-Botet, M. (1998). Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2-A: evidence for receptor function in heterologous transfectants. *Eur J Immunol* **28**, 1280-1291.
- Carson, W. E., Fehniger, T. A. und Caligiuri, M. A. (1997). CD56 bright natural killer cell subsets: characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand. *Eur J Immunol* **27**, 354-360.
- Castilla, J. A., Gil, T., Rodriguez, F., Molina, J., Samaniego, F., Vergara, F. und Herruzo, A. J. (1993). Lack of expression of HLA antigens on immature germ cells from ejaculates with antisperm antibodies. *Am J Reprod Immunol* **30**, 9-14.
- Castro, M. J., Morales, P., Rojo-Amigo, R., Martinez-Laso, J., Allende, L., Varela, P., Garcia-Berciano, M., Guillen-Perales, J. und Arnaiz-Villena, A. (2000). Homozygous HLA-G*0105N healthy individuals indicate that membrane-anchored HLA-G1 molecule is not necessary for survival. *Tissue Antigens* **56**, 232-239.
- Cella, M., Longo, A., Ferrara, G. B., Strominger, J. L. und Colonna, M. (1994). NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med* **180**, 1235-1242.
- Cella, M., Dohring, C., Samaridis, J., Dessing, M., Brockhaus, M., Lanzavecchia, A. und Colonna, M. (1997). A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *J Exp Med* **185**, 1743-1751.
- Cerundolo, V., Alexander, J., Anderson, K., Lamb, C., Cresswell, P., McMichael, A., Gotch, F. und Townsend, A. (1990). Presentation of viral antigen controlled by a gene in the major histocompatibility complex. *Nature* **345**, 449-452.
- Cerwenka, A. und Lanier, L. L. (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Immun* **1**, 41-49.
- Chapman T. L., Heikeman, A. P. und Bjorkman, P. J. (1999). The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* **11**, 603-613.

- Chapman, T. L., Heikema, A. P., West, A. P. Jr. und Bjorkman, P. J. (2000). Crystal structure and ligand binding properties of the D1D2 region of the inhibitory receptor LIR-1 (ILT2). *Immunity* 13, 727-736.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Chowdhury, K. (1991). One step "miniprep" method for the isolation of plasmid-DNA. *Nucleic Acids Res* 19, 2792.
- Chu, W., Fant, M. E., Geraghty, D. E. und Hunt, J. S. (1998). Soluble HLA-G in human placentas: synthesis in trophoblasts and interferon-gamma-activated macrophages but not placental fibroblasts. *Hum Immunol* 59, 435-442.
- Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79, 13-21.
- Colbern, G. T., Chiang, M. H. und Main, E. K. (1994). Expression of the nonclassic histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta. *Am J Obstet Gynecol* 170, 1244-1250.
- Colonna, M. und Samaridis, J. (1995). Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 268, 405-408.
- Colonna, M. (1997). Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors. *Immunol Rev* 155, 127-133.
- Colonna, M., Navarro, F., Bellón, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M. und Lopez-Botet, M. (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 186, 1809-1818.
- Colonna, M., Samaridis, J., Cella, M., Angman, L., Allen, R. L., O'Callaghan, C. A., Dunbar, R., Ogg, G. S., Cerundolo, V. und Rolink, A. (1998). Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol* 160, 3096-3100.
- Colonna, M. (1998). Unmasking the killer's accomplice. *Nature* 391, 642-643.
- Colonna, M., Nakajima, H. und Cella, M. (1999). Inhibitory and activating receptors involved in immune surveillance by human NK and myeloid cells. *J Leukoc Biol* 66, 718-722.
- Contini, P., Ghio, M., Merlo, A., Brenci, S., Filaci, G., Indiveri, F. und Puppo, F. (2000). Soluble HLA class I/CD8 ligation triggers apoptosis in EBV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes by Fas/Fas-ligand interaction. *Hum Immunol* 61, 1347-1351.
- Contini, P., Ghio, M., Poggi, A., Filaci, G., Indiveri, F., Ferrone, S. und Puppo, F. (2003). Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol* 33, 125-134.
- Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L. und Hsu, M. L. (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 7, 237-282.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M. und Chalupny, N. J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14, 123-133.
- Crisa, L., McMaster, M. T., Ishii, J. K., Fisher, S. J. und Salomon, D. R. (1997). Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. *J Exp Med* 186, 289-298.
- Curran, M.D., Williams, F., Earle, J. A., Rima, B. K., van Dam, M. G., Bunce, M. und Middleton, D. (1996). Long-range PCR amplification as an alternative strategy for characterizing novel HLA-B alleles. *Eur J Immunogenet* 23, 297-309.
- Curran, M. D., Williams, F., Little, A. M., Rima, B. K., Madrigal, J. A. und Middleton, D. (1999). Aberrant splicing of intron 1 creates a novel null HLA-B*1501 allele. *Tissue Antigens* 53, 244-252.
- D'Andrea, A., Chang, C., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Phillips, J. H. und Lanier, L. L. (1995). Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *J Immunol* 155, 2306-2310.
- D'Andrea, A., Chang, C., Phillips, J. H. und Lanier, L. L. (1996). Regulation of T cell lymphokine production by killer cell inhibitory receptor recognition of self HLA class I alleles. *J Exp Med* 184, 789-794.
- D'Urso, C. M., Wang, Z., Cao, Y., Tataka, R., Zeff, R. A. und Ferrone, S. (1991). Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in b2m gene expression. *J Clin Invest* 87, 284-292.
- Dangoria, N. S., DeLay, M. L., Kingsbury, D. J., Mear, J. P., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A. und Colbert, R. A. (2002). HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 277, 23459-23468.
- Daniel, S., Caillat-Zucman, S., Hammer, J., Bach, J. F. und van Ender, P. M. (1997). Absence of functional relevance of human transporter associated with antigen processing polymorphism for peptide selection. *J Immunol* 159, 2350-2357.
- David, V., Hochstenbach, F., Rajagopalan, S., Brenner, M. B. (1993). Interaction with newly synthesized and retained proteins in the endoplasmic reticulum suggests a chaperone function for human integral membrane protein IP90 (calnexin). *J Biol Chem* 268, 9585-9592.
- Davies, B., Hiby, S., Gardner, L., Loke, Y. W. und King, A. (2001). HLA-G expression by tumors. *Am J Reprod Immunol* 45, 103-107.

- Davis, D. M., Reyburn, H. T., Pazmany, L., Chiu, I., Mandelboim, O. und Strominger, J. L. (1997). Impaired spontaneous endocytosis of HLA-G. *Eur J Immunol* 27, 2714-2719.
- Degen, E., Cohen-Doyle, M. F. und Williams, D. B. (1992). Efficient dissociation of the p88 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both β 2-microglobulin and peptide. *J Exp Med* 175, 1653-1661.
- DeMars, R., Chang, C. C. und Rudersdorf, R. A. (1983). Dissection of the D-region of the human major histocompatibility complex by means of induced mutations in a lymphoblastoid cell line. *Hum Immunol* 8, 123-139.
- Diedrich, G., Bangia, N., Pan, M. und Cresswell, P. (2001). A role for calnexin in the assembly of the MHC class I loading complex in the endoplasmic reticulum. *J Immunol* 166, 1703-1709.
- Diehl, M., Münz, C., Keilholz, W., Stevanovic, S., Holmes, N., Loke, Y. W. und Rammensee, H. G. (1996). Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters. *Curr Biol* 6, 305-314.
- Dietrich, J., Cella, M. und Colonna, M. (2001). Ig-like transcript 2 (ILT2)/leukocyte Ig-like receptor 1 (LIR1) inhibits TCR signaling and actin cytoskeleton reorganization. *J Immunol* 166, 2514-2521.
- Döhring, C., Samaridis, J. und Colonna, M. (1996 a). Alternatively spliced forms of human killer inhibitory receptors. *Immunogenetics* 44, 227-230.
- Döhring, C., Scheidegger, D., Samaridis, J., Cella, M. und Colonna, M. (1996 b). A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol* 156, 3098-3101.
- Dominguez, O., Coto, E., Martinez-Naves, E., Choo, S. Y. und Lopez-Larrea, C. (1992). Molecular typing of HLA-B27 alleles. *Immunogenetics* 36, 277-282.
- Dorling, A., Monk, N. J. und Lechler, R. I. (2000 a). HLA-G inhibits the transendothelial migration of human NK cells. *Eur J Immunol* 30, 586-593.
- Dorling, A., Monk, N. und Lechler, R. (2000 b). HLA-G inhibits the transendothelial cell migration of human NK cells: a strategy for inhibiting xenograft rejection. *Transplant Proc* 32, 938.
- Drénou, B., Le Friec, G., Bernard, M., Pangault, C., Grosset, J. M., Lamy, T., Fauchet, R. und Amiot, L. (2002). Major histocompatibility complex abnormalities in non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol* 119, 417-424.
- Ehring, B., Meyer, T. H., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. und Tampé, R. (1996). Effects of major-histocompatibility-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.
- Ellis, S. A., Sargent, I. L., Redman, C. W. und McMichael, A. J. (1986). Evidence for a novel HLA-antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology* 59, 595-601.
- Ellis, S. A., Palmer, M. S. und McMichael, A. J. (1990). Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *J Immunol* 144, 731-735.
- Emmer, P. M., Steegers, E. A., Kerstens, H. M., Bulten, J., Nelen, W. L., Boer, K. und Joosten, I. (2002). Altered phenotype of HLA-G expressing trophoblast and decidual natural killer cells in pathological pregnancies. *Hum Reprod* 17, 1072-1080.
- Engler-Blum, G., Meier, M., Frank, J. und Muller, G. A. (1993). Reduction of background problems in nonradioactive northern and southern blot analyses enables higher sensitivity than ^{32}P -based hybridizations. *Anal Biochem* 210, 235-244.
- Fan, Q. R., Long, E. O. und Wiley, D. C. (2001). Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nat Immunol* 2, 452-460.
- Fanger, N. A., Cosman, D., Peterson, L., Braddy, S. C., Maliszewski, C. R. und Borges, L. (1998). The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur J Immunol* 28, 3423-3434.
- Farmery, M. R., Allen, S., Allen, A. J. und Bulleid, N. J. (2000). The role of ERp57 in disulfide bond formation during the assembly of major histocompatibility complex class I in a synchronized semipermeabilized cell translation system. *J Biol Chem* 275, 14933-14938.
- Faure, M. und Long E. O. (2002). KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol* 168, 6208-6214.
- Fisch, P., Malkovsky, M., Braakman, E., Sturm, E., Bolhuis, R. L., Prieve, A., Sosman, J. A., Lam, V. A. und Sondel, P. M. (1990 a). γ/δ T cell clones and natural killer cell clones mediate distinct patterns of non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxicity. *J Exp Med* 171, 1567-1579.
- Fisch, P., Malkovsky, M., Kovats, S., Sturm, E., Braakman, E., Klein, B. S., Voss, S. D., Morrissey, L. W., DeMars, R., Welch, W. J. *et al.* (1990 b). Recognition by human $V\gamma 9/V\delta 2$ T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* 250, 1269-1273.
- Foecking, M. K. und Hofstetter, H. (1986). Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene* 45, 101-105.
- Forte, P., Pazmany, L., Matter-Reissmann, U. B., Stussi, G., Schneider, M. K. und Seebach, J. D. (2001). HLA-G Inhibits Rolling Adhesion of Activated Human NK Cells on Porcine Endothelial Cells. *J Immunol* 167, 6002-6008.

- Fournel, S., Aguerre-Girr, M., Campan, A., Salauze, L., Berrebi, A., Lone, Y.-C., Lenfant, F. und Le Bouteiller, P. (1999). Soluble HLA-G: purification from eukaryotic transfected cells and detection by a specific ELISA. *Am J Reprod Immunol* 42, 22-29.
- Fournel, S., Aguerre-Girr, M., Huc, X., Lenfant, F., Alam, A., Toubert, A., Bensussan, A. und Le Bouteiller, P. (2000). Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol* 164, 6100-6104.
- Frumento, G., Franchello, S., Palmisano, G. L., Nicotra, M. R., Giacomini, P., Loke, Y. W., Geraghty, D. E., Maio, M., Manzo, C., Natali, P. G. und Ferrara, G. B. (2000). Melanomas and melanoma cell lines do not express HLA-G and the expression cannot be induced by gammaIFN treatment. *Tissue Antigens* 56, 30-37.
- Fry, A. M., Lanier, L. L. und Weiss, A. (1996). Phosphotyrosines in the killer cell inhibitory receptor motif of NKB1 are required for negative signaling and for association with protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* 184, 295-300.
- Fujii, T., Ishitani, A. und Geraghty, D. E. (1994). A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol* 153, 5516-5524.
- Fukushima, Y., Oshika, Y., Nakamura, M., Tokunaga, T., Hatanaka, H., Abe, Y., Yamazaki, H., Kijima, H., Ueyama, Y. und Tamaoki, N. (1998). Increased expression of human histocompatibility leukocyte antigen-G in colorectal cancer cells. *Int J Mol Med* 2, 349-351.
- Fuzzi, B., Rizzo, R., Criscuoli, L., Noci, I., Melchiorri, L., Scarselli, B., Bencini, E., Menicucci, A. und Baricordi, O. R. (2002). HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* 32, 311-315.
- Gaczynska, M., Goldberg, A. L., Tanaka, K., Hendil, K. B. und Rock, K. L. (1996). Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon-gamma-induced subunits LMP2 and LMP7. *J Biol Chem* 271, 17275-17280.
- Gao, G. F., Tormo, J., Gerth, U. C., Wyer, J. R., McMichael, A. J., Stuart, D. I., Bell, J. I., Jones, E. Y. und Jakobsen, B. K. (1997). Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2. *Nature* 387, 630-634.
- Gao, G. F., Willcox, B. E., Wyer, J. R., Boulter, J. M., O'Callaghan, C. A., Maenaka, K., Stuart, D. I., Jones, E. Y., Van Der Merwe, P. A., Bell, J. I. und Jakobsen, B. K. (2000). Classical and nonclassical class I major histocompatibility complex molecules exhibit subtle conformational differences that affect binding to CD8alphaalpha. *J Biol Chem* 275, 15232-15238.
- Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E. und Wiley, D. C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384, 134-141.
- Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L. und Wilson, I. A. (1996). An $\alpha\beta$ T cell receptor structure at 2.5Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274, 209-219.
- Garcia, P., Llano, M., de Heredia, A. B., Willberg, C. B., Caparros, E., Aparicio, P., Braud, V. M. und Lopez-Botet, M. (2002). Human T cell receptor-mediated recognition of HLA-E. *Eur J Immunol* 32, 936-944.
- Geier, E., Pfeifer, G., Wilm, M., Lucchiari-Hartz, M., Baumeister, W., Eichmann, K. und Niedermann, G. (1999). A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science*. 283, 978-981.
- Geiselhart, A., Dietl, J., Marzusch, K., Ruck, P., Ruck, M., Horny, H. P., Kaiserling, E. und Handgretinger, R. (1995). Comparative analysis of the immunophenotypes of decidual and peripheral blood large granular lymphocytes and T cells during early human pregnancy. *Am J. Reprod Immunol* 33, 315-322.
- Geraghty, D. E., Koller, B. H. und Orr, H. T. (1987). A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 9145-9149.
- Geraghty, D. E., Stocksleader, M., Ishitani, A. und Hansen, J. A. (1992). Polymorphism at the HLA-E locus predates most HLA-A and -B polymorphism. *Hum Immunol* 33, 174-184.
- Glas, R., Bogyo, M., McMaster, J. S., Gaczynska, M. und Ploegh, H. L. (1998). A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature* 392, 618-622.
- Gobin, S. J., Wilson, L., Keijsers, V. und van den Elsen, P. J. (1997). Antigen processing and presentation by human trophoblast-derived cell lines. *J Immunol* 158, 3587-3592.
- Godoy-Ramirez, K., Franck, K., Gaines, H. (2000). A novel method for the simultaneous assessment of natural killer cell conjugate formation and cytotoxicity at the single-cell level by multi-parameter flow cytometry. *J Immunol Meth* 239, 35-44.
- Goldman-Wohl, D. S., Ariel, I., Greenfield, C., Hochner-Celnikier, D., Cross, J., Fisher, S. und Yagel, S. (2000). Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 6, 88-95.
- Gomez-Lozano, N., De Pablo, R., Puente, S. und Vilches, C. (2003). Recognition of HLA-G by the NK cell receptor KIR2DL4 is not essential for human reproduction. *Eur J Immunol* 33, 639-644.
- Gonen-Gross, T., Achdout, H., Gazit, R., Hanna, J., Mizrahi, S., Markel, G., Goldman-Wohl, D., Yagel, S., Horejsi, V., Levy, O., Baniyash, M. und Mandelboim O. (2003). Complexes of HLA-G protein on the cell surface are important for leukocyte Ig-like-receptor-1 function. *J Immunol* 171, 1343-1351.

- Groettrup, M., Ruppert, T., Kuehn, L., Seeger, M., Standera, S., Koszinowski, U. und Kloetzel, P. M. (1995). The interferon-gamma inducible 11S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20S proteasome in vitro. *J Biol Chem* **270**, 23808-23815.
- Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R. und Kloetzel, P. M. (1996). A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur J Immunol* **26**, 863-869.
- Groh, V., Porcelli, S., Fabbi, M., Lanier, L. L., Picker, L. J., Anderson, T., Warnke, R. A., Bhan, A. K., Strominger, J. L. und Brenner, M. B. (1989). Human lymphocytes bearing T cell receptor γ/δ are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* **169**, 1277-1294.
- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M. und Spies, T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 12445-12450.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D. und Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-471.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E., Roncarolo, M. G. (1998). Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8⁺ T cells. *J Immunol* **160**, 3188-3193.
- Guillaudeux, T., Rodriguez, A. M., Girr, M., Mallet, V., Ellis, S. A., Sargent, I. L., Fauchet, R., Alsat, E. und 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.
- Gumperz, J. E., Valiante, N. M., Parham, P., Lanier, L. L. und Tyan, D. (1996). Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigen types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype. *J Exp Med* **183**, 1817-1827.
- Gumperz, J. E., Barber, L. D., Valiante, N. M., Percival, L., Phillips, J. H., Lanier, L. L. und Parham, P. (1997). Conserved and variable residues within the Bw4 motif of HLA-B make separable contributions to recognition by the NKB1 killer cell inhibitory receptor. *J Immunol* **158**, 5237-5241.
- Hamai, Y., Fujii, T., Kozuma, S., Shibata, Y. und Taketani, Y. (1998). Secretion of interleukin-2 from unstimulated peripheral blood mononuclear cells is a possible pathogenic mechanism in recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol* **40**, 63-64.
- Hammer, A., Hutter, H., Blaschitz, A., Mahnert, W., Hartmann, M., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A. und Dohr, G. (1997). Amnion epithelial cells, in contrast to trophoblast cells, express all classical HLA class I molecules together with HLA-G. *Am J Reprod Immunol* **37**, 161-171.
- Hammond, C. und Helenius, A. (1995). Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 523-529.
- Hansen, T. H., Myers, N. B. und Lee, D. R. (1988). Studies of two antigenic forms of L^d with disparate beta 2-microglobulin (beta 2m) associations suggest that beta 2m facilitate the folding of the alpha 1 and alpha 2 domains during *de novo* synthesis. *J Immunol* **140**, 3522-3527.
- Hara, N., Fujii, T., Yamashita, T., Kozuma, S., Okai, T. und Taketani, Y. (1996). Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody "87G" and anti-cytokeratin antibody "CAM5.2". *Am J Reprod Immunol* **36**, 349-358.
- Hashimoto, K., Azuma, C., Koyama, M., Nobunaga, T., Kimura, T., Shimoya, K., Kubota, Y., Saji, F. und Murata, Y. (1997). Biparental alleles of HLA-G are co-dominantly expressed in the placenta. *Jpn J Hum Genet* **42**, 181-186.
- He, X. und Le, J. (1995). Alternative splicing of HLA class I transcripts induced by IFN-gamma and TNF in fibroblasts: release of soluble HLA class I heavy chain and an associated protein. *Cell Immunol* **162**, 159-168.
- Henderson, R. A., Michel, H., Sakaguchi, K., Shabanowitz, J., Appella, E., Hunt, D. F. und Engelhard, V. H. (1992). HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science* **255**, 1264-1266.
- Herberg, J. A., Sgouros, J., Jones, T., Copeman, J., Humphray, S. J., Sheer, D., Cresswell, P., Beck, S. und Trowsdale, J. (1998). Genomic analysis of the tapasin gene, located close to the TAP loci in the MHC. *Eur J Immunol* **28**, 459-467.
- Hicklin, D. J., Wang, Z., Arienti, F., Rivoltini, L., Parmiani, G. und Ferrone, S. (1998). β 2-microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest* **101**, 2720-2729.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* **30**, 405-439.
- Horuzsko, A., Antoniou, J., Tomlinson, P., Portik-Dobos, V. und Mellor, A. L. (1997). HLA-G functions as a restriction element and a transplantation antigen in mice. *Int Immunol* **9**, 645-653.
- Houchins, J. P., Lanier, L. L., Niemi, E. C., Phillips, J. H. und Ryan, J. C. (1997). Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J Immunol* **158**, 3603-3609.
- Houlihan, J. M., Biro, P. A., Fergar-Payne, A., Simpson, K. L. und Holmes, C. H. (1992). Evidence for the expression of non-HLA-A,-B,-C class I genes in the human fetal liver. *J Immunol* **149**, 668-675.
- Houlihan, J. M., Biro, P. A., Harper, H. M., Jenkinson, H. J. und Holmes, C. H. (1995). The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. *J Immunol* **154**, 5665-74.

- Huang, F., Yamaguchi, A., Tsuchiya, N., Ikawa, T., Tamura, N., Virtala, M. M., Granfors, K., Yasaei, P. und Yu, D. T. (1997). Induction of alternative splicing of HLA-B27 by bacterial infection. *Arthrit Rheumat* 40, 694-703.
- Hughes, E. A., Hammond, C. und Cresswell, P. (1997). Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1896-1901.
- Hughes, E. A. und Cresswell, P. (1998). The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr Biol* 8, 709-712.
- Hunt, J. S. und Orr, H. T. (1992). HLA and maternal-fetal recognition. *Faseb J* 6, 2344-2348.
- Hunt, J. S., Jadhav, L., Chu, W., Geraghty, D. E. und Ober, C. (2000). Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 183, 682-688.
- Hunt, J. S., Pace, J. L., Morales, P. J. und Ober, C. (2003). Immunogenicity of the soluble isoforms of HLA-G. *Mol Hum Reprod* 9, 729-735.
- Hurks, H. M., Valter, M. M., Wilson, L., Hilgert, I., van Den Elsen, P. J. und Jager, M. J. (2001). Uveal Melanoma: No Expression of HLA-G. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 3081-3084.
- Hutter, H., Hammer, A., Blaschitz, A., Hartmann, M., Ebbesen, P., Dohr, G., Ziegler, A. und Uchanska-Ziegler, B. (1996). Expression of HLA class I molecules in human first trimester and term placenta trophoblast. *Cell Tissue Res* 286, 439-447.
- Hutter, H. und Dohr, G. (1998). HLA expression on immature and mature human germ cells. *J Reprod Immunol* 38, 101-122.
- Hviid, T. V., Meldgaard, M., Sorensen, S. und Morling, N. (1997). Polymorphism of exon 3 of the HLA-G gene. *J Reprod Immunol* 35, 31-42.
- Hviid, T. V., Moller, C., Sorensen, S. und Morling, N. (1998). Co-dominant expression of the HLA-G gene and various forms of alternatively spliced HLA-G mRNA in human first trimester trophoblast. *Hum Immunol* 59, 87-98.
- Hviid, T. V., Sorensen, S. und Morling, N. (1999). Polymorphism in the regulatory region located more than 1.1 kilobases 5' to the start site of transcription, the promoter region and exon 1 of the HLA-G gene. *Hum Immunol* 60, 1237-1244.
- Hviid, T. V., Christiansen, O. B., Johansen, J. K., Hviid, U. R., Lundegaard, C., Moller, C. und Morling, N. (2001). Characterization of a new HLA-G allele encoding a nonconservative amino acid substitution in the alpha3 domain (exon 4) and its relevance to certain complications in pregnancy. *Immunogenetics* 53, 48-53.
- Ibrahim, E. C., Guerra, N., Lacombe, M. J., Angevin, E., Chouaib, S., Carosella, E. D., Caignard, A. und Paul, P. (2001). Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res* 61, 6838-6845.
- Ibrahim E. C., Allory, Y., Commo, F., Gattegno, B., Callard, P. und Paul, P. (2003). Altered pattern of major histocompatibility complex expression in renal carcinoma: tumor-specific expression of the nonclassical human leukocyte antigen-G molecule is restricted to clear cell carcinoma while up-regulation of other major histocompatibility complex antigens is primarily distributed in all subtypes of renal carcinoma. *Am J Pathol* 162, 501-508.
- Ishitani, A. und Geraghty, D. E. (1992). Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3947-3951.
- Ishitani, A., Kishida, M., Sageshima, N., Yashiki, S., Sonoda, S., Hayami, M., Smith, A. G. und Hatake, K. (1999). Re-examination of HLA-G polymorphism in African Americans. *Immunogenetics* 49, 808-811.
- Ishitani, A., Sageshima, N., Lee, N., Dorofeeva, N., Hatake, K., Marquardt, H. und Geraghty, E. (2003). Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J. Immunol* 171, 1376-1384.
- Jefferies, W. A. und MacPherson, G. G. (1987). Expression of the W6/32 HLA epitope by cells of rat, mouse, human and other species: critical dependence on the interaction of specific MHC heavy chains with human or bovine β 2-microglobulin. *Eur J Immunol* 17, 1257-1263.
- Juriscova, A., Casper, R. F., MacLusky, N. J., Mills, G. B. und Librach, C. L. (1996). HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 161-165.
- Kanai, T., Fujii, T., Kozuma, S., Yamashita, T., Miki, A., Kikuchi, A. und Taketani, Y. (2001). Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Mol Hum Reprod* 7, 195-200.
- Kapasi, K., Albert, S. E., Yie, S., Zavazava, N. und Librach, C. L. (2000). HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response. *Immunology* 101, 191-200.
- Karhukorpi, J., Ikaheimo, I., Silvennoinen-Kassinen, S. und Tiilikainen, A. (1996). HLA-G polymorphism and allelic association with HLA-A in a Finnish population. *Eur J Immunogenet* 23, 153-155.
- Kim, H. S., Garcia, J., Exley, M., Johnson, K. W., Balk, S. P. und Blumberg, R. S. (1999). Biochemical characterization of CD1d expression in the absence of β 2-microglobulin. *J Biol Chem* 274, 9289-9295.

- King, A., Boocock, C., Sharkey, A. M., Gardner, L., Beretta, A., Siccardi, A. G. und Loke, Y. W. (1996). Evidence for the expression of HLA-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast. *J Immunol* **156**, 2068-2076.
- King, A., Burrows, T., Verma, S., Hiby, S. und Loke, Y. W. (1998). Human uterine lymphocytes. *Hum Reprod Update* **4**, 480-485.
- King, A., Burrows, T. D., Hiby, S. E., Bowen, J. M., Joseph, S., Verma, S., Lim, P. B., Gardner, L., Le Bouteiller, P., Ziegler, A., *et al.* (2000 a). Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. *Placenta* **21**, 376-387.
- King, A., Allan, D. S., Bowen, M., Powis, S. J., Joseph, S., Verma, S., Hiby, S. E., McMichael, A. J., Loke, Y. W. und Braud, V. M. (2000 b). HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol* **30**, 1623-1631.
- Kirszenbaum, M., Moreau, P., Gluckman, E., Dausset, J. und Carosella, E. (1994). An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 4209-4213.
- Kirszenbaum, M., Djoulah, S., Hors, J., Le Gall, I., de Oliveira, E. B., Prost, S., Dausset, J. und Carosella, E. D. (1997). HLA-G gene polymorphism segregation within CEPH reference families. *Hum Immunol* **53**, 140-147.
- Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Woo, K. M. und Goldberg, A. L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* **274**, 3363-3371.
- Kleijnen, M. F., Huppa, J. B., Lucin, P., Mukherjee, S., Farrell, H., Campbell, A. E., Koszinowski, U. H., Hill, A. B. und Ploegh H. L. (1997). A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J* **16**, 685-694.
- Kovats, S., Main, E. K., Librach, C., Stubblebine, M., Fisher, S. J. und DeMars, R. (1990). A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* **248**, 220-223.
- Krangel, M. S. (1986). Secretion of HLA-A and -B antigens via an alternative RNA splicing pathway. *J Exp Med* **163**, 1173-1190.
- Kuipers, J. G., Bialowons, A., Dollmann, P., Jendro, M. C., Koehler, L., Ikeda, M., Yu, D. T. und Zeidler, H. (2001). The modulation of chlamydial replication by HLA-B27 depends on the cytoplasmic domain of HLA-B27. *Clin Exp Rheumatol* **19**, 47-52.
- Kulig, K., Nandi, D., Bacik, I., Monaco, J. J. und Vukmanovic S. (1998). Physical and functional association of the major histocompatibility complex class I heavy chain $\alpha 3$ domain with the transporter associated with antigen processing. *J Exp Med* **187**, 865-874.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langat, D. K., Morales, P. J., Fazleabas, A. T., Mwenda, J. M. und Hunt, J. S. (2002). Baboon placentas express soluble and membrane-bound Paan-AG proteins encoded by alternatively spliced transcripts of the class Ib major histocompatibility complex gene, Paan-AG. *Immunogenetics* **54**, 164-173.
- Lanier, L. L., Ruitenberg, J. J. und Phillips, J. H. (1988). Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J Immunol* **141**, 3478-3485.
- Lanier, L. L., Corliss, B. C., Wu, J., Leong, C. und Phillips, J. H. (1998). Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* **391**, 703-707.
- Lanier, L. L. (2001). On guard-activating NK cell receptors. *Nat Immun* **2**, 23-27.
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J. P., Lanier, L. L. und Phillips, J. H. (1996). Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* **157**, 4741-4745.
- Le Bouteiller, P. (1994). HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol* **14**, 89-129.
- Le Bouteiller, P. und Lenfant, F. (1996). Antigen-presenting function(s) of the non-classical HLA-E, -F and -G class I molecules: the beginning of a story. *Res Immunol* **147**, 301-313.
- Le Drean, E., Vely, F., Olcese, L., Cambiaggi, A., Guia, S., Krystal, G., Gervois, N., Moretta, A., Jotereau, F. und Vivier, E. (1998). Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol* **28**, 264-276.
- Le Gal, F. A., Riteau, B., Sedlik, C., Khalil-Daher, I., Menier, C., Dausset, J., Guillet, J. G., Carosella, E. D. und Rouas-Freiss, N. (1999). HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* **11**, 1351-1356.
- Lee, N., Malacko, A. R., Ishitani, A., Chen, M. C., Bajorath, J., Marquardt, H. und Geraghty, D. E. (1995). The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity* **3**, 591-600.
- Lee, N., Goodlett, D. R., Ishitani, A., Marquardt, H. und Geraghty, D. E. (1998 a). HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol* **160**, 4951-4960.

- Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M. und Geraghty, D. E. (1998 b). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 5199-5204.
- Lefebvre, S., Berrih-Aknin, S., Adrian, F., Moreau, P., Poeta, S., Gourand, L., Dausset, J., Carosella, E. D. und Paul, P. (2001). A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. *J Biol Chem* 276, 6133-6139.
- Lefebvre, S., Antoine, M., Uzan, S., McMaster, M., Dausset, J., Carosella, E. D. und Paul, P. (2002). Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. *J Pathol* 196, 266-274.
- Lenfant, F., Pizzato, N., Liang, S., Davrinche, C., Le Bouteiller, P. und Horuzsko, A. (2003). Induction of HLA-G-restricted human cytomegalovirus pp65 (UL83)-specific cytotoxic T lymphocytes in HLA-G transgenic mice. *J Gen Virol* 84, 307-317.
- Lepin, E. J., Bastin, J. M., Allan, D. S., Roncador, G., Braud, V. M., Mason, D. Y., van der Merwe, P. A., McMichael, A. J., Bell, J. I., Powis, S. H. und O'Callaghan, C. A. (2000). Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. *Eur J Immunol* 30, 3552-3561.
- Lewis, J. W., Neisig, A., Neefjes, J. und Elliott, T. (1996). Point mutations in the $\alpha 2$ domain of HLA-A2.1 define a functionally relevant interaction with TAP. *Curr Biol* 6, 873-883.
- L'Faqihi, F. E., Guiraud, M., Dastugue, N., Brousset, P., Le Bouteiller, P., Halary, F., Bonneville, M., Fournie, J. J. und Champagne, E. (1999). Acquisition of a stimulatory activity for Vgamma9/Vdelta2 T cells by a Burkitt's lymphoma cell line without loss of HLA class I expression. *Hum Immunol* 60, 928-938.
- Lila, N., Rouas-Freiss, N., Dausset, J., Carpentier, A. und Carosella, E. D. (2001). Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: A CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 12150-12155.
- Lindquist, J. A., Jensen, O. N., Mann, M. und Hämmerling, G. J. (1998). ER-60, chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *EMBO J* 17, 2186-2195.
- Litwin, V., Gumperz, J., Parham, P., Phillips, J. H. und Lanier, L. L. (1994). NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med* 180, 537-543.
- Llano, M., Lee, N., Navarro, F., Garcia, P., Albar, J. P., Geraghty, D. E. und Lopez-Botet, M. (1998). HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol* 28, 2854-2863.
- Loke, Y. W., King, A., Burrows, T., Gardner, L., Bowen, M., Hiby, S., Howlett, S., Holmes, N. und Jacobs, D. (1997). Evaluation of trophoblast HLA-G antigen with a specific monoclonal antibody. *Tissue Antigens* 50, 135-146.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. und Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3,4 Å resolution. *Science* 268, 533-539.
- Maejima, M., Fujii, T., Kozuma, S., Okai, T., Shibata, Y. und Taketani, Y. (1997). Presence of HLA-G-expressing cells modulates the ability of peripheral blood mononuclear cells to release cytokines. *Am J Reprod Immunol* 38, 79-82.
- Maier, S., Geraghty, D. E. und Weiss, E. H. (1999). Expression and regulation of HLA-G in human glioma cell lines. *Transplant Proc* 31, 1849-1853.
- Maier, S. (2000). Das komplexe Expressionsmuster von HLA-G und die Bedeutung seiner Genprodukte für die Funktion antigenunspezifischer Immuneffektorzellen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Maiza, H., Leca, G., Mansur, I. G., Schiavon, V., Boumsell, L. und Bensussan, A. (1993). A novel 80-kD cell surface structure identifies human circulating lymphocytes with natural killer activity. *J Exp Med* 178, 1121-1126.
- Malik, P., Baba, E. und Strominger, J. L. (1999). Biotinylation of class I MHC molecules abrogates recognition by W6/32 antibody. *Tissue Antigens* 53, 576-579.
- Mallet, V., Fournel, S., Schmitt, C., Campan, A., Lenfant, F. und Le Bouteiller, P. (1999 a). Primary cultured human thymic epithelial cells express both membrane-bound and soluble HLA-G translated products. *J Reprod Immunol* 43, 225-234.
- Mallet, V., Blaschitz, A., Crisa, L., Schmitt, C., Fournel, S., King, A., Loke, Y. W., Dohr, G. und Le Bouteiller, P. (1999 b). HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial but not CD83(+) dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein. *Int Immunol* 11, 889-898.
- Mallet, V., Pröll, J., Solier, C., Aguerre-Girr, M., DeRossi, M., Loke, Y. W., Lenfant, F. und Le Bouteiller, P. (2000). The full length HLA-G1 and no other alternative form of HLA-G is expressed at the cell surface of transfected cells. *Hum Immunol* 61, 212-224.
- Malnati, M. S., Peruzzi, M., Parker, K. C., Biddison, W. E., Ciccone, E., Moretta, A. und Long, E. O. (1995). Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science* 267, 1016-1018.
- Mandelboim, O., Reyburn, H. T., Sheu, E. G., Valés-Gómez, M., Davis, D. M., Pazmany, L. und Strominger, J. L. (1997). The binding site of NK receptors on HLA-C molecules. *Immunity* 6, 341-350.

- Martin, A. M., Freitas, E. M., Witt, C. S. und Christiansen, F. T. (2000). The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics* 57, 268-280.
- Matte, C., Lacaille, J., Zijenah, L., Ward, B. und Roger, M. (2000). HLA-G and HLA-E polymorphisms in an indigenous African population. *Hum Immunol* 61, 1150-1156.
- Matte, C., Lacaille, J., Zijenah, L., Ward, B. und Roger, M. (2002). HLA-G exhibits low level of polymorphism in indigenous East Africans. *Hum Immunol* 63, 495-501.
- McMaster, M. T., Librach, C. L., Zhou, Y., Lim, K. H., Janatpour, M. J., DeMars, R., Kovats, S., Damsky, C. und Fisher, S. J. (1995). Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol* 154, 3771-3778.
- McMaster, M., Zhou, Y., Shorter, S., Kapasi, K., Geraghty, D., Lim, K. H. und Fisher, S. (1998). HLA-G isoforms produced by placental cytotrophoblasts and found in amniotic fluid are due to unusual glycosylation. *J Immunol* 160, 5922-5828.
- Menier, C., Riteau, B., Carosella, E. D. und Rouas-Freiss, N. (2002). MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA- G1-mediated inhibitory signal. *Int J Cancer* 100, 63-70.
- Menier, C., Saez, B., Horejsi, V., Martinuzzi, S., Krawice-Radanne, I., Bruel, S., Le Danff, C., Reboul, M., Hilgert, I., Rabreau, M., *et al.* (2003). Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. *Hum Immunol* 64, 315-326.
- Meyer, T. H., van Endert, P. M., Uebel, S., Ehring, B. und Tampé, R. (1994). Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells. *FEBS Lett* 351, 443-447.
- Michaelsson, J., Achour, A., Rölle, A. und Kärre, K. (2001). MHC class I recognition by NK receptors in the Ly49 family is strongly influenced by the $\beta 2$ -microglobulin subunit. *J Immunol* 166, 7327-7334.
- Michaelsson, J., Teixeira de Matos, C., Achour, A., Lanier, L. L., Karre, K. und Söderström, K. (2002). A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J Exp Med* 196, 1403-1414.
- Mincheva-Nilsson, L., Hammarström, S. und Hammarström, M.-L. (1992). Human decidual leukocytes from early pregnancy contain high numbers of $\gamma\delta^+$ cells and show selective down-regulation of alloreactivity. *J Immunol* 149, 2203-2211.
- Mincheva-Nilsson, L., Baranov, V., Yeung, M. M., Hammarstrom, S. und Hammarstrom, M. L. (1994). Immunomorphologic studies of human decidua-associated lymphoid cells in normal early pregnancy. *J Immunol* 152, 2020-2032.
- Mincheva-Nilsson, L., Kling, M., Hammarström, S., Nagaeva, O., Sundquist, K.-G., Hammarström, M.-L. und Baranov, V. (1997). $\gamma\delta$ T cells of human early pregnancy decidua: evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity, and extrathymic differentiation. *J Immunol* 159, 3266-3277.
- Mingari, M. C., Vitale, C., Cambiaggi, A., Schiavetti, F., Melioli, G., Ferrini, S. und Poggi, A. (1995). Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity: expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production. *Int Immunol* 7, 697-703.
- Mingari, M. C., Ponte, M., Vitale, C., Schiavetti, F., Bellomo, R., Bertone, S. und Nanni, L. (1997). HLA class-I-specific inhibitory receptor in human T lymphocytes: interference with T-cell functions. *Res Immunol* 148, 150-155.
- Mingari, M. C., Ponte, M., Bertone, S., Schiavetti, F., Vitale, C., Bellomo, R., Moretta, A. und Moretta, L. (1998). HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 1172-1177.
- Mizuno, S., Emi, N., Kasai, M., Ishitani, A. und Saito H. (2000). Aberrant expression of HLA-G antigen in interferon γ -stimulated acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 111, 280-282.
- Moffet-King, A., Entrican, G., Ellis, S., Hutchinson, J. und Bainbridge, D. (2002). Natural killer cells and reproduction. *Trends Immunol* 23, 332-333.
- Morales, P., Corell, A., Martinez-Laso, J., Martin-Villa, J. M., Varela, P., Paz-Artal, E., Allende, L. M. und Arnaiz-Villena, A. (1993). Three new HLA-G alleles and their linkage disequilibria with HLA-A. *Immunogenetics* 38, 323-331.
- Morales, P. J., Pace, J. L., Platt, J. S., Phillips, T. A., Morgan, K., Fazleabas, A. T. und Hunt, J. S. (2003). Placental cell expression of HLA-G2 isoforms is limited to the invasive trophoblast phenotype. *J Immunol* 171, 6215-6224.
- Moreau, P., Carosella, E., Teyssier, M., Prost, S., Gluckman, E., Dausset, J. und Kirszenbaum, M. (1995). Soluble HLA-G molecule. An alternatively spliced HLA-G mRNA form candidate to encode it in peripheral blood mononuclear cells and human trophoblasts. *Hum Immunol* 43, 231-236.
- Moreau, P., Adrian-Cabestre, F., Menier, C., Guiard, V., Gourand, L., Dausset, J., Carosella, E. D. und Paul, P. (1999). IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 11, 803-811.

- Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., Orengo, A. M., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Ciccone, E. und Moretta, L. (1993). P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 178, 597-604.
- Moretta, A., Sivori, S., Vitale, M., Pende, D., Morelli, L., Augugliaro, R., Bottino, C. und Moretta, L. (1995). Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* 182, 875-884.
- Morrice, N. A. und Powis, S. J. (1998). A role for the thiol-dependent reductase ERp57 in the assembly of MHC class I molecules. *Curr Biol* 8, 713-716.
- Münz, C., Holmes, N., King, A., Loke, Y. W., Colonna, M., Schild, H. und Rammensee, H. G. (1997). Human Histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells. *J Exp Med* 185, 385-391.
- Münz, C., Nickolaus, P., Lammert, E., Pascolo, S., Stevanovic, S. und Rammensee, H. G. (1999). The role of peptide presentation in the physiological function of HLA-G. *Semin Cancer Biol* 9, 47-54.
- Nagler, A., Lanier, L. L., Cwirla, S. und Phillips, J. H. (1989). Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 143, 3183-3191.
- Nandi, D., Jiang, H. und Monaco, J. J. (1996). Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN- γ -inducible proteasome subunit. *J Immunol* 156, 2361-2364.
- Navarro, F., Llano, M., Bellón, T., Colonna, M., Geraghty, D. E. und Lopez-Botet, M. (1999). The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* 29, 277-283.
- Neeffjes, J. J., Momburg, F. und Hämmerling G. J. (1993). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 261, 769-771.
- Neisig, A., Wubbolts, R., Zang, X., Melief, C. und Neeffjes, J. (1996). Allele-specific differences in the interaction of MHC class I molecules with transporters associated with antigen processing. *J Immunol* 156, 3196-3206.
- Nikolova, M., Musette, P., Bagot, M., Boumsell, L. und Bensussan, A. (2002). Engagement of ILT2/CD85j in Sézary syndrome cells inhibits their CD3/TCR signaling. *Blood* 100, 1019-1025.
- Ober, C., Rosinsky, B., Grimsley, C., van der Ven, K., Robertson, A. und Runge, A. (1996). Population genetic studies of HLA-G: allele frequencies and linkage disequilibrium with HLA-A1. *J Reprod Immunol* 32, 111-123.
- Ober, C. und Aldrich, C. L. (1997). HLA-G polymorphisms: neutral evolution or novel function? *J Reprod Immunol* 36, 1-21.
- Ober, C., Aldrich, C., Rosinsky, B., Robertson, A., Walker, M. A., Willadsen, S., Verp, M. S., Geraghty, D. E. und Hunt, J. S. (1998). HLA-G1 protein expression is not essential for fetal survival. *Placenta* 19, 127-132.
- Ogretmen, B., McCauley, M. D. und Safa, A.R. (1998). Molecular mechanisms of loss of beta 2-microglobulin expression in drug-resistant breast cancer sublines and its involvement in drug resistance. *Biochemistry* 37, 11679-11691.
- Ohashi, K., Saji, F., Kato, M., Wakimoto, A. und Tanizawa, O. (1990). HLA expression on human ejaculated sperm. *Am J Reprod Immunol* 23, 29-32.
- Onno, M., Guillaudeux, T., Amiot, L., Renard, I., Drénou, B., Hirel, B., Girr, M., Semana, G., Le Bouteiller, P. und Fauchet, R. (1994). The HLA-G gene is expressed at a low mRNA level in different human cells and tissues. *Hum Immunol* 41, 79-86.
- Ortiz-Navarrete, V., Seelig, A., Gernold, M., Frentzel, S., Kloetzel, P. M. und Hämmerling, G. J. (1991). Subunit of the „20“S Proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 353, 662-664.
- Ortmann, B., Androlewicz, M. J. und Cresswell, P. (1994). MHC class I/ β 2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 368, 864-867.
- Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P. J., Sadasivan, B., Herberg, J. A., Grandea, A. G., Riddell S. R., Tampé, R., Spies, T., Trowsdale, J. und Cresswell, P. (1997). A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 277, 1306-1309.
- Palmisano, G. L., Pistillo, M. P., Fardin, P., Capanni, P., Nicolo, G., Salvi, S., Spina, B., Pasciucchio, G. und Ferrara, G. B. (2002). Analysis of HLA-G expression in breast cancer tissues. *Hum Immunol* 63, 969-976.
- Pangault, C., Amiot, L., Caulet-Maugendre, S., Bresseur, F., Burtin, F., Guilloux, V., Drénou, B., Fauchet, R. und Onno, M. (1999). HLA-G protein expression is not induced during malignant transformation. *Tissue Antigens* 53, 335-346.
- Parham, P., Barnstable, C. J. und Bodmer, W. F. (1979). Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C, antigens. *J Immunol* 123, 342-349.
- Parham, P., Lomen, C. E., Lawlor, D. A., Ways, J. P., Holmes, N., Coppin, H. L., Salter, R. D., Wan, A. M. und Ennis, P. D. (1988). Nature of polymorphism in HLA-A, -B, and -C molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 4005-4009.
- Park, B., Lee, S., Kim, E., Chang, S., Jin, M. und Ahn, K. (2001). The truncated cytoplasmic tail of HLA-G serves a quality-control function in post-ER compartments. *Immunity* 15, 213-224.

- Park, B. und Ahn, K. (2003). An essential function of Tapasin in quality control of HLA-G molecules. *J Biol Chem* 278, 14337-14345.
- Parker, C. M., Groh, V., Band, H., Porcelli, S. A., Morita, C., Fabbi, M., Glass, D., Strominger, J. L. und Brenner, M. B. (1990). Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor γ/δ repertoire. *J Exp Med* 171, 1597-1612.
- Paul, P., Rouas-Freiss, N., Khalil-Daher, I., Moreau, P., Riteau, B., Le Gal, F. A., Avril, M. F., Dausset, J., Guillet, J. G. und Carosella, E. D. (1998). HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4510-4515.
- Paul, P., Cabestre, F. A., Le Gal, F. A., Khalil-Daher, I., Le Danff, C., Schmid, M., Mercier, S., Avril, M. F., Dausset, J., Guillet, J. G. und Carosella, E. D. (1999). Heterogeneity of HLA-G gene transcription and protein expression in malignant melanoma biopsies. *Cancer Res* 59, 1954-1960.
- Paul, P., Cabestre, F. A., Ibrahim, E. C., Lefebvre, S., Khalil-Daher, I., Vazeux, G., Quiles, R. M., Bermond, F., Dausset, J. und Carosella, E. D. (2000). Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. *Hum Immunol* 61, 1138-1149.
- Peace-Brewer, A. L., Tussey, L. G., Matsui, M., Li, G., Quinn, D. G. und Frelinger, J. A. (1996). A point mutation in HLA-A*0201 results in failure to bind the TAP complex and to present virus-derived peptides to CTL. *Immunity* 4, 505-514.
- Peh, C. A., Burrows, S. R., Barnden, M., Khanna, R., Cresswell, P., Moss, D. J. und McCluskey, J. (1998). HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading. *Immunity* 8, 531-542.
- Pende, D., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., di Donato, C., Accame, L., Bottino, C., Moretta, A., und Moretta, L. (1996). The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med* 184, 505-518.
- Pende, D., Sivori, S., Accame, L., Pareti, L., Falco, M., Geraghty, D., Le Bouteiller, P., Moretta, L. und Moretta, A. (1997). HLA-G recognition by human natural killer cells. Involvement of CD94 both as inhibitory and as activating receptor complex. *Eur J Immunol* 27, 1875-1880.
- Pende, D., Accame, L., Pareti, L., Mazzocchi, A., Moretta, A., Parmiani, G. und Moretta, L. (1998). The susceptibility to natural killer cell-mediated lysis of HLA class I-positive melanomas reflects the expression of insufficient amounts of different HLA class I alleles. *Eur J Immunol* 28, 2384-2394.
- Pende, D., Cantoni, C., Rivera, P., Vitale, M., Castriconi, R., Marcenaro, S., Nanni, M., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, A. und Moretta, L. (2001). Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol* 31, 1076-1086.
- Pende, D., Rivera, P., Marcenaro, S., Chang, C.-C., Biassoni, R., Conte, R., Kubin, M., Cosman, D., Ferrone, S., Moretta, L. und Moretta, A. (2002). Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* 62, 6178-6186.
- Perez-Villar, J. J., Melero, I., Navarro, F., Carretero, M., Bellón, T., Llano, M., Colonna, M., Geraghty, D. E. und Lopez-Botet, M. (1997). The CD94/NKG2-A inhibitory receptor complex is involved in natural killer cell-mediated recognition of cells expressing HLA-G1. *J Immunol* 158, 5736-5743.
- Peruzzi, M., Wagtmann, N. und Long, E. O. (1996). A p70 killer cell inhibitory receptor specific for several HLA-B allotypes discriminates among peptides bound to HLA-B*2705. *J Exp Med* 184, 1585-1590.
- Petroff, M. G., Sedlmayr, P., Azzola, D. und Hunt, J. S. (2002). Decidual macrophages are potentially susceptible to inhibition by class Ia and class Ib HLA molecules. *J Reprod Immunol* 56, 3-17.
- Pfeiffer, K. A., Rebmann, V., Passler, M., van der Ven, K., van der Ven, H., Krebs, D. und Grosse-Wilde, H. (2000). Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization. *Hum Immunol* 61, 559-564.
- Pfeiffer, K. A., Fimmers, R., Engels, G., van der Ven, H. und van der Ven, K. (2001). The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Mol Hum Reprod* 7, 373-378.
- Pilon, M., Schekman, R. und Römisch, K. (1997). Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J* 16, 4540-4508.
- Poláková, K. und Russ, G. (2000). Expression of the non-classical HLA-G antigen in tumor cell lines is extremely restricted. *Neoplasma* 47, 342-348.
- Poláková, K., Krcová, M., Kuba, D. und Russ, G. (2003). Analysis of HLA-G expression in malignant hematopoietic cells from leukemia patients. *Leuk Res* 27, 643-648.
- Ponte, M., Cantoni, C., Biassoni, R., Tradori-Cappai, A., Bentivoglio, G., Vitale, C., Bertone, S., Moretta, A., Moretta, L. und Mingari, M. C. (1999). Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 5674-5679.
- Pröll, J., Bensussan, A., Goffin, F., Foidart, J. M., Berrebi, A. und Le Bouteiller, P. (2000). Tubal versus uterine placentation: similar HLA-G expressing extravillous cytotrophoblast invasion but different maternal leukocyte recruitment. *Tissue Antigens* 56, 479-491.

- Pulford, K., Micklem, K., Thomas, J., Jones, M. und Mason, D. Y. (1991). A 72-kD B cell-associated surface glycoprotein expressed at high levels in hairy cell leukaemia and plasma cell neoplasms. *Clin Exp Immunol* **85**, 429-435.
- Puppo, F., Costa, M., Contini, P., Brenci, S., Cevasco, E., Ghio, M., Norelli, R., Bensussan, A., Capitanio, G. L. und Indiveri, F. (1999). Determination of soluble HLA-G and HLA-A, -B und -C molecules in pregnancy. *Transplant Proc* **31**, 1841-1843.
- Raghupathy, R. (1997). Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* **18**, 478-482.
- Rajagopalan, S. und Long, E. O. (1997). The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4 exhibits peptide selectivity. *J Exp Med* **185**, 1523-1528.
- Rajagopalan, S. und Long, E. O. (1999). A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* **189**, 1093-1100.
- Rajagopalan, S., Fu, J. und Long, E. O. (2001). Cutting edge: induction of IFN- γ production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* **167**, 1877-1881.
- Rapoport, T. A., Rolls, M. M. und Jungnickel, B. (1996). Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 499-504.
- Real, L. M., Cabrera, T., Canton, J., Oliva, R., Ruiz-Cabello, F. und Garrido, F. (1999 a). Looking for HLA-G expression in human tumours. *J Reprod Immunol* **43**, 263-273.
- Real, L. M., Cabrera, T., Collado, A., Jimenez, P., Garcia, A., Ruiz-Cabello, F. und Garrido, F. (1999 b). Expression of HLA G in human tumors is not a frequent event. *Int J Cancer* **81**, 512-518.
- Rebmann, V., Pfeiffer, K., Passler, M., Ferrone, S., Maier, S., Weiss, E. und Grosse-Wilde, H. (1999). Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid. *Tissue Antigens* **53**, 14-22.
- Rebmann, V., van der Ven, K., Passler, M., Pfeiffer, K., Krebs, D. und Grosse-Wilde, H. (2001). Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* **57**, 15-21.
- Rebmann, V., Regel, J., Stolke, D. und Grosse-Wilde, H. (2003). Secretion of sHLA-G molecules in malignancies. *Semin Canc Biol* **13**, 371-377.
- Redman, C. W. (1991). Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* **12**, 301-308.
- Restifo, N. P., Marincola, F. M., Kawakami, Y., Taubenberger, J., Yannelli, J. R. und Rosenberg, S. A. (1996). Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* **88**, 100-108.
- Rieger, L., Hofmeister, V., Probe, C., Dietsch, J., Weiss, E. H., Steck, T. und Kämmerer, U. (2002). Th1- and Th2-like cytokine production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E. *Mol Hum Reprod* **8**, 255-261.
- Rinke de Wit, T. F., Vloemans, S., van den Elsen, P. J., Haworth, A. und Stern, P. L. (1990). Differential expression of the HLA class I multigene family by human embryonal carcinoma and chorioncarcinoma cell lines. *J Immunol* **144**, 1080-1087.
- Riteau, B., Menier, C., Khalil-Daher, I., Sedlik, C., Dausset, J., Rouas-Freiss, N. und Carosella, E. D. (1999). HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. *J Reprod Immunol* **43**, 203-211.
- Riteau, B., Rouas-Freiss, N., Menier, C., Paul, P., Dausset, J. und Carosella, E. D. (2001). HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J Immunol* **166**, 5018-5026.
- Roberts, J. M., Taylor, C. T., Melling, G. C., Kingsland, C. R. und Johnson, P. M. (1992). Expression of the CD46 antigen, and absence of class I MHC antigen, on the human oocyte and preimplantation blastocyst. *Immunol* **75**, 202-205.
- Robertson, M. J., Cochran, K. J., Cameron, C., Le, J. M., Tantravahi, R. und Ritz, J. (1996). Characterization of a cell line, NK1, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol* **24**, 406-415.
- Rock, K. L. und Goldberg, A. L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* **17**, 739-779.
- Roelse, J., Gromme, M., Momburg, F., Hammerling, G. und Neefjes, J. (1994). Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. *J Exp Med* **180**, 1591-1597.
- Rosa, F., Fellous, M., Dron, M., Tovey, M. und Revel, M. (1983). Presence of an abnormal beta 2-microglobulin mRNA in Daudi cells: induction by interferon. *Immunogenetics* **17**, 125-131.
- Rouas-Freiss, N., Marchal, R. E., Kirszenbaum, M., Dausset, J. und Carosella, E. D. (1997). The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 5249-5254.
- Rouas-Freiss, N., Khalil-Daher, I., Riteau, B., Menier, C., Paul, P., Dausset, J. und Carosella, E. D. (1999). The immunotolerance role of HLA-G. *Semin Cancer Biol* **9**, 3-12.
- Ryan, A. F., Grendell, R. L., Geraghty, D. E. und Golos, T. G. (2002). A soluble isoform of the rhesus monkey nonclassical MHC class I molecule Mamu-AG is expressed in the placenta and the testis. *J Immunol* **169**, 673-683.

- Sadasivan, B., Lehner, P. J., Ortmann, B., Spies, T. und Cresswell, P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5, 103-114.
- Saiki, R. K., Gelfand D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Salih, H. R., Rammensee, H.-G. und Steinle, A. (2002). Cutting Edge : Down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 169, 4098-4102.
- Salter, R. D., Howell, D. N. und Cresswell, P. (1985). Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* 21, 235-246.
- Salter, R. D. und Cresswell, P. (1986). Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *EMBO J* 5, 943-949.
- Salter, R. D., Benjamin, R. J., Wesley, P. K., Buxton, S. E., Garrett, T. P., Clayberger, C., Krensky, A. M., Norment, A. M., Littman, D. R. und 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.
- Samaridis, J. und Colonna, M. (1997). Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur J Immunol* 27, 660-665.
- Sanders, S. K., Giblin, P. A. und Kavathas, P. (1991). Cell-cell adhesion mediated by CD8 and human histocompatibility leukocyte antigen G, a nonclassical major histocompatibility complex class 1 molecule on cytrophoblasts. *J Exp Med* 174, 737-740.
- Saper, M. A., Bjorkman, P. J. und Wiley, D. C. (1991). Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 219, 277-319.
- Saverino, D., Fabbi, M., Ghiotto, F., Merlo, A., Bruno, S., Zarccone, D., Tenca, C., Tiso, M., Santoro, G., Anastasi, G., Cosman, D., Grossi, C.E. und Ciccone, E. (2000). The CD85/LIR-1/ILT2 inhibitory receptor is expressed by all human T lymphocytes and down-regulates their functions. *J Immunol* 165, 3742-3755.
- Saverino, D., Merlo, A., Bruno, S., Pistoia, V., Grossi, C.E. und Ciccone, E. (2002). Dual effect of CD85/Leukocyte Ig-like receptor-1/Ig-like transcript 2 and CD152 (CTLA-4) on cytokine production by antigen-stimulated human T cells. *J Immunol* 168, 207-215.
- Schilling, H. G., Young, N., Guethlein, L. A., Cheng, N. W., Gardiner, C. M., Tyan, D. und Parham, P. (2002). Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol* 169, 239-247.
- Schmidt, C. M. und Orr, H. T. (1995). HLA-G transgenic mice: a model for studying expression and function at the maternal/fetal interface. *Immunol Rev* 147, 53-65.
- Schmidt, C. M., Garrett, E. und Orr, H. T. (1997). Cytotoxic T lymphocyte recognition of HLA-G in mice. *Hum Immunol* 55, 127-139.
- Seitz, C., Uchanska-Ziegler, B., Zank, A. und Ziegler, A. (1998). The monoclonal antibody HCA2 recognises a broadly shared epitope on selected classical as well as several non-classical HLA class I molecules. *Mol Immunol* 35, 819-827.
- Selvakumar, A., Steffens, U. und Dupont, B. (1996). NK cell receptor gene of the KIR family with two Ig domains but highest homology to KIR receptors with three Ig domains. *Tissue Antigens* 48, 285-294.
- Selvakumar, A., Steffens, U., Palanisamy, N., Chaganti, R. S. und Dupont, B. (1997). Genomic organization and allelic polymorphism of the human killer cell inhibitory receptor gene KIR103. *Tissue Antigens* 49, 564-573.
- Sernee, M. F., Ploegh, H. L. und Schust, D. J. (1998). Why certain antibodies cross-react with HLA-A and HLA-G: epitope mapping of two common MHC class I reagents. *Mol Immunol* 35, 177-188.
- Shawar, S. M., Vyas, J. M., Rodgers, J. R. und Rich, R. R. (1994). Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules. *Annu Rev Immunol* 12, 839-880.
- Shepherd, J. C., Schumacher, T. N., Ashton-Rickardt, P. G., Imaeda, S., Ploegh, H. L., Janeway, C. A. Jr und Tonegawa, S. (1993). TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell* 74, 577-584.
- Shields, M. J. und Ribaldo, R. K. (1998). Mapping of the monoclonal antibody W6/32: sensitivity to the amino terminus of $\beta 2$ -microglobulin. *Tissue Antigens* 51, 567-570.
- Shimizu, Y., Geraghty, D. E., Koller, B. H., Orr, H. T. und DeMars, R. (1988). Transfer and expression of three cloned human non-HLA-A, -B, -C class I major histocompatibility complex genes in mutant lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 227-231.
- Shimizu, Y. und DeMars, 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.
- Shukla, H., Swaroop, A., Srivastava, R. und Weissman, S. M. (1990). The mRNA of a human class I gene HLA G/HLA 6.0 exhibits a restricted pattern of expression. *Nucleic Acids Res* 18, 2189.
- Singer, D. S. und Maguire, J. E. (1990). Regulation of the expression of class I MHC genes. *Crit Rev Immunol* 10, 235-257.
- Slukvin, I. I., Watkins, D. I. und Golos, T. G. (1999). Tissue distribution of the mRNA for a rhesus monkey major histocompatibility class Ib molecule, Mamu-AG. *Tissue Antigens* 53, 282-291.

- Söderström, K., Corliss, B., Lanier, L. L. und Phillips, J. H. (1997). CD94/NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in recognition of HLA-G by decidual and peripheral blood NK cells. *J Immunol* **159**, 1072-1075.
- Solheim, J. C., Harris, M. R., Kindle, C. S. und Hansen, T. H. (1997). Prominence of β 2-microglobulin, class I heavy chain conformation, and tapasin in the interactions of class I heavy chain with calreticulin and the transporter associated with antigen processing. *J Immunol* **158**, 2236-2241.
- Solier, C., Aguerre-Girr, M., Lenfant, F., Campan, A., Berrebi, A., Rebmann, V., Grosse-Wilde, H. und Le Bouteiller, P. (2002). Secretion of pro-apoptotic intron 4-retaining soluble HLA-G1 by human villous trophoblast. *Eur J Immunol* **32**, 3576-3586.
- Spaggiari, G. M., Contini, P., Carosio, R., Arvigo, M., Ghio, M., Oddone, D., Dondero, A., Zocchi, M. R., Puppo, F., Indiveri, F. und Poggi, A. (2002). Soluble HLA class I molecules induce natural killer cell apoptosis through the engagement of CD8: evidence for a negative regulation exerted by members of the inhibitory receptor superfamily. *Blood* **99**, 1706-1714.
- Stam, N. J., Spits, H. und Ploegh, H. L. (1986). Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products. *J Immunol* **137**, 2299-2306.
- Stam, N. J., Vroom, T. M., Peters, P. J., Pastroors, E. B. und Ploegh, H. L. (1990). HLA-A- and HLA-B-specific monoclonal antibodies reactive with free heavy chains in western blots, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections and in cryo-immuno-electron microscopy. *Int Immunol* **2**, 113-125.
- Sturm, E., Braakman, E., Fisch, P., Vreugdenhil, R. J., Sondel, P. und Bolhuis, R. L. H. (1990). Human V γ 9-V δ 2 T cell receptor- $\gamma\delta$ lymphocytes show specificity to Daudi burkitt's lymphoma cells. *J Immunol* **145**, 3202-3208.
- Suarez, M. B., Morales, P., Castro, M. J., Fernandez, V., Varela, P., Alvarez, M., Martinez-Laso, J. und Arnaiz-Villena, A. (1997). A new HLA-G allele (HLA-G*0105N) and its distribution in the Spanish population. *Immunogenetics* **45**, 464-465.
- Suh, W. K., Cohen-Doyle, M. F., Fruh, K., Wang, K., Peterson, P. A. und Williams, D. B. (1994). Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science* **264**, 1322-1326.
- Suh, W. K., Mitchell, E. K., Yang, Y., Peterson, P. A., Waneck, G. L. und Williams, D. B. (1996). MHC class I molecules form ternary complexes with calnexin and TAP and undergo peptide-regulated interaction with TAP via their extracellular domains. *J Exp Med* **184**, 337-348.
- Suh, W. K., Derby, M. A., Cohen-Doyle, M. F., Schoenhals, G. J., Früh, K., Berzofsky, J. A. und Williams D. B. (1999). Interaction of murine MHC class I molecules with tapasin and TAP enhances peptide loading and involves the heavy chain α 3 domain. *J Immunol* **162**, 1530-1540.
- Tamaki, J., Arimura, Y., Koda, T., Fujimoto, S., Fujino, T., Wakisaka, A. und Kakinuma, M. (1993). Heterogeneity of HLA-G genes identified by polymerase chain reaction/single strand conformational polymorphism (PCR/SSCP). *Microbiol Immunol* **37**, 633-640.
- Tanabe, M., Sekimata, M., Ferrone, S. und Takiguchi M. (1992). Structural and functional analysis of monomorphic determinants recognized by monoclonal antibodies reacting with the HLA class I α 3 domain. *J Immunol* **148**, 3202-3209.
- Tanaka, Y., Morita, C. T., Tanaka, Y., Nieves, E., Brenner, M. B. und Bloom, B. R. (1995). Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* **375**, 155-158.
- Tedla, N., Gibson, K., McNeil, H. P., Cosman, D., Borges, L. und Arm, J. P. (2002). The co-expression of activating and inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors in rheumatoid synovium. *Am J Pathol* **160**, 425-431.
- Torkar, M., Norgate, Z., Colonna, M., Trowsdale, J. und Wilson, M. J. (1998). Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. *Eur J Immunol* **28**, 3959-3967.
- Tran, L. M., Ivanyi, P., Hilgert, I., Brdicka, T., Pla, M., Breur, B., Flieger, M., Ivaskova, E. und Horejsi, V. (2001). The epitope recognized by pan-HLA class I-reactive monoclonal antibody W6/32 and its relationship to unusual stability of the HLA-B27/ β 2-microglobulin complex. *Immunogenetics* **53**, 440-446.
- Triantafylou, K., Triantafylou, M., Wilson, K. M. und Fernandez, N. (2000). Human major histocompatibility molecules have the intrinsic ability to form homotypic associations. *Hum Immunol* **61**, 585-598.
- Triantafylou, M., Fradelizi, D. und Triantafylou, K. (2001). Major histocompatibility class one molecule associates with glucose regulated protein (GRP) 78 on the cell surface. *Hum Immunol* **62**, 764-770.
- Tysoe-Calnon, V. A., Grundy, J. E. und Perkins, S. J. (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**, 359-369.
- Übel, S., Kraas, W., Kienle, S., Wiesmüller, K. H., Jung, G. und Tampé, R. (1997). Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 8976-8981.
- Ugurel, S., Rebmann, V., Ferrone, S., Tilgen, W., Grosse-Wilde, H. und Reinhold, U. (2001). Soluble human leukocyte antigen-G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferon-alpha immunotherapy. *Cancer* **92**, 369-376.

- Uhrberg, M., Valiante, N. M., Shum, B. P., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L. L. und Parham, P. (1997). Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7, 753-763.
- Uhrberg, M., Valiante, N. M., Young, N. T., Lanier, L. L., Phillips, J. H. und Parham, P. (2001). The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94: NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. *J Immunol* 166, 3923-2932.
- Uhrberg, M., Parham, P. und Wernet, P. (2002). Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics* 54, 221-229.
- Ulbrecht, M., Honka, T., Person, S., Johnson, J. P. und Weiss, E. H. (1992 a). The HLA-E gene encodes two differentially regulated transcripts and a cell surface protein. *J Immunol* 149, 2945-2953.
- Ulbrecht, M., Kellermann, J., Johnson, J. P. und Weiss, E. H. (1992 b). Impaired intracellular transport and cell surface expression of nonpolymorphic HLA-E: evidence for inefficient peptide binding. *J Exp Med* 176, 1083-1090.
- Ulbrecht, M., Rehberger, B., Strobel, I., Messer, G., Kind, P., Degitz, K., Bieber, T. und Weiss, E. H. (1994). HLA-G: expression in human keratinocytes in vitro and in human skin in vivo. *Eur J Immunol* 24, 176-180.
- Ulbrecht, M., Hofmeister, V., Yuksekdag, G., Ellwart, J. W., Hengel, H., Momburg, F., Martinozzi, S., Reboul, M., Pla, M. und Weiss, E. H. (2003). HCMV glycoprotein US6 mediated inhibition of TAP does not affect HLA-E dependent protection of K-562 cells from NK cell lysis. *Hum Immunol* 64, 231-237.
- Ulbrecht, M., Maier, S., Hofmeister, V., Falk, C. S., Brooks, A. G., McMaster, M. und Weiss, E. H. (2004). The truncated HLA-G isoforms are retained in the endoplasmic reticulum and insufficiently provide HLA-E ligands. *Hum Immunol* 65, 200-208.
- Urosevic, M., Kurrer, M. O., Kamarashev, J., Mueller, B., Weder, W., Burg, G., Stahel, R. A., Dummer, R. und Trojan, A. (2001). Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *Am J Pathol* 159, 817-824.
- Urosevic, M., Willers, J., Mueller, B., Kempf, W., Burg, G. und Dummer, R. (2002). HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood* 99, 609-617.
- Valés-Gómez, M., Reyburn, H. T., Erskine, R. A. und Strominger, J. (1998). Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 14326-14331.
- Valés-Gómez, M., Reyburn, H. T., Erskine, R. A., Lopez-Botet, M. und Strominger, J. L. (1999). Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J* 18, 4250-4260.
- Valiante, N. M., Uhrberg, M., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K. L., D'Andrea, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L. und Parham, P. (1997). Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 7, 739-751.
- van der Ven, K., Skrablin, S., Engels, G. und Krebs, D. (1998 a). HLA-G polymorphisms and allele frequencies in Caucasians. *Hum Immunol* 59, 302-312.
- van der Ven, K., Skrablin, S., Ober, C. und Krebs, D. (1998 b). HLA-G polymorphisms: ethnic differences and implications for potential molecule function. *Am J Reprod Immunol* 40, 145-157.
- van Lierop, M. J., Wijnands, F., Loke, Y. W., Emmer, P. M., Lukassen, H. G., Braat, D. D., van der Meer, A., Mosselman, S. und Joosten, I. (2002). Detection of HLA-G by a specific sandwich ELISA using monoclonal antibodies G233 and 56B. *Mol Hum Reprod* 8, 776-784.
- Veenstra van Nieuwenhoven, A. L., Bouman, A., Moes, H., Heineman, M.-J., de Leij, L. F. M. H., Santema, J. und Faas, M. M. (2002). Cytokine production in natural killer cells and lymphocytes in pregnant women compared with women in the follicular phase of ovarian cycle. *Fertility and sterility* 77, 1032-1037.
- Verma, S., King, A. und Loke, Y. W. (1997). Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. *Eur J Immunol* 27, 979-983.
- Vilches, C., Rajalingam, R., Uhrberg, M., Gardiner, C. M., Young, N. T. und Parham, P. (2000). KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains. *J Immunol* 164, 5797-5804.
- Vitale, M., Castriconi, R., Parolini, S., Pende, D., Hsu, M. L., Moretta, L., Cosman, D. und Moretta, A. (1999). The leukocyte Ig-like receptor (LIR)-1 for the cytomegalovirus UL18 protein displays a broad specificity for different HLA class I alleles: analysis of LIR-1 + NK cell clones. *Int Immunol* 11, 29-35.
- Vivier, E., Sorrell, J. M., Ackerly, M., Robertson, M. J., Rasmussen, R. A., Levine, H. und Anderson, P. (1993). Developmental regulation of a mucinlike glycoprotein selectively expressed on natural killer cells. *J Exp Med* 178, 2023-2033.
- Vivier, E. und Daron, M. (1997). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today* 18, 286-291.
- Vyas, Y. M., Mehta, K. M., Morgan, M., Maniar, H., Butros, L., Jung, S., Burkhardt, J. K. und Dupont, B. (2001). Spatial organization of signal transduction molecules in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions. *J Immunol* 167, 4358-4367.
- Wagner, S. N., Rebmann, V., Willers, C. P., Grosse-Wilde, H. und Goos, M. (2000). Expression analysis of classic and non-classic HLA molecules before interferon alfa-2b treatment of melanoma. *Lancet* 356, 220-221.

- Wagtmann, N., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Malnati, M. S., Vitale, M., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A. und Long, E. O. (1995). Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* 2, 439-449.
- Wagtmann, N., Rojo, S., Eichler, E., Mohrenweiser, H. und Long, E. O. (1997). A new human gene complex encoding the killer cell inhibitory receptors and related monocyte/macrophage receptors. *Curr Biol* 7, 615-618.
- Wainwright, S. D., Biro, P. A. und Holmes, C. H. (2000). HLA-F is a predominantly empty, intracellular, TAP-associated MHC class Ib protein with a restricted expression pattern. *J Immunol* 164, 319-328.
- Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J., Hirose, T. und Itakura, K. (1979). Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to $\pi\chi$ 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res* 6, 3543-3557.
- Wang, Z., Cao, Y., Albino, A. P., Zeff, R. A., Houghton, A. und Ferrone, S. (1993). Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in β 2-microglobulin messenger RNA. *J Clin Invest* 91, 684-692.
- Wang, Z., Marincola, F. M., Rivoltini, L., Parmiani, G. und Ferrone, S. (1999). Selective histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 loss caused by aberrant pre-mRNA splicing in 624MEL28 melanoma cells. *J Exp Med* 190, 205-215.
- Warren, H. S., Campbell, A. J., Waldron, J. C. und Lanier, L. L. (2001). Biphasic response of NK cells expressing both activating and inhibitory killer Ig-like receptors. *Int Immunol* 13, 1043-1052.
- Wei, X. H. und Orr, H. T. (1990). Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum Immunol* 29, 131-142.
- Wesch, D., Glatzel, A. und Kabelitz, D. (2001). Differentiation of resting human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol* 212, 110-117.
- Whitman, M. C., Strohmaier, J., O'Boyle, K., Tingem, J. M., Wilkinson, Y., Goldstein, J., Chen, T., Brorson, K., Brunswick, M. und Kozlowski, S. (2000). The isolated major histocompatibility complex class I α 3 domain binds β 2m and CD8 $\alpha\alpha$ dimers. *Mol Immunol* 37, 141-149.
- Wiendl, H., Behrens, L., Maier, S., Johnson, M. A., Weiss, E. H. und Hohlfeld, R. (2000). Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the nonclassical major histocompatibility antigen HLA-G. *Ann Neurol* 48, 679-684.
- Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Hofmeister, V., Wischhusen, J., Bornemann, A., Meyermann, R., Weiss, E. H., Melms, A. und Weller, M. (2002). A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol* 168, 4772-4780.
- Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Hofmeister, V., Wischhusen, J., Weiss, E. H., Dichgans, J., Lochmuller, H., Hohlfeld, R., Melms, A. und Weller, M. (2003). The non-classical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy. *Brain* 126, 176-185.
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A. und Ploegh, H. L. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384, 432-438.
- Williams, D. B., Barber, B. H., Flavell, R. A. und Allen, H. (1989). Role of β 2 microglobulin in the intracellular transport and surface expression of murine class I histocompatibility molecules. *J Immunol* 142, 2796-2806.
- Wilson, M. J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S. und Trowsdale, J. (2000). Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 4778-4783.
- Winter, C. C. und Long, E. O. (1997). A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol* 158, 4026-4028.
- Witt, C. S., Whiteway, J. M., Warren, H. S., Barden, A., Rogers, M., Martin, A., Beilin, L. und Christiansen, F. T. (2002). Alleles of the KIR2DL4 receptor and their lack of association with pre-eclampsia. *Eur J Immunol* 32, 18-29.
- Yamashita, T., Fujii, T., Watanabe, Y., Tokunaga, K., Tadokoro, K., Juji, T. und Taketani, Y. (1996). HLA-G gene polymorphism in a Japanese population. *Immunogenetics* 44, 186-191.
- Yang, Y., Chu, W., Geraghty, D. E. und Hunt, J. S. (1996). Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN- γ . *J Immunol* 156, 4224-4231.
- Young, N. T., Uhrberg, M., Phillips, J. H., Lanier, L. L. und Parham, P. (2001). Differential expression of leukocyte receptor complex-encoded Ig-like receptors correlates with the transition from effector to memory CTL. *J Immunol* 166, 3933-3941.
- Young, N. T. und Uhrberg, M. (2002). KIR expression shapes cytotoxic repertoires: a developmental program of survival. *Trends Immunol* 23, 71-75.
- Yu, Y. Y. L., Turnquist, H. R., Myers, N. B., Balendiran, G. K., Hansen, T. H. und Solheim, J. C. (1999). An extensive region of an MHC class I α 2 domain loop influences interaction with the assembly complex. *J Immunol* 163, 4427-4433.
- Yusa, S., Catina, T. L. und Campbell, K. S. (2002). SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig-like receptor cytoplasmic domain in human NK cells. *J Immunol* 168, 5047-5057.

- Zappacosta, F., Borrego, F., Brooks, A. G., Parker, K. C. und Coligan, J. E. (1997). Peptides isolated from HLA-Cw*0304 confer different degrees of protection from natural killer cell-mediated lysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 6313-6318.
- Zavazava, N. und Krönke, M. (1996). Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nat Med* 2, 1005-1010.
- Zemmour, J. und Parham, P. (1992). Distinctive polymorphism at the HLA-C locus: Implications for the expression of HLA-C. *J Exp Med* 176, 937-950.
- Zhang, Q., Tector, M., und Salter, R. D. (1995). Calnexin recognizes carbohydrate and protein determinants of class I major histocompatibility complex molecules. *J Biol Chem* 270, 3944-3948.
- Zhang, Q. und Salter, R. D. (1998). Distinct patterns of folding and interaction with calnexin and calreticulin in human class I MHC proteins with altered N-glycosylation. *J Immunol* 160, 831-837.
- Zimmer, J., Donato, L., Hanau, D., Cazenave, J. P., Tongio, M. M., Moretta, A. und de la Salle, H. (1998). Activity and phenotype of natural killer cells in peptide transporter (TAP)-deficient patients (type I bare lymphocyte syndrome). *J Exp Med* 187, 117-122.
- Zou, Y. und Stastny, P. (2002). Alternatively spliced forms of MICA and MICB lacking exon 3 in a human cell line and evidence of presence of similar RNA in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunogenetics* 54, 671-674.

9 Anhang

9.1 HLA-G-cDNA-Vektoren

Die von dem Allel HLA-G*01011 abgeleitete cDNA für die HLA-G-Isoformen HLA-G1, HLA-G2, HLA-G4 und HLA-G5 wurde in die Vektoren pIRES2-EGFP bzw. pcDNA3.1 eingefügt.

HLA-G1 (pIRES2-EGFP)

Die HLA-G1-cDNA wurde mit den Primern G-5'UT und Ex6/3'UT amplifiziert, in den Vektor pCR™II kloniert und das *Xho* I/*Bam*H I-Fragment mit dem entsprechend geschnittenen Vektor pREP-7 ligiert (Maier 2000). Zum Umklonieren der HLA-G1-cDNA wurde das *Nhe* I/*Bam*H I-Fragment in den mit den selben Enzymen geschnittenen pIRES2-EGFP-Vektor ligiert.

```

pIRES2-EGFP
pREP-7      pCR™II      G-5'UT
GCTAGCGGC CGCTCGAGCG GCCGCCAGTG TGATGGATAT CTGCAGAATT CCGGCTTACTC ATTCTCCCCA GACGCCAAGG
|Nhe I      |Xho I      |Not I      |BstX I      |EcoR V      |EcoR I
|Not I      |Not I

Exon 1 - Signalpeptid
ATG GTG GTC ATG GCG CCC CGA ACC CTC TTC CTG CTG CTC TCG GGG GCC CTG ACC CTG      57
MET Val Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Phe Leu Leu Leu Ser Gly Ala Leu Thr Leu

Exon 2 - α1 Domäne
ACC GAG ACC TGG GCG GGC TCC CAC TCC ATG AGG TAT TTC AGC GCC GCC GTG TCC CGG      114
Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg
1 5 10

CCC GGC CGC GGG GAG CCC CGC TTC ATC GCC ATG GGC TAC GTG GAC GAC ACG CAG TTC      171
Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe
15 20 25 30

GTG CGG TTC GAC AGC GAC TCG GCG TGT CCG AGG ATG GAG CCG CGG GCG CCG TGG GTG      228
Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val
35 40 45 50

GAG CAG GAG GGG CCG GAG TAT TGG GAA GAG GAG ACA CGG AAC ACC AAG GCC CAC GCA      285
Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr Arg Asn Thr Lys Ala His Ala
55 60 65 70

CAG ACT GAC AGA ATG AAC CTG CAG ACC CTG CGC GGC TAC TAC AAC CAG AGC GAG GCC      342
Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala
75 80 85 90

Exon 3 - α2 Domäne
AGT TCT CAC ACC CTC CAG TGG ATG ATT GGC TGC GAC CTG GGG TCC GAC GGA CGC CTC      399
Ser Ser His Thr Leu Gln Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu
95 100 105

CTC CGC GGG TAT GAA CAG TAT GCC TAC GAT GGC AAG GAT TAC CTC GCC CTG AAC GAG      456
Leu Arg Gly Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu
110 115 120 125

GAC CTG CGC TCC TGG ACC GCA GCG GAC ACT GCG GCT CAG ATC TCC AAG CGC AAG TGT      513
Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys Arg Lys Cys
130 135 140 145

GAG GCG GCC AAT GTG GCT GAA CAA AGG AGA GCC TAC CTG GAG GGC ACG TGC GTG GAG      570
Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu
150 155 160 165

Exon 4 -
TGG CTC CAC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG GAG ATG CTG CAG CGC GCG GAC CCC CCC      627
Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro
170 175 180 185

α3 Domäne
AAG ACA CAC GTG ACC CAC CAC CCT GTC TTT GAC TAT GAG GCC ACC CTG AGG TGC TGG      684
Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp
190 195 200

GCC CTG GGC TTC TAC CCT GCG GAG ATC ATA CTG ACC TGG CAG CGG GAT GGG GAG GAC      741
Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp
205 210 215 220

```

CAG ACC CAG GAC GTG GAG CTC GTG GAG ACC AGG CCT GCA GGG GAT GGA ACC TTC CAG	798
Gln Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln	
225 230 235 240	
AAG TGG GCA GCT GTG GTG GTG CCT TCT GGA GAG GAG CAG AGA TAC ACG TGC CAT GTG	855
Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val	
245 250 255 260	
	Exon 5 - Transmembran
CAG CAT GAG GGG CTG CCG GAG CCC CTC ATG CTG AGA TGG AAG CAG TCT TCC CTG CCC	912
Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp Lys Gln Ser Ser Leu Pro	
265 270 275 280	
ACC ATC CCC ATC ATG GGT ATC GTT GCT GGC CTG GTT GTC CTT GCA GCT GTA GTC ACT	969
Thr Ile Pro Ile Met Gly Ile Val Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Ala Val Val Thr	
285 290 295	
	Exon 6 - Zytoplasma
GGA GCT GCG GTC GCT GCT GTG CTG TGG AGA AAG AAG AGC TCA GAT TGA AAA GGA GGG	1026
Gly Ala Ala Val Ala Val Leu Trp Arg Lys Ser Ser Asp ***	
300 305 310 315	
	Exon 7 Ex6/3'UT
AGC TAC TCT CAG GCT GCA ATG TGA AAC AGC TG	1058

pCRTMII pIRES2-EGFP
 AGCCGAATTC CAGCACACTG GCGGCCGTTA CTAGTGGATC C
 |EcoR I |BstX I |Spe I |BamH I

HLA-G1mut (pcDNA3.1 (-))

Mit dem Primerpaar G-5'UT/Ex1mut und Ex6/3'UT wurde ausgehend vom Template HLA-G1 in pCRTMII (Maier 2000) der T zu C Basenaustausch in HLA-G1 eingeführt, der zum Aminosäureaustausch von Met zu Thr an Position 4 im Signalpeptid führt. Das erhaltene HLA-G1mut-Amplifikat wurde in den Vektor pCRTM2.1 kloniert und das *Xho* I/*Bam*H I-Fragment in den entsprechend geschnittenen Expressionsvektor pcDNA3.1 (-) umkloniert.

pcDNA3.1 (-) pCRTM2.1
 AAGCTGGCTA GCGTTTAAAC GGGCCCTCTA GACTCGAGCG GCCGCCAGTG TGATGGATAT CTGCAGAATT
 |Nhe I |Pme I |Apa I |Xho I |Not I |BstX I |EcoR V |EcoR I
 |Xba I

G-5'UT/Ex1mut
 CGGCTTACTC ATTCTCCCA GACGCCAAGG

Exon 1 - Signalpeptid	
ATG GTG GTC ACG GCG CCC CGA ACC CTC TTC CTG CTG CTC TCG GGG GCC CTG ACC CTG	57
MET Val Val Thr Ala Pro Arg Thr Leu Phe Leu Leu Leu Ser Gly Ala Leu Thr Leu	
	Exon 2 - α 1 Domäne
ACC GAG ACC TGG GCG GGC TCC CAC TCC ATG AGG TAT TTC AGC GCC GCC GTG TCC CGG	114
Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg	
1 5 10	
CCC GGC CGC GGG GAG CCC CGC TTC ATC GCC ATG GGC TAC GTG GAC GAC ACG CAG TTC	171
Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe	
15 20 25 30	
GTG CGG TTC GAC AGC GAC TCG GCG TGT CCG AGG ATG GAG CCG CGG GCG CCG TGG GTG	228
Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val	
35 40 45 50	
GAG CAG GAG GGG CCG GAG TAT TGG GAA GAG GAG ACA CGG AAC ACC AAG GCC CAC GCA	285
Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr Arg Asn Thr Lys Ala His Ala	
55 60 65 70	
CAG ACT GAC AGA ATG AAC CTG CAG ACC CTG CGC GGC TAC TAC AAC CAG AGC GAG GCC	342
Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala	
75 80 85 90	
	Exon 3 - α 2 Domäne
AGT TCT CAC ACC CTC CAG TGG ATG ATT GGC TGC GAC CTG GGG TCC GAC GGA CGC CTC	399
Ser Ser His Thr Leu Gln Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu	
95 100 105	
CTC CGC GGG TAT GAA CAG TAT GCC TAC GAT GGC AAG GAT TAC CTC GCC CTG AAC GAG	456
Leu Arg Gly Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu	
110 115 120 125	

GAC CTG CGC TCC TGG ACC GCA GCG GAC ACT GCG GCT CAG ATC TCC AAG CGC AAG TGT	513
Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys Arg Lys Cys	
130 135 140 145	
GAG GCG GCC AAT GTG GCT GAA CAA AGG AGA GCC TAC CTG GAG GGC ACG TGC GTG GAG	570
Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu	
150 155 160 165	
TGG CTC CAC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG GAG ATG CTG CAG CGC GCG GAC CCC CCC	627
Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro	
170 175 180 185	
<i>Exon 4 -</i>	
<i>α3 Domäne</i>	
AAG ACA CAC GTG ACC CAC CAC CCT GTC TTT GAC TAT GAG GCC ACC CTG AGG TGC TGG	684
Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp	
190 195 200	
GCC CTG GGC TTC TAC CCT GCG GAG ATC ATA CTG ACC TGG CAG CGG GAT GGG GAG GAC	741
Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp	
205 210 215 220	
CAG ACC CAG GAC GTG GAG CTC GTG GAG ACC AGG CCT GCA GGG GAT GGA ACC TTC CAG	798
Gln Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln	
225 230 235 240	
AAG TGG GCA GCT GTG GTG GTG CCT TCT GGA GAG GAG CAG AGA TAC ACG TGC CAT GTG	855
Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val	
245 250 255 260	
<i>Exon 5 - Transmembran</i>	
CAG CAT GAG GGG CTG CCG GAG CCC CTC ATG CTG AGA TGG AAG CAG TCT TCC CTG CCC	912
Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp Lys Gln Ser Ser Leu Pro	
265 270 275 280	
ACC ATC CCC ATC ATG GGT ATC GTT GCT GGC CTG GTT GTC CTT GCA GCT GTA GTC ACT	969
Thr Ile Pro Ile Met Gly Ile Val Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Ala Val Val Thr	
285 290 295	
<i>Exon 6 - Zytoplasma</i>	
GGA GCT GCG GTC GCT GCT GTG CTG TGG AGA AAG AAG AGC TCA GAT TGA AAA GGA GGG	1026
Gly Ala Ala Val Ala Ala Val Leu Trp Arg Lys Ser Ser Asp ***	
300 305 310 315	
<i>Exon 7 Ex6/3'UT</i>	
AGC TAC TCT CAG GCT GCA ATG TGA AAC AGC TG	1058

pCRTM2.1 pcDNA3.1 (-)
 AGCCGAATTC CAGCACACTG GCGGCCGTTA CTAGTGGATC CGAGCTCGGT ACCAAGCTTA AGTTAAACC
 |EcoR I |BstX I |Spe I |BamH I |Asp718 I |Afl I |Pme I
 |Kpn I
 |Hind III

HLA-G2 (pIRES2-EGFP)

Die mit dem Primerpaar G-5'UT und Ex6/3'UT amplifizierte und in den Vektor pCRTM2.1 ligierte HLA-G2-cDNA (Maier 2000) wurde mit EcoR I aus dem Vektor pCRTM2.1 ausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pIRES2-EGFP eingebaut.

pIRES2-EGFP pCRTM2.1 G-5'UT
 GCT AGCGCTACCG GACTCAGATC TCGAGCTCAA GCTTCGAATT CGGCTTACTC ATTCTCCCCA GACGCCAAGG
 |Nhe I |Bgl II |Hind III
 |Eco47 III |Xho I |Sac I |EcoR I

<i>Exon 1 - Signalpeptid</i>	
ATG GTG GTC ATG GCG CCC CGA ACC CTC TTC CTG CTG CTC TCG GGG GCC CTG ACC CTG	57
MET Val Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Phe Leu Leu Leu Ser Gly Ala Leu Thr Leu	
<i>Exon 2 - α1 Domäne</i>	
ACC GAG ACC TGG GCG GGC TCC CAC TCC ATG AGG TAT TTC AGC GCC GCC GTG TCC CGG	114
Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg	
1 5 10	
CCC GGC CGC GGG GAG CCC CGC TTC ATC GCC ATG GGC TAC GTG GAC GAC ACG CAG TTC	171
Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe	
15 20 25 30	
GTG CGG TTC GAC AGC GAC TCG GCG TGT CCG AGG ATG GAG CCG CGG GCG CCG TGG GTG	228
Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val	
35 40 45 50	
GAG CAG GAG GGG CCG GAG TAT TGG GAA GAG GAG ACA CGG AAC ACC AAG GCC CAC GCA	285
Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr Arg Asn Thr Lys Ala His Ala	
55 60 65 70	

CAG ACT GAC AGA ATG AAC CTG CAG ACC CTG CGC GGC TAC TAC AAC CAG AGC GAG GCC	342
Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala	
75 80 85 90	
Exon 4 - α3 Domäne	
AAC CCC CCC AAG ACA CAC GTG ACC CAC CAC CCT GTC TTT GAC TAT GAG GCC ACC CTG	399
Asn Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu	
95 100 105	
AGG TGC TGG GCC CTG GGC TTC TAC CCT GCG GAG ATC ATA CTG ACC TGG CAG CGG GAT	456
Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp	
110 115 120 125	
GGG GAG GAC CAG ACC CAG GAC GTG GAG CTC GTG GAG ACC AGG CCT GCA GGG GAT GGA	513
Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly	
130 135 140 145	
ACC TTC CAG AAG TGG GCA GCT GTG GTG GTG CCT TCT GGA GAG GAG CAG AGA TAC ACG	570
Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr	
150 155 160 165	
Exon 5 -	
TGC CAT GTG CAG CAT GAG GGG CTG CCG GAG CCC CTC ATG CTG AGA TGG AAG CAG TCT	627
Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp Lys Gln Ser	
170 175 180 185	
Transmembran	
TCC CTG CCC ACC ATC CCC ATC ATG GGT ATC GTT GCT GGC CTG GTT GTC CTT GCA GCT	684
Ser Leu Pro Thr Ile Pro Ile Met Gly Ile Val Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Ala	
190 195 200	
Exon 6 -	
GTA GTC ACT GGA GCT GCG GTC GCT GCT GTG CTG TGG AGA AAG AAG AGC TCA GAT TGA	741
Val Val Thr Gly Ala Ala Val Ala Ala Val Leu Trp Arg Lys Lys Ser Ser Asp ***	
205 210 215 220	
Zytoplasma	Exon 7 Ex6/3`UT
AAA GGA GGG AGC TAC TCT CAG GCT GCA ATG TGA AAC AGC TG	782

pIRES2-EGFP
pCR™2.1
AGCCGAATTC TGCAGTCGAC GGTACCGCGG GCCCGGGATC C
|EcoR I |Sal I |Sac II |BamH I
|Pst I |Kpn I |Sma I
|Apa I

HLA-G4mut (pcDNA3.1 (-))

Ein aus der Vorarbeit erhaltener HLA-G4-Klon im Vektor pCR™II mit einer Deletion im 5'-Bereich (Maier 2000) sowie ein HLA-G1mut-Klon in pCR™2.1 wurden mit *BssH* II präparativ verdaut. *BssH* II schneidet am Ende von Exon 3 von HLA-G und im Kanamycingen der Vektoren. Die Restriktionsfragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, isoliert und die Fragmente, die den 5'Teil von HLA-G1mut und 3'Teil von HLA-G4 enthalten, miteinander ligiert. Nach einen präparativen Verdau mit den Enzymen *Xho* I und *BamH* I wurde das HLA-G4mut-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pcDNA3.1 (-) umklont.

pcDNA3.1 (-) pCR™2.1
AAGCTGGCTA GCGTTTAAAC GGGCCCTCTA GACTCGAGCG GCCCCAGTG TGATGGATAT CTGCAGAATT
|Nhe I |Pme I |Apa I |Xho I |Not I |BstX I |EcoR V |EcoR I
|Xba I

G-5`UT
CGGCTTATTCTCCCA GACGCCAAGG

Exon 1 - Signalpeptid	
ATG GTG GTC ACG GCG CCC CGA ACC CTC TTC CTG CTG CTC TCG GGG GCC CTG ACC CTG	57
MET Val Val Thr Ala Pro Arg Thr Leu Phe Leu Leu Leu Ser Gly Ala Leu Thr Leu	
Exon 2 - α1 Domäne	
ACC GAG ACC TGG GCG GGC TCC CAC TCC ATG AGG TAT TTC AGC GCC GCC GTG TCC CGG	114
Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg	
1 5 10	
CCC GGC CGC GGG GAG CCC CGC TTC ATC GCC ATG GGC TAC GTG GAC GAC ACG CAG TTC	171
Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe	
15 20 25 30	
GTG CGG TTC GAC AGC GAC TCG GCG TGT CCG AGG ATG GAG CCG CGG GCG CCG TGG GTG	228
Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val	
35 40 45 50	

GAG CAG GAG GGG CCG GAG TAT TGG GAA GAG GAG ACA CGG AAC ACC AAG GCC CAC GCA	285
Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr Arg Asn Thr Lys Ala His Ala	
55 60 65 70	
CAG ACT GAC AGA ATG AAC CTG CAG ACC CTG CGC GGC TAC TAC AAC CAG AGC GAG GCC	342
Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala	
75 80 85 90	
Exon 3 - $\alpha 2$ Domäne	
AGT TCT CAC ACC CTC CAG TGG ATG ATT GGC TGC GAC CTG GGG TCC GAC GGA CGC CTC	399
Ser Ser His Thr Leu Gln Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu	
95 100 105	
CTC CGC GGG TAT GAA CAG TAT GCC TAC GAT GGC AAG GAT TAC CTC GCC CTG AAC GAG	456
Leu Arg Gly Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu	
110 115 120 125	
GAC CTG CGC TCC TGG ACC GCA GCG GAC ACT GCG GCT CAG ATC TCC AAG CGC AAG TGT	513
Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys Arg Lys Cys	
130 135 140 145	
GAG GCG GCC AAT GTG GCT GAA CAA AGG AGA GCC TAC CTG GAG GGC ACG TGC GTG GAG	570
Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu	
150 155 160 165	
Exon 5 -	
TGG CTC CAC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG GAG ATG CTG CAG CGC GCG GAG CAG TCT	627
Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Met Leu Gln Arg Ala Glu Gln Ser	
170 175 180 185	
Transmembran	
TCC CTG CCC ACC ATC CCC ATC ATG GGT ATC GTT GCT GGC CTG GTT GTC CTT GCA GCT	684
Ser Leu Pro Thr Ile Pro Ile Met Gly Ile Val Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Ala	
190 195 200	
Exon 6 -	
GTA GTC ACT GGA GCT GCG GTC GCT GCT GTG CTG TGG AGA AAG AAG AGC TCA GAT TGA	741
Val Val Thr Gly Ala Ala Val Ala Ala Val Leu Trp Arg Lys Lys Ser Ser Asp ***	
205 210 215 220	
Zytoplasma Exon 7 Ex6/3'UT	
AAA GGA GGG AGC TAC TCT CAG GCT GCA ATG TGA AAC AGC TG	782
pCR TM II pcDNA3.1 (-)	
AGCCGAATTC CAGCACACTG GCGGCCGTTA CTAGTGGATC CGAGCTCGGT ACCAAGCTTA AGTTTAAACC	
EcoR I BstX I Spe I BamH I Asp718 I Afl I Pme I	
Kpn I	
Hind III	

HLA-G5 (pcDNA3.1 (-))

Es stand ein HLA-G5-Konstrukt mit einem Fehler am Ende von Exon 4 zur Verfügung (Maier 2000). Die HLA-G5-cDNA wurde zur Korrektur des Fehlers mit den Primern G-Ex1 und G-Ex4/Int4 amplifiziert und in den Vektor pCRTM2.1 ligiert. Die HLA-G5-cDNA wurde mit *EcoR* I ausgeschnitten und in die *EcoR* I-Schnittstelle von pIRES-EGFP inkloniert. Die HLA-G5-cDNA wurde mit den Enzymen *Nof* I und *BstX* I aus dem Vektor pIRES-EGFP ausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen pcDNA3.1 (-) Vektor inkloniert.

pcDNA3.1 (-)	pIRES-EGFP	pCR TM 2.1	G Ex1
AAGCTGGCTA GCGTTTAAAC GGGCCCTCTA GACTCGAGCG GCCGCTCGA CGGAATTCGG CTTC AAGG			
Nhe I Pme I Apa I Xho I	Not I	EcoR I	
Xba I			
Exon 1 - Signalpeptid			
ATG GTG GTC ATG GCG CCC CGA ACC CTC TTC CTG CTG CTC TCG GGG GCC CTG ACC CTG	57		
MET Val Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Phe Leu Leu Leu Ser Gly Ala Leu Thr Leu			
Exon 2 - $\alpha 1$ Domäne			
ACC GAG ACC TGG GCG GGC TCC CAC TCC ATG AGG TAT TTC AGC GCC GCC GTG TCC CGG	114		
Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg			
1 5 10			
CCC GGC CGC GGG GAG CCC CGC TTC ATC GCC ATG GGC TAC GTG GAC GAC ACG CAG TTC	171		
Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe			
15 20 25 30			
GTG CGG TTC GAC AGC GAC TCG GCG TGT CCG AGG ATG GAG CCG CGG GCG CCG TGG GTG	228		
Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val			
35 40 45 50			

GAG CAG GAG GGG CCG GAG TAT TGG GAA GAG GAG ACA CGG AAC ACC AAG GCC CAC GCA	285
Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr Arg Asn Thr Lys Ala His Ala	
55 60 65 70	
CAG ACT GAC AGA ATG AAC CTG CAG ACC CTG CGC GGC TAC TAC AAC CAG AGC GAG GCC	342
Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala	
75 80 85 90	
Exon 3 - α2 Domäne	
AGT TCT CAC ACC CTC CAG TGG ATG ATT GGC TGC GAC CTG GGG TCC GAC GGA CGC CTC	399
Ser Ser His Thr Leu Gln Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu	
95 100 105	
CTC CGC GGG TAT GAA CAG TAT GCC TAC GAT GGC AAG GAT TAC CTC GCC CTG AAC GAG	456
Leu Arg Gly Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu	
110 115 120 125	
GAC CTG CGC TCC TGG ACC GCA GCG GAC ACT GCG GCT CAG ATC TCC AAG CGC AAG TGT	513
Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys Arg Lys Cys	
130 135 140 145	
GAG GCG GCC AAT GTG GCT GAA CAA AGG AGA GCC TAC CTG GAG GGC ACG TGC GTG GAG	570
Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu	
150 155 160 165	
Exon 4 -	
TGG CTC CAC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG GAG ATG CTG CAG CGC GCG GAC CCC CCC	627
Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro	
170 175 180 185	
α3 Domäne	
AAG ACA CAC GTG ACC CAC CAC CCT GTC TTT GAC TAT GAG GCC ACC CTG AGG TGC TGG	684
Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp	
190 195 200	
GCC CTG GGC TTC TAC CCT GCG GAG ATC ATA CTG ACC TGG CAG CGG GAT GGG GAG GAC	741
Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp	
205 210 215 220	
CAG ACC CAG GAC GTG GAG CTC GTG GAG ACC AGG CCT GCA GGG GAT GGA ACC TTC CAG	798
Gln Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln	
225 230 235 240	
AAG TGG GCA GCT GTG GTG GTG CCT TCT GGA GAG GAG CAG AGA TAC ACG TGC CAT GTG	855
Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val	
245 250 255 260	
"Intron 4"	
CAG CAT GAG GGG CTG CCG GAG CCC CTC ATG CTG AGA TGG AAT AAG GAG GGA GAT GGA	912
Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp Ser Lys Glu Gly Asp Gly	
265 270 275 230	
G Ex4/Int4	
<u>GCG ATC ATG TCT GTT AGG GAA AGC AGG AGC CTC TCT GAA GAC CTT TAA C</u>	961
Gly Ile Met Ser Val Arg Glu Ser Arg Ser Leu Ser Glu Asp Leu ***	
235 240 245	

pCRTM2.1

pIRES-EGFP
 AGCCGAAATTC AGTGGATCCA CTAGTAACGG CCGCCAGTGT GCTGGACTAG TGGATCCGAG CTCGGTACCA
 |EcoR I |BamH I |BstX I |BamH I |Asp 718 I
 |Kpn I

AGCTTAAGTT TAAACC
 |Hind III |Pme I
 |Afl I

HLA-G5 (pIRES2-EGFP)

Die HLA-G5-cDNA wurde mit *Xho* I und *Bam*H I aus dem Vektor pcDNA3.1 ausgeschnitten [siehe HLA-G5 (pcDNA3.1)] und in den entsprechend geschnittenen Vektor pIRES2-EGFP umkloniert.

pIRES2-EGFP
 GCTAGCGC TACCGGACTC AGATCTCGAG CCGCCGCGTC GACCGAATTC GGCTTCAAGG
 |Nhe I |Bgl II |Not I |EcoR I
 |Eco47 III |Xho I

Exon 1 - Signalpeptid
 ATG GTG GTC ATG GCG CCC CGA ACC CTC TTC CTG CTG CTC TCG GGG GCC CTG ACC CTG 57
 MET Val Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Phe Leu Leu Leu Ser Gly Ala Leu Thr Leu

Exon 2 - $\alpha 1$ Domäne																				
ACC	GAG	ACC	TGG	GCG	<u>GGC</u>	TCC	CAC	TCC	ATG	AGG	TAT	TTC	AGC	GCC	GCC	GTG	TCC	CGG	114	
Thr	Glu	Thr	Trp	Ala	Gly	Ser	His	Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Arg		
					1				5					10						
CCC	GGC	CGC	GGG	GAG	CCC	CGC	TTC	ATC	GCC	ATG	GGC	TAC	GTG	GAC	GAC	ACG	CAG	TTC	171	
Pro	Gly	Arg	Gly	Glu	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	Met	Gly	Tyr	Val	Asp	Asp	Thr	Gln	Phe		
	15				20				25					30						
GTG	CGG	TTC	GAC	AGC	GAC	TCG	GCG	TGT	CCG	AGG	ATG	GAG	CCG	CGG	GCG	CCG	TGG	GTG	228	
Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Ala	Ala	Cys	Pro	Arg	Met	Glu	Pro	Arg	Ala	Pro	Trp	Val		
	35				40					45				50						
GAG	CAG	GAG	GGG	CCG	GAG	TAT	TGG	GAA	GAG	GAG	ACA	CGG	AAC	ACC	AAG	GCC	CAC	GCA	285	
Glu	Gln	Glu	Gly	Pro	Glu	Tyr	Trp	Glu	Glu	Glu	Thr	Arg	Asn	Thr	Lys	Ala	His	Ala		
		55				60					65					70				
CAG	ACT	GAC	AGA	ATG	AAC	CTG	CAG	ACC	CTG	CGC	GGC	TAC	TAC	AAC	CAG	AGC	GAG	GCC	342	
Gln	Thr	Asp	Arg	Met	Asn	Leu	Gln	Thr	Leu	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Gln	Ser	Glu	Ala		
			75					80					85					90		
Exon 3 - $\alpha 2$ Domäne																				
AGT	TCT	CAC	ACC	CTC	CAG	TGG	ATG	ATT	GGC	TGC	GAC	CTG	GGG	TCC	GAC	GGA	CGC	CTC	399	
Ser	Ser	His	Thr	Leu	Gln	Trp	Met	Ile	Gly	Cys	Asp	Leu	Gly	Ser	Asp	Gly	Arg	Leu		
				95					100					105						
CTC	CGC	GGG	TAT	GAA	CAG	TAT	GCC	TAC	GAT	GGC	AAG	GAT	TAC	CTC	GCC	CTG	AAC	GAG	456	
Leu	Arg	Gly	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Gly	Lys	Asp	Tyr	Leu	Ala	Leu	Asn	Glu		
	110			115					120					125						
GAC	CTG	CGC	TCC	TGG	ACC	GCA	GCG	GAC	ACT	GCG	GCT	CAG	ATC	TCC	AAG	CGC	AAG	TGT	513	
Asp	Leu	Arg	Ser	Trp	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Ala	Gln	Ile	Ser	Lys	Arg	Lys	Cys		
	130				135					140						145				
GAG	GCG	GCC	AAT	GTG	GCT	GAA	CAA	AGG	AGA	GCC	TAC	CTG	GAG	GGC	ACG	TGC	GTG	GAG	570	
Glu	Ala	Ala	Asn	Val	Ala	Glu	Gln	Arg	Arg	Ala	Tyr	Leu	Glu	Gly	Thr	Cys	Val	Glu		
		150				155						160					165			
Exon 4 -																				
TGG	CTC	CAC	AGA	TAC	CTG	GAG	AAC	GGG	AAG	GAG	ATG	CTG	CAG	CGC	GCG	GAC	CCC	CCC	627	
Trp	Leu	His	Arg	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Leu	Gln	Arg	Ala	Asp	Pro	Pro		
			170				175						180					185		
$\alpha 3$ Domäne																				
AAG	ACA	CAC	GTG	ACC	CAC	CAC	CCT	GTC	TTT	GAC	TAT	GAG	GCC	ACC	CTG	AGG	TGC	TGG	684	
Lys	Thr	His	Val	Thr	His	His	Pro	Val	Phe	Asp	Tyr	Glu	Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Trp		
			190						195					200						
GCC	CTG	GGC	TTC	TAC	CCT	CGC	GAG	ATC	ATA	CTG	ACC	TGG	CAG	CGG	GAT	GGG	GAG	GAC	741	
Ala	Leu	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ala	Glu	Ile	Ile	Leu	Thr	Trp	Gln	Arg	Asp	Gly	Glu	Asp		
	205				210				215						220					
CAG	ACC	CAG	GAC	GTG	GAG	CTC	GTG	GAG	ACC	AGG	CCT	GCA	GGG	GAT	GGA	ACC	TTC	CAG	798	
Gln	Thr	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr	Phe	Gln		
		225			230				235						240					
AAG	TGG	GCA	GCT	GTG	GTG	GTG	CCT	TCT	GGA	GAG	GAG	CAG	AGA	TAC	ACG	TGC	CAT	GTG	855	
Lys	Trp	Ala	Ala	Val	Val	Val	Pro	Ser	Gly	Glu	Glu	Gln	Arg	Tyr	Thr	Cys	His	Val		
		245				250						255					260			
"Intron 4"																				
CAG	CAT	GAG	GGG	CTG	CCG	GAG	CCC	CTC	ATG	CTG	AGA	TGG	<u>AGT</u>	<u>AAG</u>	<u>GAG</u>	<u>GGA</u>	<u>GAT</u>	<u>GGA</u>	912	
Gln	His	Glu	Gly	Leu	Pro	Glu	Pro	Leu	Met	Leu	Arg	Trp	Ser	Lys	Glu	Gly	Asp	Gly		
			265				270						275				280			
G Int4-2as																				
<u>GGC</u>	<u>ATC</u>	<u>ATG</u>	<u>TCT</u>	<u>GTT</u>	<u>AGG</u>	<u>GAA</u>	<u>AGC</u>	<u>AGG</u>	<u>AGC</u>	<u>CTC</u>	<u>TCT</u>	<u>GAA</u>	<u>GAC</u>	<u>CTT</u>	<u>TAA</u>	<u>C</u>			961	
Gly	Ile	Met	Ser	Val	Arg	Glu	Ser	Arg	Ser	Leu	Ser	Glu	Asp	Leu	***					
			235					240					245							

pCR™2.1 pIRES2-EGFP
 pIRES-EGFP
 AGCCGAATTC AGTGGATCC
 | EcoR I | BamH I

HLA-G-cDNA-Konstrukte in den Vektoren pcDNA3.1 und pIRES2-EGFP

Die cDNA von HLA-G1 in pIRES2-EGFP, HLA-G1mut in pcDNA3.1, HLA-G2 in pIRES2-EGFP, HLA-G4mut in pcDNA3.1, HLA-G5 (HLA-G1s) in pcDNA3.1 und HLA-G5 in pIRES2-EGFP sind mit Angabe der Exone, Domänen und der Aminosäuresequenzen dargestellt. Die durch PCR eingebrachte Änderung der 4. Aminosäure des Signalpeptids von Met zu Thr in den HLA-G1mut- und HLA-G4mut-Konstrukten ist rot hervorgehoben. Die Bindestellen von zur Amplifikation eingesetzten Primern sind unterstrichen. Restriktionsschnittstellen der "Multiplen Klonierungsstellen" der Vektoren sind angegeben.

9.2 Protein-Primärstrukturen der HLA-G-Isoformen

	[Signalpeptid	[$\alpha 1$	*
HLA-G1	MVVMAPRTLFLLLSGALTLETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPERFIAMGYVDDTQFVRFDSDSA	CPRME	
HLA-G2	MVVMAPRTLFLLLSGALTLETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPERFIAMGYVDDTQFVRFDSDSA	CPRME	
HLA-G3	MVVMAPRTLFLLLSGALTLETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPERFIAMGYVDDTQFVRFDSDSA	CPRME	
HLA-G4	MVVMAPRTLFLLLSGALTLETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPERFIAMGYVDDTQFVRFDSDSA	CPRME	
HLA-G5	MVVMAPRTLFLLLSGALTLETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPERFIAMGYVDDTQFVRFDSDSA	CPRME	
HLA-G6	MVVMAPRTLFLLLSGALTLETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPERFIAMGYVDDTQFVRFDSDSA	CPRME	
HLA-G7	MVVMAPRTLFLLLSGALTLETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPERFIAMGYVDDTQFVRFDSDSA	CPRME	
		#	[Intron 2 kodiert
		[$\alpha 2$	
HLA-G1	PRAPWVEQEGPEYWEETRNKKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEA--SSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYE		
HLA-G2	PRAPWVEQEGPEYWEETRNKKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEA-----		
HLA-G3	PRAPWVEQEGPEYWEETRNKKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEA-----		
HLA-G4	PRAPWVEQEGPEYWEETRNKKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEA--SSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYE		
HLA-G5	PRAPWVEQEGPEYWEETRNKKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEA--SSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYE		
HLA-G6	PRAPWVEQEGPEYWEETRNKKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEA-----		
HLA-G7	PRAPWVEQEGPEYWEETRNKKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEASE		
		*	[$\alpha 3$
HLA-G1	QYAYDGKDY LALNEDLRSWTAADTAAQISKRC	EAANVAEQRRAYLEGT	CVEWLHRYLENGKEMLQRADP
HLA-G2	-----	-----	-----NP
HLA-G3	-----	-----	-----
HLA-G4	QYAYDGKDY LALNEDLRSWTAADTAAQISKRC	EAANVAEQRRAYLEGT	CVEWLHRYLENGKEMLQRA--
HLA-G5	QYAYDGKDY LALNEDLRSWTAADTAAQISKRC	EAANVAEQRRAYLEGT	CVEWLHRYLENGKEMLQRADP
HLA-G6	-----	-----	-----NP
HLA-G1	PKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEI ILLTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGT	FQKWA	AVVPSGEE
HLA-G2	PKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEI ILLTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGT	FQKWA	AVVPSGEE
HLA-G3	-----	-----	-----
HLA-G4	-----	-----	-----
HLA-G5	PKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEI ILLTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGT	FQKWA	AVVPSGEE
HLA-G6	PKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEI ILLTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGT	FQKWA	AVVPSGEE
		[Intron 4 kodiert	[TM
HLA-G1	QRYTCHVQHEGLPEPLMLRW-----	-----	KQSSLPTIPIMGIVAGLVVLA
HLA-G2	QRYTCHVQHEGLPEPLMLRW-----	-----	KQSSLPTIPIMGIVAGLVVLA
HLA-G3	-----	-----	-----
HLA-G4	-----	-----	-----EQSSLPTIPIMGIVAGLVVLA
HLA-G5	QRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEG	GGIMSVRESRSLSEDL	
HLA-G6	QRYTCHVQHEGLPEPLMLRWSKEG	GGIMSVRESRSLSEDL	
	[••		
HLA-G1	AAVLWR	KKSSD	
HLA-G2	AAVLWR	KKSSD	
HLA-G3	AAVLWR	KKSSD	
HLA-G4	AAVLWR	KKSSD	

HLA-G-Protein-Primärstrukturen

Die Aminosäuresequenzen von HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4, HLA-G5 (HLA-G1s), HLA-G6 (HLA-G2s) und HLA-G7 (HLA-G3s) sind dargestellt. Die in den verkürzten Isoformen von HLA-G1 abweichenden Aminosäuren an den Domänenübergängen sind rot und Intron-kodierte Bereiche sind grün hervorgehoben. Cysteinreste sind blau, die ungepaarten Cysteinreste an den Aminosäurepositionen 42 und 147 sind zusätzlich mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die Glykosylierungsstelle (#) und das ER-Retrieval-Signal (•) sind ebenfalls markiert. Die in den jeweiligen Isoformen nicht enthaltenen Sequenzabschnitte sind als fehlend (-) dargestellt.

Lebenslauf

Name: Valeska Hofmeister
Geburtsdatum: 27. November 1971
Geburtsort: Frankfurt am Main

Aus- und Weiterbildung

08/78 – 06/82 Besuch der Grundschule in Kassel
08/82 – 06/91 Besuch des Gymnasiums in Kassel, Abschluß: Abitur
11/91 – 10/97 Studium der Biologie an der LMU in München
10/95 – 5/1996 Teilnahme am Praxisprogramm "Student und Arbeitsmarkt" der Universität München in Zusammenarbeit mit der Vereinigung der Arbeitgeberverbände in Bayern und dem Arbeitsamt München
01/97 – 10/97 Diplomarbeit mit dem Titel „Mechanismen der aberranten HLA-B27 Expression in der Tumorzelllinie MF“ bei Frau Prof. Dr. Weiß im Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU München
02/98 – 04/04 Promotion zum Thema „Expression und immunmodulatorische Funktion von HLA-G und seinen verkürzten Isoformen in Tumorzelllinien“ bei Frau Prof. Dr. Weiß im Department Biologie II der LMU München
07/03 – 12/03 Wissenschaftliche Assistentin im Department Biologie II der LMU München

Publikationen

- Hofmeister, V. und Weiss, E. H. (2003). HLA-G modulates immune responses by diverse receptor interactions. *Semin Cancer Biol* 13, 317-323.
- Polakova, K., Bandzuchova, E., Hofmeister, V., Weiß, E.H., Hutter, H. und Russ, G. (2003). Binding analysis of HLA-G specific antibodies to hematopoietic cells isolated from leukemia patients. *Neoplasma* 50, 331-338.
- Rieger, L., Hofmeister, V., Probe, C., Dietl, J., Weiss, E. H., Steck, T. und Kämmerer, U. (2002). Th1- and Th2-like cytokine production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E. *Mol Hum Reprod* 8, 255-261.
- Ulbrecht, M., Hofmeister, V., Yuksekdog, G., Ellwart, J. W., Hengel, H., Momburg, F., Martinozzi, S., Reboul, M., Pla, M. und Weiss, E. H. (2003). HCMV glycoprotein US6 mediated inhibition of TAP does not affect HLA-E dependent protection of K-562 cells from NK cell lysis. *Hum Immunol* 64, 231-237.
- Ulbrecht, M., Maier, S., Hofmeister, V., Falk, C. S., Brooks, A. G., McMaster, M. und Weiss, E. H. (2004). The truncated HLA-G isoforms are retained in the endoplasmic reticulum and insufficiently provide HLA-E ligands. *Hum Immunol* 65, 200-208.
- Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Hofmeister, V., Wischhusen, J., Bornemann, A., Meyermann, R., Weiss, E. H., Melms, A. und Weller, M. (2002). A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol* 168, 4772-4780.
- Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Hofmeister, V., Wischhusen, J., Weiss, E. H., Dichgans, J., Lochmuller, H., Hohlfeld, R., Melms, A. und Weller, M. (2003). The non-classical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy. *Brain* 126, 176-185.

Abstrakts

- Hofmeister, V., Maier, S., Ulbrecht, M., McMaster, M. und Weiss, E. H. (1999). A role for the truncated HLA-G isoforms in immune regulation? 30th Annual Meeting of the German Society of Immunology. 29.09.99-2.10.99, Hannover. *Immunobiol* 200, 328.
- Hofmeister, V., Maier, S., Ellwart, J. W. und Weiss, E. H. (2001). HLA-G expression in the absence of β 2-microglobulin. 17th Spring Meeting of the German Society of Immunology. 21.02.01-24.02.01, Innsbruck. Programm S. 81.
- Hofmeister, V., Falk, C. S., Ellwart, J. W. und Weiss, E. H. (2001). Expression and recognition of HLA-G in a β 2-microglobulin-negative tumor cell line. 32th Annual Meeting of the German Society of Immunology. 26.09.01-29.9.01, Dresden. *Immunobiol* 204, 298.
- Hofmeister, V., Maier, S., Ellwart, J. W. und Weiss, E. H. (2002). Expression and processing of the HLA-G isoforms. 33th Annual Meeting of the German Society of Immunology. 25.09.02-28.9.02, Marburg. *Immunobiol* 206, 70.

Kotzias, N., Rühling, J., Falk, C., Weiss, E.H. und Hofmeister, V. (2003). Functional HLA-E cell surface expression in tumor cell lines induced by β 2m-ligand molecules. 34th Annual Meeting of the German Society of Immunology. 24.09.03-27.9.03, Berlin. *Immunobiol* 208, 33.

Mitsdörffer, M., Hofmeister, V., Krause, S., Weiss, E. H., Lochmüller, H., Hohlfeld, R., Melms, A., Weller, M. und Wiendl, H. (2002). The nonclassical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-mediated lysis: Implications for myoblast transplantation and gene therapy. 33th Annual Meeting of the German Society of Immunology. 25.09.02-28.9.02, Marburg. *Immunobiol* 206, 317-318.

Rieger, L., Probe, C., Hofmeister, V., Dietl, J., Weiss, E. H., Steck, T. und Kämmerer, U. (2001). Cytokine production of decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E transfected K-562 cells. 32th Annual Meeting of the German Society of Immunology. 26.09.01-29.9.01, Dresden. *Immunobiol* 204, 207-208.

Vorträge

Hofmeister, V., Maier, S., Ellwart, J. W. und Weiss, E. H. (2001). HLA-G expression in the absence of β 2-microglobulin. 17th Spring Meeting of the German Society of Immunology. 21.02.01-24.02.01, Innsbruck. Programm S. 81

Hofmeister, V., Maier, S., Ellwart, J. W. und Weiss, E. H. (2002). Expression and processing of the HLA-G isoforms. 33th Annual Meeting of the German Society of Immunology. 25.09.02-28.9.02, Marburg. *Immunobiol* 206, 70.

Danke

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Weiß für die Bereitstellung des interessanten Themas, ihr Interesse am Fortgang der Arbeit und ihre ständige Bereitschaft, Probleme und Ergebnisse zu diskutieren.

Ein herzliches Danke allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen für die freundschaftliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe. Besonders möchte ich Dr. Sabine Maier und Dr. Matthias Ulbrecht für ihre gute Unterstützung danken.

Dr. Christine Falk danke ich für die stets informativen Gespräche und ihre tatkräftige Hilfe.

Dr. Heike Pohla möchte ich für die Hilfe bei der Etablierung des Europium-Zytotoxizitätstest und für die Benutzung des VictorTM1420 Multilabel Counter danken.

Dr. Joachim W. Ellwart ein Dankeschön für die Sortierung von Zellen.

Ein großes Dankeschön auch an Dr. Heinz Wiendl, Dr. Ulrike Kämmerer und Dr. Jacob Nattermann für die guten Kooperationen.

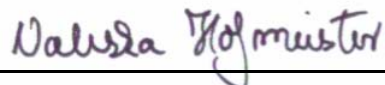
Diese Arbeit wurde unterstützt durch den SFB 217 und den SFB 571.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester für ihre stetige, liebevolle Unterstützung bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

München, den 16. Februar 2004



Unterschrift