

**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-Maximilian-Universität München

vorgelegt von

SABINE MAIER

aus München

Dezember 2000

Dissertation eingereicht: 18.12. 2000

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolf Gutensohn

Tag der mündlichen Prüfung: 1.3. 2002

*Die Wissenschaft, richtig verstanden,
heilt den Menschen von seinem Stolz;
denn sie zeigt ihm seine Grenzen.*

Albert Schweitzer (14.1.1875-4.9.1965)

1 Einleitung	1
1.1 MHC-Moleküle der Klassen I und II.....	1
1.1.1 Struktur der MHC-Moleküle	2
1.1.1.1 Moleküle der Klasse II	2
1.1.1.2 Moleküle der Klasse I	3
1.1.1.3 Mechanismen der MHC Klasse-I-restringierten Antigenprozessierung.....	5
1.1.1.4 Einteilung der Moleküle der Klasse I.....	6
1.1.1.4.1 HLA-E	7
1.1.1.4.2 HLA-G: Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen HLA-G und den "klassischen" HLA-Molekülen	7
Vergleich der Genorganisation der Klasse-Ia-Moleküle und HLA-G	7
Polymorphismus von HLA-G.....	9
Unterschiede in der Regulation der Genexpression.....	9
Unterschiede in der Genexpression	10
Expression von HLA-G in der Plazenta und vermutete Funktion.....	11
1.2 Cytotoxische Effektorzellen.....	13
1.2.1 NK-Zellen im humanen Uterus	13
1.2.2 Die Funktion von NK-Zellen	14
1.2.2.1 Die Funktion von MHC-Klasse-I-Molekülen bei der Regulation von NK-Zellen.....	14
1.2.2.2 Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie: KIR (killer inhibitory receptors)	16
1.2.2.3 Rezeptoren der C-Typ Lectin-Superfamilie: CD94/ NKG2.....	18
1.2.2.4 Eine neue Gruppe von Rezeptoren mit Klasse-I-Molekülen als Liganden.....	19
2 Zielsetzung der Arbeit	20
1) Untersuchungen zur Expression und Regulation von HLA-G und den HLA-G Isoformen.....	
2) Herstellung eines Kaninchenantiseraums und eines monoklonalen Antikörpers.....	
3) Etablierung von Transfektanten der HLA-G-Isoformen, Charakterisierung und funktionelle Untersuchungen.....	
3 Material	21
3.1 Abkürzungen.....	21
3.2 Chemikalien und Enzyme	23
3.3 Allgemeine Puffer und Lösungen	23
3.4 Biopsie-Material.....	23
3.5 Antikörper.....	24
3.5.1 Primäre Antikörper	24
3.5.2 Sekundäre Antikörper.....	24
3.6 Bakterienstämme.....	25
3.6.1 Bakterien für die Subklonierung.....	25
3.6.2 Bakterien für die Expression rekombinanter Proteine.....	25
3.7 Eukaryontische Zellen und Transfektanten.....	26
3.7.1 Zellen.....	26
3.7.2 Transfektanten.....	27

3.8 Oligonukleotide	27
3.9 Vektoren, Plasmide, Sonden, Peptide, Proteine.....	28
3.9.1 Vektoren für die Subklonierung von PCR-Produkten.....	28
3.9.2 Vektoren für die Expressionsklonierung in Bakterien.....	29
3.9.3 Vektoren für die Expression in Eukaryonten	29
3.9.4 Plasmide	29
3.9.4.1 HLA-G-Isoformen in pCR™II	29
3.9.4.2 Konstrukte für die Expression der HLA-G α 1-Domäne als rekombinantes Protein in Bakterien.....	29
3.9.4.3 Herstellung der cDNA-Konstrukte für die Transfektion der HLA-G-Isoformen in 721.221 und K-562	30
3.9.5 Sonden.....	31
3.9.5.1 Spezifische Sonde für HLA-B	31
3.9.5.2 Sonden für HLA-G.....	31
3.9.6 Peptide	32
3.9.7 Proteine	32
4 Methoden	33
4.1 Arbeiten mit Nucleinsäuren.....	33
4.1.1 Reinigung und Konzentration von Nucleinsäuren	33
4.1.1.1 Phenolextraktion	33
4.1.1.2 Präzipitation von Nucleinsäuren.....	33
4.1.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....	33
4.1.2 Isolierung von Nucleinsäuren.....	34
4.1.2.1 Isolierung genomischer DNA nach der Aussalzmethode	34
4.1.2.2 Plasmidisolierung.....	34
4.1.2.2.1 Schnelle Plasmidisolierung	34
4.1.2.2.2 Modifizierte Alkalische Lyse/PEG-Präzipitation.....	34
4.1.2.2.3 Plasmidisolierung mit dem NucleoSpin Kit.....	35
4.1.2.3 Isolierung von RNA.....	35
4.1.3 Enzymatische Reaktionen mit Nucleinsäuren.....	36
4.1.3.1 Restriktionsverdau von DNA	36
4.1.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
4.1.3.3 Reverse Transkription und PCR (RT-PCR).....	37
4.1.3.4 Reinigung von PCR-Produkten.....	37
4.1.3.5 Klonierung von PCR-Produkten.....	37
4.1.3.6 Nachweis einer Insertion in rekombinanten Bakterien mittels PCR.....	37
4.1.3.7 Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden mittels PCR	38
4.1.4 Sequenzierung.....	38
4.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren.....	38
4.1.5.1 Auftrennung von DNA auf Agarosegelen.....	38
4.1.5.2 Southernblot	39
4.1.5.3 Auftrennung von PCR-Produkten in einem Polyacrylamidgel.....	39

4.1.5.4 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	39
4.1.5.5 Agarosegelelektrophorese von RNA.....	40
4.1.5.6 Northernblot	40
4.1.6 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden und Detektion	40
4.1.6.1 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden und Detektion	40
4.1.6.2 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Oligonukleotiden	41
4.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	41
4.1.7.1 Zentrifugation durch Glaswolle.....	41
4.1.7.2 Isolierung mittels Glasmilch	42
4.1.8 Subklonierung von DNA-Fragmenten.....	42
4.2 Arbeiten mit Bakterien	43
4.2.1 Lagerung	43
4.2.2 Kompetenzinduktion von Bakterien mit CaCl ₂ (Tang et al. 1994).....	43
4.2.3 Transformation kompetenter Bakterien	43
4.3 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	44
4.3.1 Allgemeine Zellkultur.....	44
4.3.2 Herstellung von Hybridomen.....	44
4.3.2.1 Gewinnung von Zellen für die Kultivierung von Feederlayer für Hybridome.....	44
4.3.2.2 Fusion von Zellen zur Generierung von Hybridomen.....	45
4.3.3 Transfektion von eukaryontischen Zellen mittels Elektroporation.....	45
4.3.4 Stimulation von Zellen mit Cytokinen.....	46
4.3.5 Induktion der Oberflächenexpression von HLA-E durch Inkubation bei 26°C und/oder mit Peptid und Cytotoxizitätsversuch	46
4.3.6 Indirekte Immunfluoreszenz.....	47
4.3.7 Sortieren von Zellen	47
4.3.8 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL).....	47
4.4 Proteinchemische Methoden	48
4.4.1 Aufreinigung eines rekombinanten Proteins mittels Affinitätschromatographie.....	48
4.4.1.1 Induktion und Reinigung im kleinen Maßstab ("batch-Methode").....	48
4.4.1.2 Beladung der Säule mit Nickel und Regeneration der Säule.....	48
4.4.1.3 Induktion und Reinigung im großen Maßstab (10-ml-Säule)	49
4.4.2 Herstellung von Zell-Lysaten.....	49
4.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	50
4.4.4 Immunpräzipitation	50
4.4.4.1 Vorbereitung der Sepharose	50
4.4.4.2 Präzipitation	50
4.4.4.3 Abspaltung von Oligosacchariden mit Endoglycosidase F.....	51
4.4.4.4 Abspaltung von Oligosacchariden mit Endoglycosidase H	51
4.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	52
4.4.6 Silberfärbung von Proteingelen	52
4.4.7 Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulose (Westernblot).....	53
4.4.8 Immundetektion des Westernblot.....	53

4.4.9 "Enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA).....	53
Übersicht über die im ELISA verwendeten Kombinationen	54
4.4.10 Bestimmung des Isotyps von monoklonalen Antikörpern.....	54
4.4.11 Immunisierung mit dem rekombinanten α 1-Polypeptid und Herstellung von Antiseren.....	54
4.4.11.1 Immunisierung eines Kaninchens	55
4.4.11.2 Immunisierung von Mäusen.....	55
4.4.11.3 Gewinnung der Antiseren.....	55
5 Ergebnisse	56
5.1 Untersuchungen zur Expression und Stimulierbarkeit von HLA-G in Geweben und Zelllinien	56
5.1.1 Untersuchung des HLA-G-Expressionsmusters in Hautbiopsien.....	56
5.1.2 Untersuchung der Expression von HLA-G in Gehirnmaterial und Glioblastomzelllinien	60
5.1.2.1 Nachweis der Expression von HLA-G in Gehirnmaterial.....	60
5.1.2.2 Überprüfung einer HLA-G-spezifischen Sonde.....	62
5.1.2.3 Nachweis der HLA-G-Expression in Glioblastomzelllinien nach Stimulation mit IFN γ im Northernblot	63
5.1.2.4 Nachweis der alternativ gespleißten HLA-G-mRNA in Glioblastomzelllinien nach Stimulation mit IFN γ mittels RT-PCR.....	64
5.1.2.5 Untersuchung der HLA-G-Expression in Glioblastomzelllinien auf Proteinebene mittels FACS-Analyse und Westernblot.....	65
5.1.3 HLA-G-Expression in Muskelbiopsien und Myoblasten.....	68
5.2 Herstellung und Charakterisierung eines Kaninchenserums und eines monoklonalen Antikörpers gegen die α 1-Domäne von HLA-G	70
5.2.1 Herstellung und Charakterisierung eines Kaninchenserums gegen die α 1-Domäne von HLA-G.....	71
5.2.2 Untersuchung der Hybridome	73
5.2.2.1 Charakterisierung des Antikörpers 2G12.....	74
5.2.2.2 Nachweis der HLA-G-Proteine mit dem Ak 2G12 und dem Kaninchenserum.....	79
5.3 Charakterisierung der HLA-G-Transfektanten.....	80
5.4 Expression der HLA-G-Isoformen.....	86
5.4.1 Nachweis der Proteinexpression in den HLA-G-Transfektanten.....	86
5.4.2 EndoH-Sensitivität der HLA-G-Isoformen	90
5.4.3 Charakterisierung von mAk in bezug auf ihre Bindung an die HLA-G-Isoformen.....	91
5.5 Stabilisierung von funktionellem HLA-E auf der Zelloberfläche der HLA-G-Transfektanten ...	94
5.5.1 Stabilisierung von HLA-E auf den Transfektanten der HLA-G-Isoformen.....	94
5.5.2 Funktionelles HLA-E auf den HLA-G-Transfektanten interagiert mit dem löslichen CD94/NKG2A-Rezeptortetramer	96
5.5.3 Beeinflussung der NK-Aktivität durch die funktionelle Stabilisierung von HLA-E in den HLA-G-Transfektanten	101
5.6 Interaktionen der HLA-G-Isoformen	110

6 Diskussion	113
6.1 Untersuchungen zur Expression von HLA-G	113
6.2 IFN γ erhöht selektiv die Expression von G1m in Glioblastomzellen und Myoblasten.....	117
6.3 Wo werden die HLA-G-Isoformen in der Zelle exprimiert?.....	120
Erkennung von HLA-G und den HLA-G-Isoformen durch den Ak W6/32 und mögliche Interaktion mit β_2m	121
6.4 HLA-G und die über HLA-E vermittelte indirekte Interaktion mit CD94/NKG2A.....	122
6.4.1 Das Peptid G ₃₋₁₁ aus der Signalsequenz von HLA-G ist ein Ligand für HLA-E und kann dessen Oberflächenexpression stabilisieren.....	123
6.4.2 Das Peptid B7 ₃₋₁₁ stabilisiert nach exogener Zugabe zu .221-Zellen besser im Vergleich mit dem Peptid G ₃₋₁₁	125
6.4.3 CD94/NKG2A erkennt HLA-E komplexiert mit einem geeigneten Liganden auf X63- Transfektanten, interagiert aber nicht direkt mit HLA-G oder HLA-B27.....	126
6.4.4 .221-G1m- und K-562-G1m-Transfektanten unterscheiden sich in Bezug auf die Stärke der HLA-E-Stabilisierung	128
6.4.5 Die Transfektanten der HLA-G-Isoformen unterscheiden sich in bezug auf ihre Fähigkeit, HLA-E auf der Zelloberfläche zu stabilisieren und die Lyse über CD94/NKG2A zu inhibieren.....	129
7 Zusammenfassung	133
8 Literatur	135

1 EINLEITUNG

Spezifität, Repertoire und Gedächtnis der Immunantwort werden durch eine Familie antigenbindender Moleküle bestimmt: Immunglobuline (Ig), T-Zellrezeptoren (TCR) sowie MHC-Moleküle der Klassen I und II. Während Immunglobuline natives Antigen binden, sind T-Lymphozyten zur Antigenerkennung nur in der Lage, wenn ihnen geeignete Bruchstücke des Antigens (meist Peptide) im Kontext eines Selbst-MHC-Moleküls präsentiert werden (MHC-Restriktion). Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC), beim Menschen auch HLA (humanes leukozytenassoziertes Antigen) genannt, ist in einer etwa 3,5 Mb großen Region auf Chromosom 6p21.3 lokalisiert und kodiert für Proteine, die historisch in drei Klassen unterteilt werden: Zelloberflächenmoleküle der Klasse I und Klasse II sowie die zentral gelegenen Klasse-III-Gene, die unter anderem für Proteine der Komplementkaskade kodieren.

1.1 MHC-MOLEKÜLE DER KLASSEN I UND II

MHC-Moleküle lassen sich in zwei Gruppen einteilen, deren Aufgabe jeweils die Präsentation von Peptiden an T-Lymphozyten ist, die sich aber in der Herkunft der von ihnen gebundenen Peptide und dadurch in der mit ihnen interagierenden T-Zellpopulation unterscheiden.

Klasse-II-Moleküle übernehmen die Präsentation extrazellulärer Antigene (z.B. Bakterien), die erst durch Endozytose aufgenommen und in Endosomen abgebaut werden müssen, bevor die Klasse-II-Moleküle damit beladen werden können.

Moleküle der Klasse I sind für die Präsentation intrazellulärer Antigene sowohl normaler Zellproteine ("Selbst"), die keine Immunantwort auslösen, als auch endogener viraler oder tumorspezifischer Antigene ("Fremd") verantwortlich.

Diese Aufgabenteilung spiegelt sich auf der Seite der T-Lymphozyten, denen die Peptide präsentiert werden, wider. T-Zellen lassen sich anhand ihrer Oberflächenmoleküle und daraus folgend in ihrer MHC-Restriktion in zwei Hauptgruppen einteilen:

T-Helferzellen exprimieren CD4 als Korezeptor für Klasse-II-Moleküle, cytotoxische T-Zellen (CTL) CD8 als Korezeptor für die Klasse-I-Moleküle. CD8⁺ CTL können Zellen mit intrazellulären Pathogenen sowie Tumorzellen direkt erkennen und eliminieren, da Moleküle der Klasse I Peptide dieser Antigene auf der Oberfläche der betroffenen Zellen präsentieren. Zur Abwehr ex-

trazellulärer Pathogene ist auch die humorale Immunantwort nötig, wobei die Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten die Hilfe der CD4⁺ T-Zellen brauchen (Produktion von Cytokinen). Diese Aufgabenteilung der beiden MHC-Klassen erklärt auch das unterschiedliche Expressionsmuster dieser Moleküle: Klasse-I-Moleküle werden auf fast allen kernhaltigen somatischen Zellen exprimiert, während Klasse-II-Moleküle nur auf immunregulatorischen Zellen (Makrophagen, Antigen-präsentierenden Zellen (APC), B-Lymphozyten und aktivierten T-Lymphozyten) vorkommen. Im folgenden sollen die Moleküle der Klasse I näher beschrieben werden.

1.1.1 STRUKTUR DER MHC-MOLEKÜLE

MHC-Moleküle sind transmembrane Glykoproteine aus drei Proteinkomponenten und gehören, da sie eine Ig-ähnliche Domäne besitzen, zur Immunglobulin-Superfamilie.

1.1.1.1 MOLEKÜLE DER KLASSE II

Klasse-II-Moleküle sind Heterodimere aus einer 32-34 kDa schweren α - und einer 29-32 kDa schweren β -Kette, wobei α 1- und β 1-Domäne die peptidbindende Region bilden, α 2- und β 2-Domäne Ig-ähnliche Domänen sind. Es schließen sich je eine etwa 25 Aminosäuren (As) lange Transmembranregion und der cytoplasmatische Teil an, dessen kurze Länge variabel ist.

1.1.1.2 MOLEKÜLE DER KLASSE I

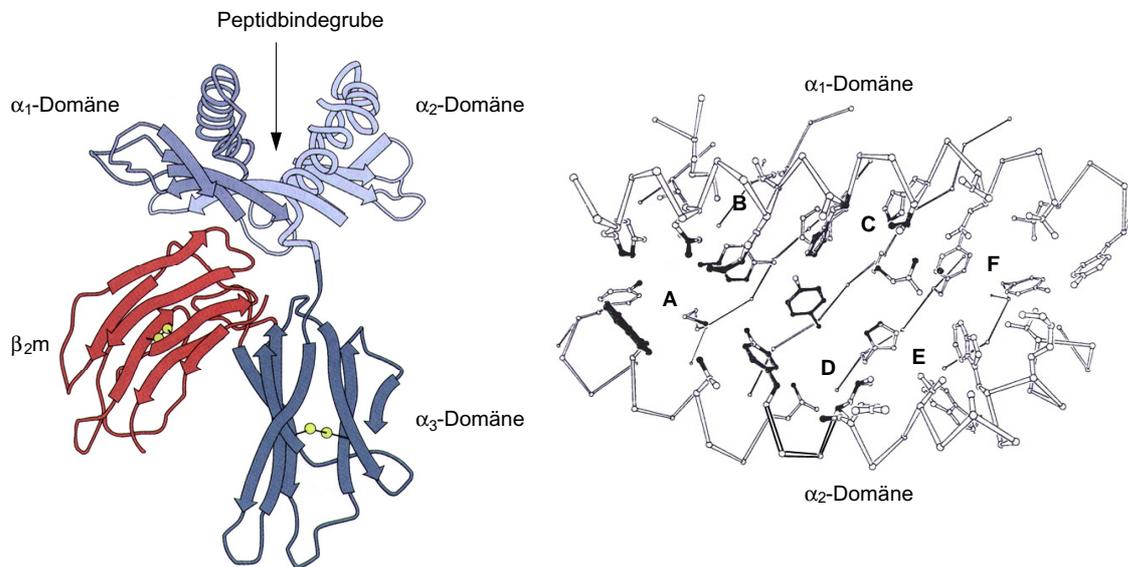


Abb. 1.1: Modell der Struktur eines Klasse-I-Moleküls und Aufsicht auf die Peptidbindungsgrube

Gezeigt ist links die schematische seitliche Ansicht eines Klasse-I-Moleküls (Kuby 1997). Blau gezeichnet sind die Domänen der schweren Kette und rot β_2m . Rechts ist die von α_1 - und α_2 -Domäne gebildete Peptidbindungsgrube von HLA-A2 in der Aufsicht dargestellt (Saper *et al.* 1991). Der Boden der Grube wird von β -Faltblattstrukturen gebildet, die von α -helikalen Bereichen begrenzt werden. Die für die Bindung der Seitenketten des Peptids zuständigen Taschen sind markiert. In die Peptidbindung involvierte Aminosäureseitenketten sind gezeigt.

Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer etwa 44 kDa schweren α -Kette, die nicht-kovalent mit der 12 kDa leichten Kette, dem invarianten, auf Chromosom 15 kodierten β_2 -Mikroglobulin (β_2m) assoziiert ist. Das Molekül lässt sich in vier strukturelle Abschnitte einteilen: drei extrazelluläre Domänen, einen Transmembranteil und einen cytoplasmatischen Teil. Die beiden aminoterminalen Domänen α_1 und α_2 bilden eine Grube aus 8 β -Faltblättern, stabilisiert durch zwei α -Helices, in der Peptide mit bestimmten Sequenzmerkmalen gebunden werden können. In der Grube lassen sich 6 Taschen (A-F) definieren, die die Peptidbindung beeinflussen, wobei meist zwei Ankeraminoaciden des Peptids für die Bindung entscheidend sind (häufig Position 2 und 8/9 mit Tasche B und F). Auf diese Weise wird das Peptidrepertoire der einzelnen HLA-Allele bestimmt. Bei Molekülen der Klasse I ist die Grube an beiden Enden geschlossener als bei Klasse-II-Molekülen, deshalb ist die Länge der gebundenen Peptide auf

8-10 As begrenzt. Bei Klasse-II-Molekülen können die Peptide überhängen. In der dritten, Ig-ähnlichen Domäne $\alpha 3$, die zwischen den HLA-Klasse-I-Molekülen stark konserviert ist, liegt die Bindestelle für den CD8-Korezeptor und auch ein Bereich der Assoziation mit dem β_2m (Tysoe-Calnon *et al.* 1991).

Expression der Klasse-I-Moleküle der Loci HLA-A, -B, und -C findet man auf den meisten kernhaltigen somatischen Zellen, wobei die Menge abhängig vom Gewebersprung auch unter physiologischen Bedingungen variieren kann. Keine oder nur sehr geringe Expression zeigen Zellen des zentralen Nervensystems, v.a. Neuronen und Astrocyten, sowie exokrine Pankreaszellen, Corneaepithelium, Nebenschilddrüse, Skelett- und glatte Muskulatur und einige Neuroblastom-Zelllinien (Le Bouteiller *et al.* 1990; Singer und Maguire 1990; Massa 1993; Le Bouteiller 1994). HLA-A- und -B-Moleküle fehlen außerdem auf den unterschiedlichen Trophoblasten-Zellpopulationen (villöser und extravillöser Cytotrophoblast, Syncytiotrophoblast), die während der Schwangerschaft die feto-maternale Barriere bilden, und auf männlichen und weiblichen Keimzellen (Ohashi *et al.* 1990; Hunt und Orr 1992; Roberts *et al.* 1992; Castilla *et al.* 1993).

1.1.1.3 MECHANISMEN DER MHC KLASSE-I-RESTRINGIERTEN ANTIGENPROZESSIERUNG

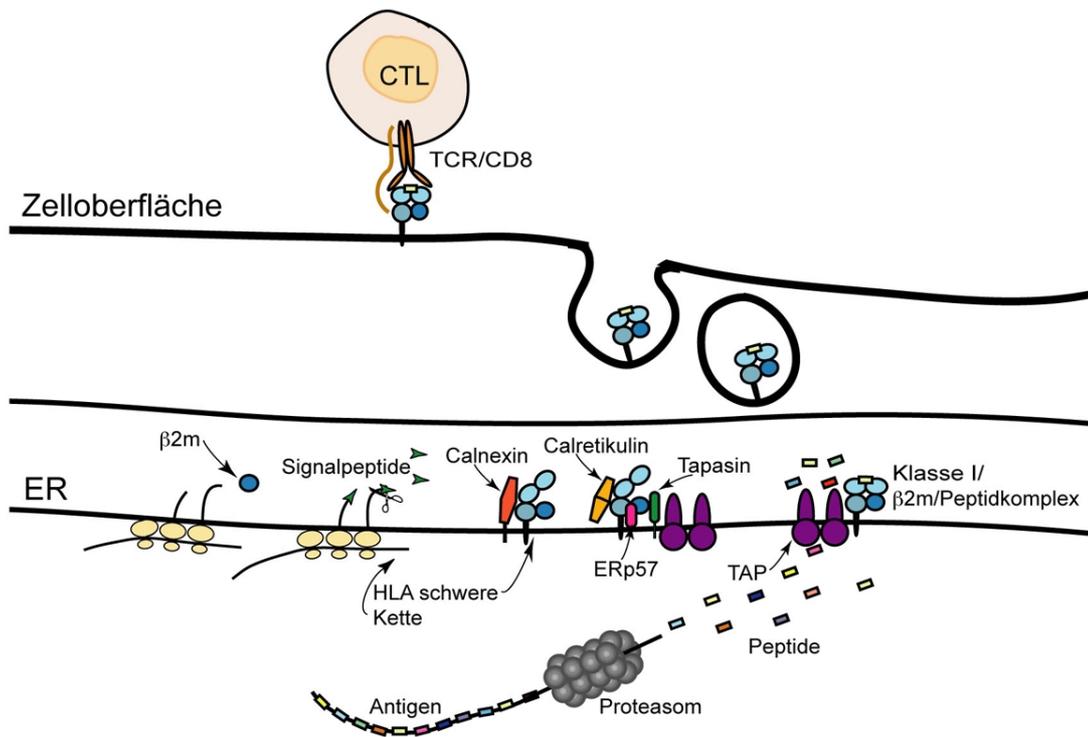


Abb. 1.2: Modell der Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle der Klasse I

Die neu synthetisierte schwere Kette gelangt ins endoplasmatische Retikulum (ER), wobei das Signalpeptid abgespalten wird. Zunächst erfolgt die Assoziation mit Calnexin, die wieder gelöst wird durch Bindung von β_2m . Bindung an Calretikulin, Tapasin und ERp57 erlaubt die Faltung des Moleküls und sorgt für die Retention im ER. Endogene Proteine werden in einem Proteasomen-abhängigen Weg degradiert und die entstehenden Peptide mittels des TAP-Transporters ins ER transportiert, wo sie entsprechend der Spezifität der Antigenbindungsgrube von Klasse-I-Molekülen gebunden werden können. Der fertige trimolekulare Komplex kann nun über das Golgikompartiment an die Zelloberfläche transportiert werden.

MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf der Zelloberfläche als heterotrimere Komplexe aus schwerer Kette, β_2m und einem kurzen Peptid exprimiert. Der korrekte Zusammenbau der Klasse-I/Peptidkomplexe im endoplasmatischen Retikulum (ER) ist dabei Voraussetzung für eine stabile Oberflächenexpression (Abb. 1.2). Die Generierung von geeigneten Peptiden, die unerlässlich für die korrekte Bildung und Funktion der Klasse-I-Moleküle sind, aus cytosolischen Proteinen findet in der Hauptsache durch das Proteasom, einen ATP-abhängigen Komplex aus diversen Untereinheiten statt, dessen Aktivität durch eine Reihe akzessorischer Proteinkomplexe moduliert werden kann (Rock *et al.* 1994). Einige Bestandteile des Proteasoms

(LMP2, LMP7, MECL-1, PA28) sind durch Interferon γ regulierbar und beeinflussen über die Art der hergestellten Epitope die T-Zellantwort (Belich *et al.* 1994; Ahn *et al.* 1995; Niedermann *et al.* 1995; Nandi *et al.* 1996). Allerdings können auch andere Proteasen in die Erzeugung von CTL-Epitopen involviert sein (Yang *et al.* 1996a). Der Transport der Peptide ins ER erfolgt über ein heterodimeres Mitglied der "ABC"- (ATP-binding cassette) Transporterfamilie, den TAP-Transporter (transporter associated with antigen processing), wobei die Bindung des Peptids ATP-unabhängig, die Translokation aber ATP-abhängig ist (Androlewicz *et al.* 1993; Neefjes *et al.* 1993; Shepherd *et al.* 1993; Androlewicz und Cresswell 1994; Androlewicz *et al.* 1994). Die Peptidbindungsstelle des humanen TAP ist dabei weniger streng in der Auswahl von akzeptablen Sequenzen als der TAP-Transporter der Maus, der eine starke Präferenz für Peptide mit hydrophoben C-terminalen Aminosäuren aufweist, während der humane TAP auch Peptide mit basischen C-Termini transportiert (Neefjes *et al.* 1995). Der Polymorphismus von Maus- und humanem TAP ist begrenzt und scheint keinen Einfluß auf die Spezifität der Peptide zu haben (Schumacher *et al.* 1994; Daniel *et al.* 1997; Übel *et al.* 1997). Aufgabe der Klasse-I-Moleküle ist es, die intrazelluläre Proteinzusammensetzung anzuzeigen. Deshalb gibt es eine Reihe von Proteinen mit der Aufgabe, sie im ER festzuhalten, bis sie ein Peptid mit ausreichender Affinität gebunden haben. Im Anschluß an die Translokation ins ER bindet die Klasse-I-schwere-Kette zunächst an ein 88 kDa schweres, membrangebundenes, Lektin-ähnliches Chaperon, Calnexin, das an der korrekten Faltung des Moleküls beteiligt ist (Carreno *et al.* 1995). Nach der Assoziation mit β_2m dissoziiert das entstandene schwere-Kette/ β_2m -Heterodimer von Calnexin und lagert sich mit Hilfe der Interaktion mit Calretikulin, der Reduktase ERp57 und Tapasin an die TAP-1-Untereinheit des TAP-Transporters an (Sadasivan *et al.* 1996; Solheim *et al.* 1997; Hughes und Cresswell 1998). Letzteres bildet die Brücke zwischen Klasse I und TAP und liefert das ER-Retentionssignal für leere Klasse-I-Moleküle. Sobald ein geeignetes Peptid gebunden ist, faltet sich das Klasse-I-Molekül vollständig, trennt sich von allen Hilfsmolekülen und kann an die Zelloberfläche exportiert werden.

1.1.1.4 EINTEILUNG DER MOLEKÜLE DER KLASSE I

Moleküle der Klasse I werden weiter in zwei Gruppen eingeteilt:

HLA-A, -B und -C werden als sogenannte klassische Transplantationsantigene oder auch Klasse-Ia-Moleküle bezeichnet. Diese Moleküle sind hochpolymorph mit derzeit 124 bekannten Allelen für HLA-A, 258 für HLA-B und 74 für HLA-C (<http://www.anthonynolan.com/HIG/index.html>, 11/98). Die meisten Unterschiede finden sich dabei in Bereichen, die in

der Peptidbindung involviert sind und beeinflussen so die peptidbindenden Eigenschaften der einzelnen Allele (Janeway *et al.* 1998).

Im Gegensatz dazu wurden HLA-E, -F und -G aufgrund des begrenzten Polymorphismus, der beschränkten Gewebeverteilung, der geringen Expression und der bis dahin unbekanntem Funktion als nicht-klassische Klasse-I-Moleküle oder auch als Klasse Ib bezeichnet (Le Bou-teiller und Lenfant 1996).

1.1.1.4.1 HLA-E

HLA-E ist das einzige Klasse-Ib-Molekül, das in allen untersuchten Geweben und Zelllinien transkribiert wird (Wei und Orr 1990; Ulbrecht *et al.* 1992a). Nur zwei Allele wurden bislang beschrieben, die sich an Aminosäureposition 107 unterscheiden (HLA-E^R: Arginin, HLA-E^G: Glycin) und in vergleichbarer Häufigkeit in der kaukasischen Population vorkommen (Geraghty *et al.* 1992). Generell ist HLA-E nur in geringer Menge an der Zelloberfläche exprimiert. Inkubation bei 26°C, Zugabe von humanem β_2m (hu β_2m) oder exogenen Peptiden kann in Transfektanten jedoch die Oberflächenexpression stabilisieren (Ulbrecht *et al.* 1992b). Kürzlich wurde gezeigt, daß HLA-E in der Lage ist, Peptide aus der Signalsequenz von Klasse-I-Molekülen zu binden (As 3-11), wobei die Positionen 2, 7 und 9 entscheidend sind. Vor allem ein Methionin an Position zwei des Peptids ist essentiell für die Bindung (Braud *et al.* 1997a; Lee *et al.* 1998a; Brooks *et al.* 1999).

1.1.1.4.2 HLA-G: GEMEINSAMKEITEN UND UNTERSCHIEDE ZWISCHEN HLA-G UND DEN „KLASSISCHEN“ HLA-MOLEKÜLEN

Vergleich der Genorganisation der Klasse-Ia-Moleküle und HLA-G

Die einzelnen Abschnitte der Klasse-I-Moleküle werden von sechs bis acht Exons kodiert. Exon 1 beginnt mit einem kurzen 5'-untranslatierten Teil (5'-UT), gefolgt von 73 bp für das Signalpeptid, das nach dem Eintritt ins ER abgespalten wird. Die Exons 2 (270 bp), 3 und 4 (je 276 bp) kodieren die 90 (α 1) bzw. 92 Aminosäuren (As) der 3 extrazellulären Domänen α 1,

$\alpha 2$ und $\alpha 3$, Exon 5 die 27 As der hydrophoben Transmembranregion und die Exons 6-8 die 30 As des cytoplasmatischen Teils. Das letzte Exon enthält außerdem die 3'-untranslatierte Region (3'-UT). HLA-G unterscheidet sich in der Intron-Exon-Organisation von HLA-A/-B/-C zum einen dadurch, daß Exon 7 nicht im Transkript enthalten ist (dies ist auch bei HLA-F der Fall). Zum andern ist das zweite Codon in Exon 6 der Translationsstop, wodurch der cytoplasmatische Anteil von HLA-G nur 6 As lang ist (Geraghty *et al.* 1987; Ellis *et al.* 1990). Dies führt zu einer drastisch reduzierten Endozytose von HLA-G im Gegensatz zu anderen Klasse-I-Molekülen, da die entscheidende Determinante für diesen Vorgang fehlt, woraus ein ungewöhnlich langsamer Turnover von HLA-G an der Zelloberfläche resultiert (Davis *et al.* 1997). Des weiteren fehlen dadurch ein Serin (Pos. 336) als Phosphorylierungsstelle und ein hoch konservierter Tyrosinrest, der als Substrat für Tyrosinkinasen dient. Dies könnte funktionelle Auswirkungen auf die Signalvermittlung haben (Geraghty *et al.* 1987; Le Bouteiller und Mallet 1997). Allerdings wurde gezeigt, daß z.B. HLA-A2 mit einem auf vier As verkürzten cytoplasmatischen Teil noch in der Lage ist, Signale weiterzuleiten, die zu einer Erhöhung des intrazellulären freien Ca^{2+} und der IL2-Produktion in Jurkat-Zellen führen, so daß ein intakter cytoplasmatischer Teil nicht für alle Klasse-I-Funktionen erforderlich zu sein scheint (Gur *et al.* 1990).

Die Gesamthomologie zwischen HLA-G und der HLA-A/-B/-C Konsensus-Sequenz beträgt 86% auf Proteinebene, und seine Homologie zu HLA-A und -B entspricht deren Homologie untereinander (Geraghty *et al.* 1987). Besonders konserviert ist die $\alpha 3$ -Domäne mit 91% Homologie. Ein konserviertes Alanin an Position 245 in dieser Domäne ist für die Interaktion mit dem auf cytotoxischen T-Lymphocyten exprimierten CD8-Glycoprotein verantwortlich (Sanders *et al.* 1991). Alle für die Interaktion mit β_2m verantwortlichen Reste in der $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Domäne sind bei HLA-G konserviert (Tysoe-Calnon *et al.* 1991). Andere Gemeinsamkeiten mit Klasse-Ia-Molekülen sind eine einzelne N-Glycosylierungsstelle (Asp86) am Ende der $\alpha 1$ -Domäne und das Auftreten von Disulfidbrücken in der $\alpha 2$ - (Cys101-Cys164) und $\alpha 3$ -Domäne (Cys203-Cys259) (Le Bouteiller und Mallet 1997). Allerdings finden sich bei HLA-G noch zwei weitere Cysteine: an Position 42 in der $\alpha 1$ -Domäne und an Position 147 in der $\alpha 2$ -Domäne. Die meisten Unterschiede liegen zwischen As 61 und 83 (Geraghty *et al.* 1987). Hier unterscheiden sich auch die HLA-A/-B/-C-Allele am stärksten voneinander (Parham *et al.* 1988).

Polymorphismus von HLA-G

Während das Hauptcharakteristikum der Klasse-Ia-Moleküle der enorme Polymorphismus ist, sind von HLA-G bis jetzt 14 Allele beschrieben, von denen sich nur vier auch auf Aminosäureebene unterscheiden (Moreau *et al.* 1998; Bodmer *et al.* 1999).

Unterschiede in der Regulation der Genexpression

In den Promotoren von Klasse-Ia-Genen finden sich einige konservierte cis-regulatorische Elemente, die in der Lage sind, nukleäre trans-agierende Faktoren zu binden. Neben einer ungewöhnlichen TATA-Box (TCTAAA) und einer klassischen CCAAT-Box sind dies eine Enhancer-A-Region, die eine NF- κ B Bindestelle enthält, die Enhancer-B-Region und eine Interferon Konsensussequenz (ICS) (Le Bouteiller 1994). Nur die CCAAT- und die TATA-Box sind im HLA-G-Promotor konserviert. Die Enhancer-B-Sequenz unterscheidet sich in zwei Basenpaaren, die Enhancer-A-Sequenz weist eine 5-bp-Deletion auf und ist deshalb nicht mehr in der Lage, κ B-Faktoren zu binden (Geraghty *et al.* 1987). Die ICS ist zum Großteil deletiert; allerdings konnte gezeigt werden, daß HLA-G durch Interferon γ induzierbar ist, so daß die Induzierbarkeit durch Interferon bei HLA-G anders reguliert sein muß als bei Klasse-Ia-Molekülen (Yang *et al.* 1996b). Untersuchungen in HLA-G transgenen Mäusen zeigten, daß die 5'-flankierende Sequenz hauptsächlich für die unterschiedlichen Expressionsmuster von HLA-G und Klasse-Ia-Genen verantwortlich ist. Alle bekannten regulatorischen Elemente für Klasse-Ia-Gene liegen innerhalb von 500-600 bp der 5'-flankierenden Sequenz unmittelbar vor Exon 1 (Epstein *et al.* 1989; Chamberlain *et al.* 1991). Für HLA-G erwies sich ein 1,1 kb distal des Transkriptionsstarts lokalisiertes 244 bp *Hind* III-*Eco*R I-Fragment als wichtiges positiv-regulatorisches Element und könnte als "locus control region" fungieren (Schmidt *et al.* 1993; Schmidt und Orr 1995; Moreau *et al.* 1997).

Unterschiede in der Genexpression

In der Genexpression unterscheidet sich HLA-G drastisch von allen übrigen Klasse-I-Molekülen. Am auffallendsten ist dabei das Auftreten verschiedener alternativer Spleißformen:

Isoform G1 (G1m): Das Volle-Länge-Transkript kodiert für ein Polypeptid, das im Aufbau den klassischen Klasse-I-Membranmolekülen entspricht und mit β_2m assoziiert auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Shimizu *et al.* 1988). Es ist ebenfalls in der Lage, Peptide zu präsentieren, bevorzugt mit einer Länge von 9 As mit Ankeraminosäuren in Position 2, 3 und 9. Zwei Positionen scheinen besonders die Spezifität der von HLA-G gebundenen Peptide zu bestimmen: bevorzugt Leu am C-Terminus und Pro oder eine andere kleine hydrophobe As in Position drei. Die Komplexität der gebundenen Peptide ist etwas geringer, entspricht aber in etwa der von HLA-A und -B (Lee *et al.* 1995; Diehl *et al.* 1996).

Isoform G5 (G1s): Eine lösliche Form dieses G1-Moleküls (G1s oder G5) wird von einer mRNA kodiert, in der die 120 bp der Intron-4-Sequenz nicht entfernt wurden. Der offene Leserahmen dieser RNA endet im Intron 4 (In4) 21 As nach der $\alpha 3$ -Domäne (Fujii *et al.* 1994; Moreau *et al.* 1995). G1s bindet im wesentlichen denselben Satz an Peptiden wie G1m, assoziiert aber offensichtlich nicht im selben Maß mit TAP, da es im Gegensatz zu G1m nicht mit TAP-spezifischen Antikörpern präzipitiert werden kann (Lee *et al.* 1995).

Weitere Spleißvarianten entstehen durch das Entfernen von einem oder zwei Exons: Der Isoform G2 (G2m) fehlt das Exon 3 ($\Delta\alpha 2$ -Domäne) (Ishitani und Geraghty 1992). Auch von dieser Form gibt es eine lösliche Variante, G6 (G2s), die wie G1s durch das Vorhandensein von Intron 4 entsteht ($\Delta\alpha 2$ -Domäne, + In4) (Fujii *et al.* 1994). Der Isoform G3 fehlen Exon 3 und 4 ($\Delta\alpha 2/\Delta\alpha 3$ -Domäne) (Ishitani und Geraghty 1992), die Isoform G4 enthält kein Exon 4 ($\Delta\alpha 3$ -Domäne) (Kirszenbaum *et al.* 1994).

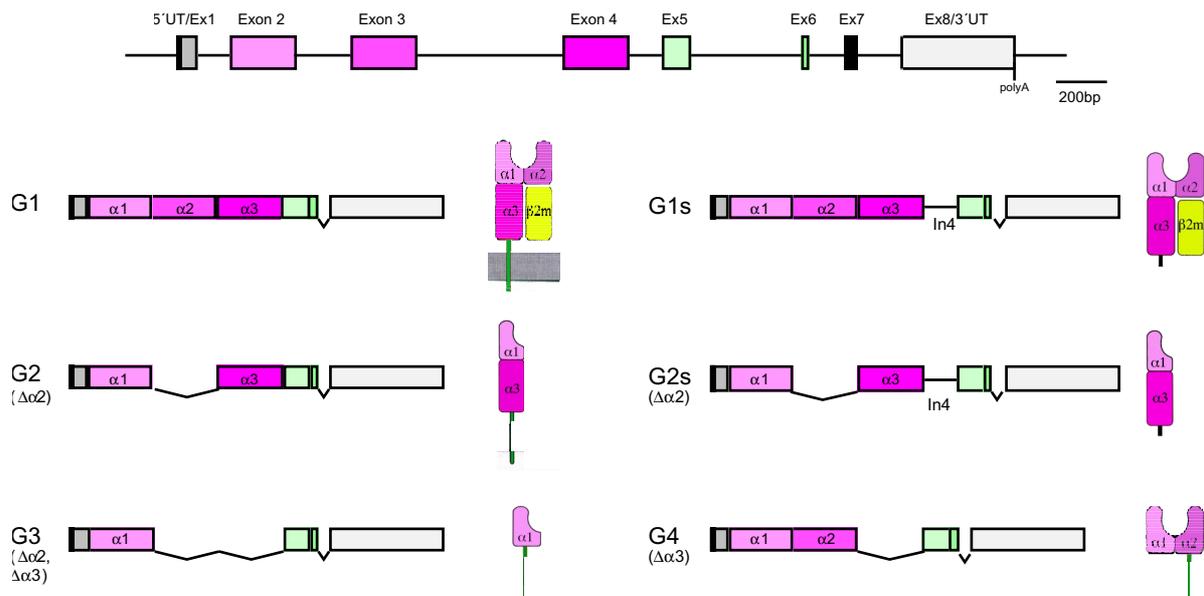


Abb. 1.3: Schematische Übersicht der bekannten HLA-G-Isoformen

Gezeigt sind die Genstruktur von HLA-G, die daraus durch alternatives Spleißen entstehenden cDNAs für die einzelnen Isoformen sowie deren schematische Proteinstrukturen, die bislang nur für G1m und G1s nachgewiesen werden konnten. Die kodierten Proteindomänen sind in den Exons der jeweiligen Transkripte angegeben.

Expression von HLA-G in der Plazenta und vermutete Funktion

Der semiallogene Fetus exprimiert MHC-Moleküle der Mutter und des Vaters und wäre somit ein Angriffsziel für die cytotoxischen T-Zellen der Mutter, die allogene Zielzellen zerstören. Menschliche Prä-Implantationsembryos exprimieren kein HLA-A, und -B und keine HLA-Klasse-II-Moleküle. Nach der Implantation entsteht aus dem Trophoectoderm der implantierten Blastocyste der Trophoblast und bildet die fetale Komponente der maternal-fetalen Barriere. Cytotrophoblasten sind negativ für HLA-A und HLA-B und für HLA-Klasse II und sind die Vorläufer aller Subpopulationen von Trophoblastenzellen, die anhand von Lokalisation, Morphologie und Differenzierungsstatus eingeteilt werden (Hunt und Orr 1992). Sie üben eine Reihe von Funktionen aus, u.a. den Nährstofftransport von der Mutter zum Fetus und die Synthese verschiedener Hormone und Wachstumsfaktoren. Der voll differenzierte Syncytiotrophoblast bildet eine durchgehende Zellschicht, die dem mütterlichen Blut ausgesetzt ist. Villöse Cytotrophoblasten, die im frühen Stadium der Schwangerschaft reichlich vorhanden sind, liegen direkt unter dem Syncytium. Diese Trophoblasten-Zellpopulation ist durch ihre proliferativen und im Anschluß daran invasiven Fähigkeiten charakterisiert: Sie wandert zur Verankerung der Plazenta in die maternale basale Decidua (interstitielle Trophoblasten) ein und sorgt für ver-

mehrten Blutfluß durch Beteiligung an der Bildung der uteroplazentaren Spiralarterien. Bei Fortschreiten der Schwangerschaft werden die Cytotrophoblasten weniger invasiv, und extravillöse Zellen bilden die Chorionmembran, die von den Grenzen der Plazenta ausgeht, den Embryo umgibt und direkt an die mütterliche Decidua angeschlossen ist. HLA-G wird biallelisch im extravillösen Cytotrophoblasten von Plazenten des ersten Trimesters exprimiert, zum Ende der Schwangerschaft nimmt die Expression, die transkriptionell reguliert ist, merklich ab und die Expression von HLA-A und -B nimmt zu (Kovats *et al.* 1990; Hunt und Orr 1992; McMaster *et al.* 1995; Yang *et al.* 1996b; Blaschitz *et al.* 1997; Hashimoto *et al.* 1997; Hviid *et al.* 1998). Die mögliche Peptidpräsentation durch HLA-G könnte es erlauben, viral infizierte oder entartete Zellen in der Plazenta zu erkennen (Lee *et al.* 1995; Blaschitz *et al.* 1997). Des weiteren wurde gezeigt, daß der Kontakt mit HLA-G-exprimierenden Zellen die Freisetzung von IL-3 und IL-1 β hochregulieren und die Freisetzung von TNF- α herunterregulieren kann (Maejima *et al.* 1997).

Als mögliche Funktion von HLA-G in der Plazenta wurde lange der Schutz des Fetus vor der Erkennung und Abstoßung durch das Immunsystem der Mutter angenommen. Durch die fehlende Expression der polymorphen klassischen Klasse-I-Moleküle wird die Erkennung durch cytotoxische T-Zellen verhindert (Kovats *et al.* 1990). Allerdings können Zellen, die negativ für Klasse I sind, von NK-Zellen zerstört werden. Diese beiden Probleme (Lyse durch CTL aufgrund des paternalen (Fremd-) MHC oder Lyse durch NK-Zellen wegen fehlender Klasse-I-Moleküle) können durch die Expression des wenig polymorphen HLA-G-Moleküls umgangen werden (Shimizu *et al.* 1988; Burt *et al.* 1991; Colbern *et al.* 1994; Diehl *et al.* 1996). Die Bedeutung der HLA-G-Expression für eine Aufrechterhaltung der Schwangerschaft zeigt sich in Hinweisen, daß verminderte Expression von HLA-G im extravillösen Trophoblasten mit Präeklampsie korreliert zu sein scheint (Colbern *et al.* 1994), (Hara *et al.* 1996).

Mittlerweile wurde die Expression von HLA-G aber auch in einer Reihe anderer Gewebe nachgewiesen: in fetalem Auge und Thymus, fetaler Leber, aber auch in adulten Geweben wie der hinteren Augenkammer, (die als immunprivilegierter Ort angesehen wird und wo, wie in der Plazenta, Zellen zu finden sind, denen die Expression klassischer Klasse-I-Moleküle fehlt), Keratinozyten, Keimzellen, peripheren Blutlymphozyten, Thymus, mononukleären Phagozyten (Shukla *et al.* 1990; Houlihan *et al.* 1992; Ishitani und Geraghty 1992; Chiang *et al.* 1994; Kirszenbaum *et al.* 1994; Ulbrecht *et al.* 1994; Yang *et al.* 1996b; Crisa *et al.* 1997). Sie ist aber in der Regel um Größenordnungen niedriger als die Mengen an klassischen Klasse-I-Molekülen in denselben Geweben (Onno *et al.* 1994).

1.2 CYTOTOXISCHE EFFEKTORZELLEN

Neben den CD3⁺/CD8⁺ cytotoxischen T-Zellen existieren im Organismus die NK-Zellen (natürliche Killerzellen, 10-15% der peripheren Blutlymphozyten). Beide stammen von gemeinsamen CD34⁺ Vorläuferzellen ab (Colonna *et al.* 1993; Sanchez *et al.* 1994). NK-Zellen sind im allgemeinen CD3⁻/TCR⁻ sowie CD4 und CD8 negativ und exprimieren CD56 (eine Isoform des "neural cell adhesion molecule" - NCAM) auf der Oberfläche (Hercend *et al.* 1985). Etwa 10% der Zellen exprimieren sehr viel CD56 (CD56^{bright}) und entweder kein CD16-Antigen (CD16⁻) oder nur wenig (CD16^{dim}) (Lanier *et al.* 1986). Da diese Zellen ein hohes proliferatives Potential besitzen, kaum cytoplasmatische Granula enthalten und nur schwache cytolytische Aktivität zeigen, sind sie vermutlich die unreifen Vorläufer (Nagler *et al.* 1989; Vivier *et al.* 1993; Carson *et al.* 1997). Die Mehrzahl der Zellen, die reifen NK-Zellen, exprimieren wenig CD56 (CD56^{dim}), dafür aber viel CD16-Antigen (CD16^{bright}). CD16 (FcγRIIIA) ist ein niederaffiner Rezeptor für die Fc-Region von IgG. Antikörperbeladene 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).

1.2.1 NK-ZELLEN IM HUMANEN UTERUS

Im "nicht-schwangeren" Endometrium verändert sich die Zahl der NK-Zellen während des Menstruationszyklus: wenige sind in der proliferativen Prä-Ovulationsphase nachweisbar. Ihre Zahl nimmt dann zu, mit einem Höhepunkt in der späten sekretorischen Phase und Kennzeichen von Apoptose einige Tage vor Einsetzen der Menstruation (King *et al.* 1996). Kommt es zur Schwangerschaft, bleiben die NK-Zellen konstant, und in der Phase der Implantation und in der frühen Schwangerschaft sind etwa 70% der gesamten Leukozytenpopulation in der humanen Uterusschleimhaut (Decidua) CD56^{bright}CD16⁻CD3⁻ NK-Zellen (Loke und King 1991). Vor allem in der Decidua basalis, wo die Zellen des sich einnistenden Trophoblasten das maternale Gewebe infiltrieren, ist die Zahl der NK-Zellen besonders hoch. Nach der 20. Woche nimmt ihre Zahl ab, und gegen Ende der Schwangerschaft fehlen sie völlig (King *et al.* 1996). NK-Zellen im Uterus unterscheiden sich von den normalerweise im Blut gefundenen NK-Zellen z.B. dadurch, daß sie CD56^{bright} sind, während die meisten NK-Zellen im Blut CD56^{dim} sind (King und Loke 1991). Aber auch zwischen den CD56^{bright}-NK-Zellen des Bluts und des Uterus gibt es Unterschiede: die im Blut vorkommenden enthalten keine Granula

(Nagler *et al.* 1989), während im Uterus die Mehrheit die typischen morphologischen Charakteristika großer granulärer Lymphozyten (LGL) aufweist (King *et al.* 1991; King *et al.* 1996)

1.2.2 DIE FUNKTION VON NK-ZELLEN

NK-Zellen lysieren MHC-Klasse-I-negative sowie transformierte und Virus-infizierte Zellen mit veränderter Klasse-I-Expression unabhängig von der Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle (nicht-MHC-restringiert). Dies liefert einen Schutz gegen Pathogene und Tumorzellen, die die MHC-Klasse-I-Expression niederreguliert oder verloren haben, um MHC-restringierten T-Zell-Immunantworten zu entgehen ("missing self") (Ljunggren und Kärre 1990). Des Weiteren regulieren sie die hämatopoietische Zelldifferenzierung und modulieren andere Immunzellen durch Sekretion diverser Cytokine (IFN γ , TNF, GM-CSF, M-CSF, IL5) nach Aktivierung (Anegon *et al.* 1988; Paya *et al.* 1988; Cuturi *et al.* 1989; Warren *et al.* 1995; Horwitz *et al.* 1997; Leibson 1997).

1.2.2.1 DIE FUNKTION VON MHC-KLASSE-I-MOLEKÜLEN BEI DER REGULATION VON NK-ZELLEN

Die Fähigkeit von NK-Zellen, Zellen abzutöten, wird kontrolliert durch eine Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen, die von unterschiedlichen Rezeptoren vermittelt werden, wobei das inhibitorische Signal über das aktivierende dominiert (Moretta *et al.* 1997). Normale "gesunde" Zellen entkommen der NK-Lyse, da ihre Klasse-I-Moleküle mit den NK-inhibitorischen Rezeptoren, die spezifisch für MHC-Klasse-I-Allotypen sind, in Wechselwirkung treten, wodurch die Lyse verhindert wird. Die Zahl der Zellen, die einen bestimmten Rezeptor tragen, und die Menge an Rezeptoren auf diesen Zellen sind variabel (Gumperz *et al.* 1996). NK-Zellen können mehrere verschiedene inhibitorische Rezeptoren exprimieren. Die Verteilung scheint zufällig, es muß aber mindestens ein Rezeptor vorhanden sein, der ein Selbst-Klasse-I-Allel erkennt (Valiante *et al.* 1997). Es gibt keine Determination der Expression durch den HLA-Haplotyp, d.h. NK-Rezeptoren, die keinen Liganden haben, können ebenfalls exprimiert werden, da dies nicht schädlich ist (Gumperz *et al.* 1996). Auf diese Weise gibt es NK-Zellen, die nur ein Selbst-Allel erkennen, so daß schon der Verlust oder die Veränderung eines einzelnen Allels in einer infizierten oder transformierten Zelle erkannt werden kann und zu ihrer Eliminierung durch NK-Zellen führt. Neben Verlust von Allelen kann aber auch eine

geschwächte Expression, wie man sie an Tumoren häufig beobachten kann, festgestellt werden (Pende *et al.* 1998).

Nach Erkennung von Molekülen der Klasse I auf der Zielzelle hemmen die NK-inhibitorischen Rezeptoren zellvermittelte Cytotoxizität der drei Arten (Binstadt *et al.* 1996):

NK-Cytotoxizität

Antikörper-abhängige zellvermittelte Cytotoxizität (ADCC)

von cytotoxischen T-Zellen (CTL) vermittelte Cytotoxizität (Rolle auch bei der Regulation der Cytokinsekretion)

Die letzten beiden lytischen Funktionen werden durch $Fc\gamma RIII$ (CD16) auf NK-Zellen bzw. den TCR auf T-Lymphozyten positiv reguliert.

Zwei unterschiedliche Familien von Rezeptoren sind an der Erkennung der Klasse-I-Moleküle durch NK-Zellen beteiligt: humane KIR (killer inhibitory receptors), die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören, sowie die zur C-Typ Lektinfamilie gehörenden CD94/NKG2 (Abb. 1.4). Die Expression dieser Rezeptoren beschränkt sich allerdings nicht nur auf NK-Zellen, sondern findet sich u.a. auch auf einer kleinen Population von T-Zellen (Mingari *et al.* 1995; D'Andrea *et al.* 1996; Mingari *et al.* 1997; Mingari *et al.* 1998). Die Rezeptoren unterscheiden sich strukturell, die Vermittlung des inhibitorischen Signals erfolgt aber immer über ITIM-Sequenzen (immune receptor tyrosine-based inhibition motif, YxxL/V), die in den cytoplasmatischen Domänen lokalisiert sind. Nach Bindung des Liganden und Aktivierung des inhibitorischen Rezeptors werden die Tyrosine der ITIM-Sequenz durch die Protein-Tyrosinkinase Lck phosphoryliert und bieten eine Bindungsstelle für Phosphatasen, die SH2-Domänen enthalten, wie die Tyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2, was zu einer Inhibition der proximalen Tyrosinkinasen führt (Binstadt *et al.* 1996; Fry *et al.* 1996). Das Ergebnis der Signalvermittlung ist die Inhibition der NK-Aktivierung und der Cytokinexpression.

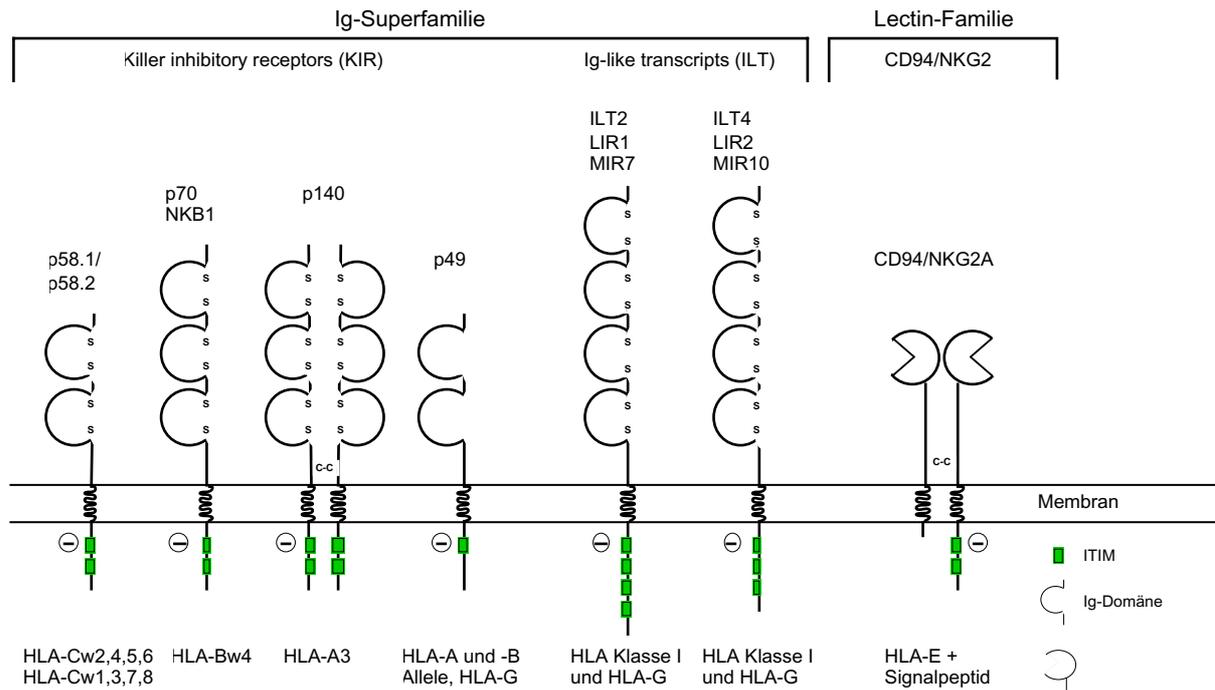


Abb. 1.4: Schematische Darstellung inhibitorischer NK-Rezeptoren mit bekannten Klasse-I-Liganden

Angegeben ist die schematische Proteinstruktur der bislang beschriebenen inhibitorischen NK-Rezeptoren, für die eine Interaktion mit Klasse-I-Molekülen nachgewiesen ist, die für den jeweiligen Rezeptor bestätigten Liganden sowie die alternativen Bezeichnungen einzelner Rezeptoren.

1.2.2.2 REZEPTOREN DER IMMUNGLOBULIN-SUPERFAMILIE: KIR (KILLER INHIBITORY RECEPTORS)

Humane KIR sind Typ I transmembrane Glykoproteine, die zur Ig-Superfamilie gehören, von einer Genfamilie auf Chromosom 19 kodiert werden und auf NK-Zellen und einer kleinen Gruppe von T-Zellen exprimiert sind. Die Rezeptordiversität wird durch allelichen Polymorphismus und alternatives Spleißen erzeugt. Anhand der Zahl der Ig-ähnlichen Domänen können zwei Subgruppen unterschieden werden: KIR3D enthalten drei Ig-ähnliche Domänen, KIR2D zwei. Unterschiede in den extrazellulären, transmembranen und intrazellulären Domänen findet man in beiden Familien, am bemerkenswertesten aber ist die Heterogenität des cytoplasmatischen Anteils: KIR mit langem cytoplasmatischem Anteil (z.B. KIR2DL/p58) enthalten zwei ITIM-Sequenzen im Abstand von 26 As, die für die inhibitorische Funktion verantwortlich sind. Den KIR mit kurzem cytoplasmatischem Anteil (z.B. KIR2DS/p50) fehlen die ITIM-Sequenzen. Statt dessen tragen sie eine geladene Aminosäure (meist Lysin) im Transmembranbereich, wirken

aktivierend und werden auch als KAR (killer activating receptor) bezeichnet (Moretta *et al.* 1995; Wagtmann *et al.* 1995; Biassoni *et al.* 1996). KIR interagieren mit den $\alpha 1/\alpha 2$ -Domänen der Klasse-I-Moleküle, die auch für die Peptidbindung zuständig sind. Es wurde gezeigt, daß der Austausch von As in der Peptidbindungsgrube die Erkennung durch KIR beeinflussen kann (Cella *et al.* 1994; Biassoni *et al.* 1995; Mandelboim *et al.* 1997). Dies liegt vermutlich an der dadurch verursachten Veränderung des gebundenen Peptidrepertoires, denn die Erkennung der Klasse-I-Moleküle durch KIR kann auch vom gebundenen Peptid abhängen (Malnati *et al.* 1995; Peruzzi *et al.* 1996; Rajagopalan und Long 1997; Zappacosta *et al.* 1997). Der kurze cytoplasmatische Teil der aktivierenden Rezeptoren enthält keinerlei Sequenzmotive für die Signalübermittlung, allerdings ist allen gemeinsam eine geladene As im Transmembranbereich. Es muß also die Assoziation mit einer signalvermittelnden Untereinheit angenommen werden. Ein solches Molekül wurde kürzlich beschrieben: KAR-assoziiertes Protein (KARAP) DAP12, ein über eine Disulfidbrücke gekoppeltes 12 kDa Typ I membranständiges Homodimer, das eine negativ geladene As im Transmembranteil trägt (meist Asparaginsäure), mit der es mit der positiv geladenen As des KAR interagieren kann und ein ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation)-Motiv (YxxL - 7x - YxxL) im cytoplasmatischen Teil enthält, ist nicht-kovalent mit KAR assoziiert (Colonna 1998; Lanier *et al.* 1998b).

Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die bislang näher beschriebenen KIR mit bekannter Spezifität und die charakteristischen Merkmale dieser Rezeptoren.

Rezeptor	Expression	HLA-Ligand	Besonderheit	Referenz
NKAT1/p58.1 (CD158a) KIR2DL1	NK-Zellen, Subpopulation von T-Zellen	Cw2,4,5,6	zwei Ig-ähnliche Domänen, zwei ITIM-Motive, kritische As: Asn (77)/Lys (80)	(Moretta <i>et al.</i> 1993; Colonna und Samaridis 1995)
NKAT2/p58.2 (CD158b) KIR2DL3	NK-Zellen, Subpopulation von T-Zellen	Cw1,3,7,8	zwei Ig-ähnliche Domänen, zwei ITIM-Motive, kritische As: Ser (77)/Asn (80)	(Moretta <i>et al.</i> 1993; Colonna und Samaridis 1995)
NKAT3/p70/ NKB1 KIR3DL1	NK-Zellen, Subpopulation von T-Zellen	Bw4	drei Ig-ähnliche Domänen, zwei ITIM-Motive, kritische As: Ile (80), Arg (83)	(Cella <i>et al.</i> 1994; Litwin <i>et al.</i> 1994; D'Andrea <i>et al.</i> 1995)
NKAT4/p140 KIR3DL2	NK-Zellen, Subpopulation von T-Zellen	A*0301	drei Ig-ähnliche Domänen, zwei ITIM-Motive, Homodimer, kritische As: His (74)	(Döhning <i>et al.</i> 1996; Pende <i>et al.</i> 1996)
ILT2 (LIR1, MIR7, CD85)	kleine Gruppe von NK- und T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, vor allem auf B-Zellen	A-, B- und C-Allele, HLA-G	vier Ig-ähnliche Domänen, zwei ITIM-Paare	(Colonna <i>et al.</i> 1997; Cosman <i>et al.</i> 1997; Samaridis und Colonna 1997). (Fanger <i>et al.</i> 1998; Navarro <i>et al.</i> 1999; Vitale <i>et al.</i> 1999)
ILT4 (LIR2, MIR10)	selektiv auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, nicht aber auf NK-, T- und B-Zellen;	A-, B- und C-Allele, HLA-G	vier Ig-ähnliche Domänen, drei ITIM-Motive	(Borges <i>et al.</i> 1997; Colonna <i>et al.</i> 1998; Fanger <i>et al.</i> 1998)
p49 KIR2DL4	auf allen NK-Zellen und einer Subpopulation von T-Zellen	A-, B- und C-Allele, HLA-G	zwei Ig-ähnliche Domänen, ein ITIM-Motiv	(Cantoni <i>et al.</i> 1998b)

NKAT = NK-assoziiertes Transkript

Die Transfektion von HLA-G in HLA-negative lymphoblastoide Zelllinien schützte diese vor der Lyse durch deciduale NK-Zellen (Chumbley *et al.* 1994; Deniz *et al.* 1994). Welche Rezeptoren dafür verantwortlich sind, wurde z.T. widersprüchlich beschrieben: Pazmany *et al.* zeigten 1996 die Inhibition durch p58.1 und p58.2, Münz *et al.* 1997 durch p70 (Pazmany *et al.* 1996; Münz *et al.* 1997). Dies führte zunächst zu der Hypothese, daß HLA-G der allgemeine Ligand für KIR sei (Rouas-Freiss *et al.* 1997). Allerdings war die hier beobachtete Inhibition nicht vollständig, und es schien eine sehr hohe Expression von HLA-G erforderlich zu sein (Münz *et al.* 1997). So wurde vermutet, daß der eigentliche HLA-G-Rezeptor noch nicht gefunden sei. Andere Gruppen, die die Ergebnisse mit den KIR nicht reproduzieren konnten, zeigten die Erkennung von HLA-G durch den neu beschriebenen CD94/NKG2-Komplex (s.u.).

1.2.2.3 REZEPTOREN DER C-TYP LECTIN-SUPERFAMILIE: CD94/ NKG2

Die zweite Gruppe der inhibitorischen Rezeptoren umfaßt Heterodimere aus CD94, einem Transmembranmolekül, dessen extrazelluläre Domäne an MHC-Klasse-I-Moleküle binden kann, das aber keine intracytoplasmatische Domäne zur Signalübertragung besitzt, kovalent assoziiert mit einem Molekül der NKG2-Familie, das als Signalüberträger agiert (Lazetic *et al.* 1996). Wie KIR wird auch CD94 nicht nur auf NK-Zellen, sondern auch auf einer Gruppe von T-Zellen exprimiert (Aramburu *et al.* 1991). Der CD94-Rezeptorkomplex tritt ebenfalls in inibierender und aktivierender Form auf, abhängig davon, mit welchem Mitglied der NKG2-Familie er assoziiert ist: NKG2A und NKG2B haben zwei YxxL-Motive in ihrer cytoplasmatischen Domäne, übertragen also inhibitorische Signale (Brooks *et al.* 1997), NKG2C (bindet an HLA-E, assoziiert mit DAP12) (Lanier *et al.* 1998a) und NKG2E wirken aktivierend (Houchins *et al.* 1997; Cantoni *et al.* 1998a).

Die Klasse-I-Spezifität von CD94/NKG2 wurde, im Gegensatz zu den Ig-KIR, als sehr breit beschrieben, da die Lyse von Zielzellen inhibiert wurde, die mit den verschiedensten Klasse-I-Allelen transfiziert waren (A-, B- und C-Allele und HLA-G) (Sivori *et al.* 1996a; Sivori *et al.* 1996b; Pende *et al.* 1997; Perez-Villar *et al.* 1997).

NK-Zellen aus der Plazenta, aber auch aus dem peripheren Blut, waren nicht in der Lage, HLA-G positive Transfektanten zu töten. Deciduale NK-Zellen exprimieren stark CD94 (Verma *et al.* 1997), und die Inhibition erfolgte somit über CD94/NKG2, während die KIR keinen Einfluß hatten. So wurde dieser Rezeptor als der vorherrschende inhibitorische NK-Rezeptor für HLA-G auf decidualen NK-Zellen angenommen (Pende *et al.* 1997; Perez-Villar *et al.* 1997; Söderström *et al.* 1997). Allerdings war die Komplexität von CD94/NKG2-Partnern etwas überraschend, da einige verwandte HLA-A- und -B-Allele nicht erkannt wurden (Long 1998).

Erst kürzlich stellte sich heraus, daß der CD94/NKG2A-Rezeptor spezifisch für HLA-E ist (Braud *et al.* 1998; Lee *et al.* 1998b; Brooks *et al.* 1999). Die bislang zur Untersuchung der NK-Rezeptoren verwendeten Transfektanten wurden in der .221 Zelllinie hergestellt, die als Klasse I negativ galt, die aber HLA-E exprimiert. Durch Transfektion bestimmter Klasse-I-Moleküle (auch HLA-G) kann die Oberflächenexpression von HLA-E induziert werden, wenn die Peptide aus der Signalsequenz dieser Moleküle in der Lage sind, HLA-E zu binden und so seine Expression an der Zelloberfläche zu stabilisieren (Braud *et al.* 1997b; Borrego *et al.* 1998). Das Signalpeptid von HLA-E selbst sowie von einigen A- und B-Allelen bindet nicht an HLA-E. Obwohl also spezifisch für HLA-E, kann der CD94/NKG2A-Komplex anhand der gebundenen Signalpeptide der von der Zelle exprimierten Klasse-I-Moleküle deren "Gesundheitszustand" feststellen (Long 1998).

Das bedeutet, die kurzzeitig vermutete Funktion von HLA-G als allgemeiner Ligand für inhibitorische NK-Rezeptoren ist für den CD94/NKG2A-Rezeptor von HLA-E übernommen worden. Zugabe von Anti-CD94 und Anti-KIR Antikörpern stellt die Lyse der HLA-G-Transfektanten nicht in dem Maße wieder her wie die Zugabe von Anti-Klasse-I-Antikörpern bzw. hat in einigen NK-Klonen gar keinen Einfluß auf die Inhibition. Dies legte die Vermutung nahe, daß noch andere Rezeptoren existieren müssen, die HLA-G erkennen.

1.2.2.4 EINE NEUE GRUPPE VON REZEPTOREN MIT KLASSE-I-MOLEKÜLEN ALS LIGANDEN

KIR und CD94/NKG2 konnten die Klasse-I-Spezifität einiger NK-Klone nicht restlos erklären, weshalb die Existenz weiterer inhibitorischer Klasse-I-Rezeptoren vermutet werden mußte. Eine neue Gruppe, die kürzlich entdeckt wurde und die hierfür in Frage kommt, ist allerdings nicht auf NK-Zellen beschränkt, zeigt 31-39% Homologie mit KIR auf Proteinebene, ist ebenfalls auf Chromosom 19 lokalisiert und auch Mitglied der Ig-Familie (zwei oder vier Ig-ähnliche Domänen). Diese "Ig-like transcripts" (ILT) werden auch als LIR (leukocyte Ig-like receptors) oder MIR (monocyte/macrophage inhibitory receptors) bezeichnet (Borges *et al.* 1997; Samaridis und Colonna 1997; Wagtmann *et al.* 1997). Bis jetzt sind nur wenige Familienmitglieder näher charakterisiert (s. Tabelle 1 und Abb. 1.4). In dieser Gruppe finden sich auch Rezeptoren, die HLA-G erkennen (ILT-2, ILT-4).

Die Beschreibung neuer Rezeptoren, sowohl inhibierender als auch aktivierender, die Klasse-I-Moleküle als Liganden erkennen und die auf den verschiedensten Zelltypen exprimiert werden, reißt aber nicht ab und damit auch nicht die möglichen Effekte auf die Immunantwort, die auf diese Weise vermittelt werden können (Anumanthan *et al.* 1998; Torkar *et al.* 1998).

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Arbeitsvorhaben ließ sich in drei Bereiche untergliedern:

1) UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION UND REGULATION VON HLA-G UND DEN HLA-G ISOFORMEN

Dazu sollte zum einen die bereits begonnene Untersuchung an Hautbiopsien von Patienten mit unterschiedlichsten Diagnosen mit Hilfe von RT-PCR fortgeführt werden, mit dem Ziel, eine mögliche Korrelation eines bestimmten Expressionsmusters mit einer bestimmten Gruppe von Erkrankungen zu finden. Zum anderen sollten Gewebe, die, wie der Hauptexpressionsort von HLA-G, der Cytotrophoblast, eine normalerweise geringe Expression an Klasse-Ia-Molekülen aufweisen, auf HLA-G-Expression untersucht werden. Dazu sollten Material verschiedener Gehirnareale sowie Muskelbiopsien verwendet werden. Des Weiteren sollte der mögliche Einfluß von IFN γ auf die HLA-G-Expression an zwei Glioblastomzelllinien sowie Muskelzellen getestet werden.

2) HERSTELLUNG EINES KANINCHENANTISERUMS UND EINES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS

Da vor allem für die Untersuchung der HLA-G-Isoformen keine geeigneten Reagentien zur Verfügung standen, sollte ein Antiserum und/oder idealerweise ein monoklonaler Antikörper hergestellt werden. Dazu sollte zunächst die α 1-Domäne von HLA-G, die in allen bislang bekannten Isoformen enthalten ist, als rekombinantes Protein in Bakterien exprimiert und nach Aufreinigung über ein angefügtes Histidin-Epitop zur Immunisierung eines Kaninchens und von Mäusen verwendet werden. Das Kaninchenserum und die erhaltenen Hybridomüberstände sollten dann eingehend charakterisiert werden.

3) ETABLIERUNG VON TRANSFEKTANTEN DER HLA-G-ISOFORMEN, CHARAKTERISIERUNG UND FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN

Um die Effekte der einzelnen HLA-G-Isoformen untersuchen zu können, sollten diese in Klasse-Ia-negativen B-LCL exprimiert werden. Nach eingehender Charakterisierung stark exprimierender Klone sollten diese für funktionelle Untersuchungen verwendet werden.

3 MATERIAL

3.1 ABKÜRZUNGEN

(m)Ak	(monoklonaler) Antikörper
ABTS	2,2'-Azino-di[3-ethyl-benzthiazolinsulfonat(6)]
Amp	Ampicillin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
AS	Antiserum
ATCC	American Type Culture Collection
β -ME	β -Mercaptoethanol
β_2m	β_2 -Mikroglobulin
Bis	N, N'-Methylen-Bis-Acrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
CD	"cluster of differentiation antigens"
CDP-STAR™	Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-yl)phenyl phosphate
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl-phosphate
d	Desoxy-
dd	Didesoxy-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTAF	Dichlorotriazinyl-Aminofluoreszein
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
DTT	Dithiothreitol
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EMEM	Eagle's Minimal Essential Medium
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellscanner (Durchflußzytometer)
FCS	fötales Kälberserum
GT	Guanidiniumisothiocyanat
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HEPES	2,4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl-Ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	Meerrettichperoxidase

HT	Hypoxanthin-Thymidin
hu	human
IAA	Iodoacetamid
ICS	Interferon-Konsensussequenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILT	"Ig-like transcript"
IPTG	Isopropylthio- β -D-Galactosid
ITIM	"immune receptor tyrosine-based inhibition motif"
Kana	Kanamycin
KIR	"killer inhibitory receptor"
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren (non essential amino acids)
NK	natürliche Killer
NP-40	Nonidet P-40
PAA	Polyacrylamid
pASph	Protein-A-Sepharose
PBL	periphere Blut-Lymphozyten
PBS	Phosphat-Saline-Puffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RnaseA	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit nachfolgender PCR
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
TAP	"transporter associated with antigen processing"
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zellrezeptor
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
TPE	Tris-Phosphat-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
ün	über Nacht
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, wenn dies nicht möglich war, aus autoklavierten Stocklösungen hergestellt. Für Laufpuffer und Waschpuffer für die Immundetektion wurde autoklaviertes, demineralisiertes Wasser (H₂O_{demin.}) verwendet.

3.4 BIOPSIE-MATERIAL

Hautbiopsie-Material wurde freundlicherweise von Dr. Gerald Messer, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU-München zur Verfügung gestellt. Ein Teil der RNA aus den Biopsien war von Bernd Rehberger im Rahmen seiner Diplomarbeit isoliert worden.

Gewebe aus definierten Gehirnarealen wurde von Prof. Dr. Mehraein, Institut für Neuropathologie zur Verfügung gestellt; die RNA aus diesen Proben war von Astrid Cannich isoliert worden.

Myoblasten und cDNA von Muskelbiopsien wurden von Prof. Dr. R. Hohlfeld, Klinikum Großhadern, zur Verfügung gestellt.

3.5 ANTIKÖRPER

3.5.1 PRIMÄRE ANTIKÖRPER

Klon	Spezies	Spezifität	Isotyp	Referenz/Bezug
A1.4	Maus	α -Kette von Klasse I (auch denaturiert)	IgG2b	(Bushkin <i>et al.</i> 1986) United Biomedical Inc., Hauppauge, USA
TP25.99	Maus	α -Kette von Klasse I (auch denaturiert)	IgG	(Temponi <i>et al.</i> 1991; Tanabe <i>et al.</i> 1992) S. Ferrone, Buffalo, NY
B9.12.1	Maus	HLA-Klasse I	IgG2a	(Perarnau <i>et al.</i> 1988) Dr. F. Lemmonier, Marseille, Frankreich
W6/32	Maus	HLA-Klasse I	IgG2a	ATCC Hb95
87G	Maus	HLA-G	IgG2b	(Hara <i>et al.</i> 1996) D. Geraghty, Seattle, Washington, USA
4H84	Maus	HLA-G (alle Isoformen)	IgG1	(Crisa <i>et al.</i> 1997) M. McMaster, San Francisco, CA, USA
BFL.1	Maus	HLA-G	IgG2b	(Bensussan <i>et al.</i> 1995) P. Le Bouteiller, Toulouse, Frankreich
4E	Maus	HLA-B/C	IgG2a	Dr S. Y. Yang, Sloan Kettering, New York
BBM.1	Maus	hu β_2m	IgG2b	ATCC HB 28
HP-3B1	Maus	CD94	IgG2a	Immunotech, Marseille, Frankreich
Z199	Maus	CD94/NKG2A/B	IgG2b	(Sivori <i>et al.</i> 1996)
148.3	Maus	huTAP1		(Meyer <i>et al.</i> 1994) R. Tampé; Marburg
Maximilian	Maus	His-Epitop	IgG1	Connex GmbH, Martinsried
3D11	Maus	Faktor H		V. Koistinen, Helsinki, Finnland
MU3H4	Maus	HLA-DR	IgG2a	J. Johnson, München
UPC10/RPC5	Maus	Isotypkontrolle	IgG2a	ICN, Biomedicals Inc., Eschwege
MOP141	Maus	Isotypkontrolle	IgG2b	Sigma, Deisenhofen

3.5.2 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

alkalische Phosphatase gekoppelter Antikörper für Southern- und Northernblot

Schaf anti-Digoxigenin, Fab-Fragment, Boehringer Mannheim, Mannheim

alkalische Phosphatase gekoppelte Antikörper für Westernblot

Ziege anti-Maus IgG + IgM, Tropix/Serva, Heidelberg

Ziege anti-Kaninchen, Tropix/Serva, Heidelberg

Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper für ELISA

Kaninchen anti-hu β_2m , DAKO, Glostrup, Dänemark

Kaninchen anti-Maus IgG + IgM, Jackson/Dianova, Hamburg

Schwein anti-Kaninchen, DAKO, Glostrup, Dänemark

DTAF gekoppelte Antikörper für FACS

Ziege anti-Maus IgG, F(ab')₂-Fragment, Jackson/Dianova, HamburgZiege anti-Maus IgG + IgM, F(ab')₂-Fragment, Jackson/Dianova, Hamburg

3.6 BAKTERIENSTÄMME

3.6.1 BAKTERIEN FÜR DIE SUBKLONIERUNG

E. coli DH5αF'IQ F', φ80d/lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*, (*r_K*⁻, *m_K*⁺), *supE44*, λ⁻ *thi-1*, *gyrA96*, *relA1/F'*, *proAB*⁺, *lacI*^qZΔM15, *zzf*:Tn5 [Km^r]

Für die Transformation mit dem pQE30-Vektor.

E. coli DH5α F', φ80d/lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(*r_K*⁻, *m_K*⁺), *phoA*, *supE44*, λ⁻ *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

E. coli InfαF' F', *endA1*, *recA1*, *hsdR17*(*r_K*⁻, *m_K*⁺), *supE44*, λ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, φ80/lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)

Für die Transformation mit pCRTMII- und pCRTM2.1-Vektoren.

3.6.2 BAKTERIEN FÜR DIE EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE

BL21/pLysS *E. coli* B, F', *dcm*, *ompT*, *hsdS*(*r_B*⁻, *m_B*⁻), *gal*, λ(DE3), [pLysS Cam^r]

Für die Expression mit pRSetA.

M15 (Villarejo und Zabin 1974) NaI^s Str^s rif^s, *lac*⁻, *ara*⁻, *gal*⁻, *mtl*⁻, F', *recA*⁺, *uvr*⁺

Für die Expression mit pQE30. Enthält das pREP4-Plasmid mit *lacI* und benötigt 25 µg/ml Kanamycin für die Selektion (Farabaugh 1978).

3.7 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, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt. Für die Kultivierung von Transfektanten wurden dem Medium, wenn nicht anders angegeben, 0,4 mg/ml Hygromycin B zugegeben.

3.7.1 ZELLEN

721.221 (.221)	B-Zelllinie (keine HLA-A, -B, -C-Expression) (Shimizu <i>et al.</i> 1988)
721.45 (.45)	B-Zelllinie (HLA-A2, -B5, -Cw1; hemizygot) (DeMars <i>et al.</i> 1983) Frank Momburg, DKFZ, Heidelberg
721.174 (.174)	B-Zelllinie (HLA-A2, -B5, -Cw1; hemizygot; TAP-defizient) (DeMars <i>et al.</i> 1984) Frank Momburg, DKFZ, Heidelberg
K-562	chronisch myeloische Leukämiezelllinie (HLA-Klasse I negativ) ATCC CCL 243
LG2	lymphoblastoide B-Zelllinie (HLA-A2, -B27, -Cw1) (Institut für Immunologie der LMU München)
Olga	Zelllinie aus dem Internationalen HLA-Workshop 1990 IHW 90-71
T98G	humane Glioblastomzelllinie ECACC 92090213 (ATCC CRL 1690) EMEM mit 2 mM L-Glutamin, versetzt mit 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA), + 1 mM Natriumpyruvat, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
N59	humane Glioblastomzelllinie (Dr. Barbara Mayer, Klinikum Großhadern)
U-937	humane histiozytäre Lymphomzelllinie (A3, A26, B18, B51, Cw1, Cw3) ATCC CRL 1593
JEG-3	humane Choriocarcinomzelllinie ECACC 92120308 EMEM, wie T98G

X63	P3X63Ag8.653 Maus-Myelomzelllinie DSMZ ACC 43 (ATCC CRL 1580)
NKL	humane Killerzelllinie, CD94/NKG2A ⁺ , ILT2 ⁺ RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin mit 10% hitzeinaktiviertem humanem AB-Serum, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml IL-2 (Robertson <i>et al.</i> 1996) M. López-Botet, Servicio de Immunologia, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spanien

3.7.2 TRANSFEKTANTEN

Name	transfiziertes Gen
X63 hu β_2 m	15-kb <i>BamH</i> I/ <i>Sal</i> I-Fragment des humanen β_2 m-Gens (hu β_2 m) in pUC18 (Ulbrecht <i>et al.</i> 1992a)
X63B27	hu β_2 m + 6,3 kb <i>EcoR</i> I/ <i>BamH</i> I-Fragment des Cosmids cd2.6 in pTM (HLA-B*2705) (Ulbrecht <i>et al.</i> 1992b)
X63E	hu β_2 m + Cosmid cd3.14 (HLA-E*01033) (Ulbrecht <i>et al.</i> 1992a)
X63G	hu β_2 m + 5,4 kb <i>Hind</i> III-Fragment von HLA-G in Bluescript + phyg (COS-203 Vektor-Derivat) (Ulbrecht <i>et al.</i> 1998)
.221G	5,4 kb <i>Hind</i> III-Fragment von HLA-G in Bluescript + phyg
.221-Cw*0304	cDNA von Cw*0304 in pcDNA3.1 Hygro ⁺ , zur Verfügung gestellt von A. Brooks (Zappacosta <i>et al.</i> 1997)

3.8 OLIGONUKLEOTIDE

T_A gibt die in der PCR verwendete Annealingtemperatur an.

M13 revers 5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3'

M13 (-20) 5' -GTAAAACGACGGCCAG-3'

T_A = 52°C

SP-6 5' -CATACGATTTAGGTGACACTATAG-3'

T7 5' -TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'

T_A = 51°C

AMPLIFIKATION DER α 1-DOMÄNE

Ex2 5' 5' -cgGGaTCCCCTCCATGAGG-3'

Ex2 3' 5' -cgGAattCaGGCCTCGCTCTGGTTG-3'

Nicht zur Sequenz komplementäre Basen sind kleingeschrieben.

 $T_A = 46^\circ\text{C}$ AMPLIFIKATION EINER 3'UT-SONDE FÜR HLA-G (Onno *et al.* 1994)

GP5.U 5' -TGAAACAGCTGCCCTG-3'

GP3.U 5' -CCATCAATCTCTCTTGGGA-3'

 $T_A = 52^\circ\text{C}$

AMPLIFIKATION DER cDNA FÜR DIE HERSTELLUNG DER EXPRESSIONSKONSTRUKTE

G-5'UT 5' -ACTCATTCTCCCCAGACGC-3'

 α 1as 5' -GGGTCTGCAGGTTCACTTCTGTCA-3' α 1s 5' -TTGGGAAGAGGAGACACGGAACAC-3'

G-In4-2 5' -GCTCTGGGAAAGGAGGTGAA-3'

EX6/3'UT 5' -CAGCTGTTTTACATTGCAGCCTG-3'

 $T_A = 60^\circ\text{C}$ HLA-E α 3s 5' -CAGCATGAGGGGCTACCCG-3'

HLA-E 3'UT-5' 5' -GTGTGAGGAAGGGGTCATG-3'

 $T_A = 55^\circ\text{C}$ hu β -Actin #1485 5' -CCACACCTTCTACAATGAGC-3'hu β -Actin #2077 5' -CCTGGATAGCAACGTACATG-3' $T_A = 60^\circ\text{C}$

OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE OLIGOHYBRIDISIERUNG

G-In4 5' -TGCCTCCATCTCCCTCCTTAC-3'

G3-5 (G4) 5' -GAAGACTGCTCCGCGCGCT-3'

G2-3' (G2) 5' -GGGGGGTTGGCCTCGCT-3'

3.9 VEKTOREN, PLASMIDE, SONDEN, PEPTIDE, PROTEINE

3.9.1 VEKTOREN FÜR DIE SUBKLONIERUNG VON PCR-PRODUKTEN

pCRTMII und Nachfolgevektor pCRTM2.1 (Invitrogen, De Schelp, Niederlande)

Resistenz: Ampicillin, Kanamycin

3.9.2 VEKTOREN FÜR DIE EXPRESSIONSKLONIERUNG IN BAKTERIEN

pRSetA (Invitrogen, De Schelp, Niederlande)

pQE30 (Qiagen, Diagen GmbH, Hilden)

Resistenz: Ampicillin

3.9.3 VEKTOREN FÜR DIE EXPRESSION IN EUKARYONTEN

pREP7 (für die Klonierung von G1m, G1s, G2s, G3, G4) und pREP10 (für die Klonierung von G2m) (Invitrogen, De Schelp, Niederlande)

Resistenz: Ampicillin, Hygromycin

3.9.4 PLASMIDE

3.9.4.1 HLA-G-ISOFORMEN IN pCRTMII

Als Vorarbeit waren die im Labor bereits vorhandenen HLA-G Transfektanten 721.221G und X63G auf Expression der verschiedenen HLA-G Isoformen untersucht worden. Dazu wurde cDNA mit dem Primerpaar α 1s und Ex6/3'UT amplifiziert und in den pCRTMII-Vektor ligiert. Erhaltene Klone in den für die Isoformen erwarteten Größen wurden sequenziert, und es konnten alle bekannten HLA-G-Isoformen (G1m, G1s, G2m, G2s, G3, G4) in den beiden Transfektanten nachgewiesen werden.

3.9.4.2 KONSTRUKTE FÜR DIE EXPRESSION DER HLA-G α 1-DOMÄNE ALS REKOMBINANTES PROTEIN IN BAKTERIEN

Die Sequenz der α 1-Domäne wurde mit dem Primerpaar Ex2 5' und Ex2 3' aus einem bereits vorhandenen sequenzierten unvollständigen, in Exon 2 aber korrektem G1-cDNA-Klon amplifiziert. Die Oligonukleotide waren so gewählt, daß am 5'-Ende eine *Bam*H I-Schnittstelle und am

3'-Ende eine *EcoR* I-Schnittstelle sowie ein Stopcodon generiert wurden. Das erhaltene 281 bp große PCR-Produkt wurde in den pCRTMII-Vektor zwischenkloniert, erhaltene Kolonien nach Blau-Weiß-Selektion mittels PCR mit M13-Primern auf Insertion des Fragments überprüft, die Insertion sequenziert und die DNA eines korrekten Klons durch PEG-Minipräparation isoliert. Nach präparativem Verdau mit *EcoR* I und *BamH* I und Isolierung des Fragments aus dem Gel mit dem GeneClean Kit wurde es zunächst in den *EcoR* I/*BamH* I verdauten Expressionsvektor pRSetA kloniert. Durch die gewählte Klonierungsstrategie wurde das Fragment der α 1-Domäne so in diesen Vektor eingebaut, daß am N-terminus ein (His)₆-Anhang zur Aufreinigung eingefügt wurde. Um den korrekten Einbau zu bestätigen, wurden erhaltene Klone mit den Primern T7 und Ex2 3' sequenziert. Die Expression dieses Konstrukts in BL21/pLysS war aber wenig zufriedenstellend, deshalb wurde das Fragment durch Verdau mit *BamH* I und *Hind* III aus pRSetA ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des Expressionsvektors pQE30 umkloniert. Auch hier wurde eine (His)₆-Sequenz am 5'-Ende eingefügt.

3.9.4.3 HERSTELLUNG DER cDNA-KONSTRUKTE FÜR DIE TRANSFEKTION DER HLA-G-ISOFORMEN IN 721.221 UND K-562

G1m, G3: Mit dem Primerpaar 5'UT und Ex6/3'UT wurde cDNA der Transfektante .221G amplifiziert, die Amplifikate auf einem Agarosegel aufgetrennt, die Banden, die den Größen von G1m und G3 entsprachen, aus dem Gel isoliert, gereinigt, in den pCRTMII-Vektor kloniert und sequenziert. Von je einem korrekten Klon wurde Plasmid-DNA isoliert, mit *BamH* I und *Xho* I präparativ verdaut und das isolierte Fragment in den entsprechend geschnittenen Expressionsvektor pREP7 ligiert. Die Überprüfung der erhaltenen Klone erfolgte mittels PCR oder Restriktionsverdau.

G1s: Das Vorgehen erfolgte analog zu G1m, nur wurden die Primer 5'UT und In4-2 und cDNA der Transfektante X63MG verwendet.

G2m, G2s: Aus den Vorarbeiten standen zwei im 5'-Bereich unvollständige, sonst aber korrekte Klone (Primer α 1s+Ex6/3'UT) von G2m und G2s zur Verfügung. Amplifikate dieser Klone mit dem Primerpaar α 1s+Ex6/3'UT wurden über Glaswolle aus einem Agarosegel gereinigt und mit einem ebenfalls über Glaswolle gereinigten Amplifikat eines Volle-Länge G1m-Klons mit dem Primerpaar 5'UT/ α 1as in eine weitere PCR mit den Oligonukleotiden 5'UT+Ex6/3'UT (G2m) bzw. 5'UT/In4-2 (G2s) eingesetzt. Das so

erhaltene Amplifikat wurde in den Vektor pCRTM2.1 kloniert, erhaltene Klone sequenziert und jeweils ein korrekter Klon nach *Xho* I/*Bam*H I-Restriktion in die entsprechenden Schnittstellen des Expressionsvektors pREP7 (G2s) bzw. pREP10 (G2m) eingebaut. Die Überprüfung der hierbei erhaltenen Klone erfolgte mittels PCR und Restriktionsverdau.

G4: Ein aus der Vorarbeit erhaltener im 5'-Bereich unvollständiger G4-Klon (α 1s bis Ex6/3'UT) sowie ein Volle-Länge G1m-Klon, beide in pCRTMII in der gleichen Orientierung, wurden mit *Bss*H II verdaut, das am Ende von Exon 3 und im Kanamycingen des Vektors schneidet. Durch Ligation des 5'-Teils aus dem G1m-Klon mit dem 3'-Teil aus dem unvollständigen G4-Klon konnte so eine vollständige G4-cDNA erhalten werden, die dann mittels Restriktion mit *Xho* I und *Bam*H I aus dem Vektor pCRTMII ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des Expressionsvektors pREP7 eingebaut werden konnte.

3.9.5 SONDEN

3.9.5.1 SPEZIFISCHE SONDE FÜR HLA-B

Markierung 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.

3.9.5.2 SONDEN FÜR HLA-G

Sonde für die Überprüfung der Transfektanten und PCR-Blots:

Amplifikation der G4-cDNA aus dem G4-cDNA-Konstrukt mit den Primern G-5'UT und Ex6/3'UT.

HLA-G spezifische 3'UT-Sonde:

Amplifikation von cDNA der X63MG-Transfektante mit dem Primerpaar GP5.U und GP3.U.

3.9.6 PEPTIDE

Liganden für HLA-E aus den Signalsequenzen von B*0801 (B7₃₋₁₁) und HLA-G:

B7₃₋₁₁ VMAPRTVLL Dr. Arnold, Genzentrum

G₃₋₁₁ VMAPRTLFL Dr. Eulitz, GSF

Die Peptide wurden in einer Konzentration von 2,5 mM in DMSO gelöst.

3.9.7 PROTEINE

hu β_2 m-(His) Rekombinantes humanes β_2 m mit carboxyterminalem (His)-Anhang wurde freundlicherweise von Prof. Dr. R. Linke (MPI, Martinsried) zur Verfügung gestellt.

HLA-E_{sol} lösliches HLA-E sezerniert von rekombinanten *Drosophila Melanogaster*-Zellen (Ulbrecht *et al.* 1998)

CD94/NKG2A lösliches, Phycoerythrin-gekoppeltes CD94/NKG2A-Rezeptortetramer (Brooks *et al.* 1999)

4 METHODEN

4.1 ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN

4.1.1 REINIGUNG UND KONZENTRATION VON NUKLEINSÄUREN

4.1.1.1 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.

4.1.1.2 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 Vol. 100%igem Ethanol für mindestens eine halbe Stunde bei -80°C oder üN bei -20°C gefällt. Alternativ wurde die Fällung mit 0,6 Vol. Isopropanol durchgeführt, wobei die Inkubation in Kälte unterblieb. Nach Zentrifugation wurde das Präzipitat zweimal mit 70% Ethanol zur Entfernung der Salze gewaschen, kurz luftgetrocknet, bis der restliche Alkohol sich verflüchtigt hatte, und schließlich in H_2O oder TE gelöst.

4.1.1.3 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 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA und 30 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotiden.

4.1.2 ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

4.1.2.1 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 Vol. Isopropanol gefällt. Mit einer umgeschmolzenen Pasteurpipette konnte die fadenförmig ausfallende DNA gefischt, mit 70% Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und schließlich in H₂O gelöst werden.

4.1.2.2 PLASMIDISOLIERUNG

4.1.2.2.1 SCHNELLE PLASMIDISOLIERUNG (Chowdhury 1991)

Zur raschen Überprüfung einer größeren Anzahl von Transformanten auf erfolgreiche Insertion mittels Restriktionsverdau empfiehlt sich diese Art der Plasmidpräparation im kleinen Maßstab. Dazu wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit demselben Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) eine Minute 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 µl TER (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, 20 mg/ml RNase A) gelöst. 5 bis 10 µl dieser DNA konnten dann in den Restriktionsverdau eingesetzt werden.

4.1.2.2.2 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. Für die Präparation im Mini-Maßstab wurden bis zu 5 ml einer üN-Kultur zentrifugiert, das Sediment in 200 µl GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert, mit 300 µl frisch angesetztem 0,2 N NaOH/1% SDS lysiert und 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zu-

gabe von 300 µl 3,0 M Kalium-Acetat pH 4,8 wurde die Lösung neutralisiert und erneut 5 min auf Eis inkubiert, anschließend 10 min bei RT zentrifugiert und nach Zugabe von RNase A (Endkonzentration 20 µg/ml) 20 min bei 37°C inkubiert. Nach zwei Extraktionsschritten mit jeweils 400 µl Chloroform folgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und sofortige Zentrifugation für 10 min bei RT. Die DNA wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet, in 32 µl H₂O gelöst und durch Zugabe von 8 µl 4 M NaCl und 40 µl 13% PEG₈₀₀₀, Inkubation auf Eis für 20 min und Zentrifugation bei 4°C für 15 min ein zweites Mal gefällt.

Für die Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden 50 ml üN-Kultur eingesetzt, die Mengen der eingesetzten Lösungen um den Faktor 10 erhöht und die Inkubationszeiten beibehalten.

4.1.2.2.3 PLASMIDISOLIERUNG MIT DEM NUCLEOSPIN KIT

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

4.1.2.3 ISOLIERUNG VON RNA (Chomczynski und Sacchi 1987)

Bis zu 1×10^7 Zellen wurden in 500 µl Lösung D (4 M Guanidinium-Thiocyanat, 25 mM Na-Citrat, pH 7,0, 0,5% Sarcosyl, 0,75% β-Mercaptoethanol) resuspendiert, mit 50 µl 2 M Na-Acetat, pH 4,0, 500 µl wassergesättigtem Phenol und 100 µl 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 µl Isopropanol gemischt und für mindestens 1,5 h bei -20°C präzipitiert. Das Sediment wurde in 300 µl Lösung D aufgenommen, mit 300 µl Isopropanol ein zweites Mal gefällt, schließlich mit 70% Ethanol gewaschen und in DEPC-behandeltem H₂O (1% DEPC, Inkubation bei 37°C für > 2h, anschließend autoklavieren) gelöst.

Für die Isolierung von RNA aus Gewebestückchen wurden diese unaufgetaut in Lösung D gegeben und mit dem Ultra-Turrax zerkleinert. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben beschriebenen.

4.1.3 ENZYMATISCHE REAKTIONEN MIT NUKLEINSÄUREN

4.1.3.1 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 μl und das eingesetzte Volumen des Enzyms von $\frac{1}{10}$ des Reaktionsansatzes nicht überschritten wurden. Die Vollständigkeit des Verdauens (1 U Restriktionsenzym soll 1 μg DNA pro Stunde verdauen) wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Für *BamH I/Xho I*-Doppelrestriktionen wurde der Puffer Blue von AGS (AGS, Heidelberg) mit Zusatz von 1 mM DTT verwendet.

4.1.3.2 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- μl -Reaktionsansatz enthielt die DNA-Matrize (50-200 ng genomischer DNA, 1-5 ng Plasmid oder 1 μl cDNA), 1x PCR-Puffer, 1-4 mM MgCl_2 , 0,2 mM jedes dNTP, 10-50 ng jedes Primers und 0,5-1 U Taq-DNA-Polymerase (AmpliTaq[®] DNA Polymerase, Perkin Elmer, Weiterstadt; Qiagen/Diagen GmbH, Hilden). Verwendete PCR-Puffer waren 10x PCR-Puffer von Perkin Elmer ohne MgCl_2 oder mit 15 mM MgCl_2 oder 10x PCR-Puffer von Qiagen mit 15 mM MgCl_2 .

Die erforderlichen Primer- und MgCl_2 -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)

$$T_M: 69,3^\circ\text{C} + 0,41 \times (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650/\text{Primerlänge}$$

$$T_A = T_M + 3^\circ\text{C}$$

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). Bei Verwendung des alten Hybaid-Gerätes ohne Deckelheizung mußten die Ansätze mit 18 μl Mineralöl überschichtet und die Zeiten verlängert werden):

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

4.1.3.3 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 Superscript™ Reverse Transkriptase (GIBCO BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland), später mit Expand™ Reverse Transkriptase (Boehringer Mannheim), jeweils nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.1.3.4 REINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN

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

4.1.3.5 KLONIERUNG VON PCR-PRODUKTEN

Die Subklonierung von PCR-Produkten erfolgte mit dem TA Cloning® Kit von Invitrogen (Invitrogen, De Schelp, Niederlande) in den Vektor pCR™II bzw. den Nachfolgevektor pCR™2.1 nach den Angaben des Herstellers.

4.1.3.6 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 die Kolonie von der Platte entnommen, in 100 µl H₂O gründlich resuspendiert und 1 µl dieser Suspension in eine Standard-PCR eingesetzt. Lediglich die Anfangsdenaturierung mußte auf 10 min verlängert werden, um die Bakterienwand zu zerstören.

4.1.3.7 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 [2 mM dATP, dCTP, dGTP, 1,3 mM dTTP, 0,7 mM Dig-11-dUTP (Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphat, Alkali-labil, Boehringer Mannheim)] ersetzt und die Extensionszeit verlängert.

4.1.4 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- μ l-PCR-Ansatz nach Zugabe von 80 μ l H₂O in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit 10 μ l 2 M Natriumacetat, pH 4,0 und 300 μ l 100% Ethanol gründlich gemischt, 10 min auf Eis inkubiert, 10 min auf RT 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 Holdorf auf einem ABI 373A-Sequenzierer (abi, Applied Biosystems, Perkin Elmer, Weiterstadt) gefahren, die Auswertung der Sequenzen erfolgte durch mich mit dem dazugehörigen Programm SeqEd™675.

4.1.5 GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN

4.1.5.1 AUFTRENNUNG VON DNA AUF AGAROSEGELEN

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wurden horizontale, nicht-denaturierende Agarosegele verwendet, wobei die eingesetzte Agarosekonzentration nach den Fragmentgrößen gewählt wurde. Der Gellauf erfolgte in 1x TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) mit Ethidiumbromid, die Proben wurden mit 6x Auftragspuffer (15% Ficoll 400, 0,25% Bromphenolblau/Xylencyanol FF oder 0,25% Orange G, in TE 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 Volt, die Laufdauer richtete sich nach dem erforderlichen Trennungseffekt. Nach dem Lauf konnten die Gele bei 312 nm im UV-Durchlicht mit Rotfilter fotografiert werden.

Bei der Auftrennung genomischer DNA für Southernblots wurde 1× TPE-Puffer (36 mM Tris, 30 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA) für den Gellauf benutzt, der Lauf erfolgte bei 30 Volt üN.

4.1.5.2 SOUTHERNBLOT

Im Anschluß an die Elektrophorese wurde die DNA im Gel zunächst 30-45 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl denaturiert (dem Transfer von Fragmenten >5 kb ging ein 15minütiger Waschschrift in 0,25 N HCl voraus). Der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham) erfolgte mittels Kapillarblot mit 0,4 N NaOH für 2 h (PCR-Produkte) oder über Nacht (genomische DNA). Für Mehrfachabzüge bei PCR-Amplifikaten wurde die erste Membran für 20 min aufgelegt, zwei weitere für jeweils 10 min und die letzte üN. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Neutralisierung in 2× SSC geschwenkt, luftgetrocknet und 2 h zur Fixierung der DNA bei 80°C gebacken.

4.1.5.3 AUFTRENNUNG VON PCR-PRODUKTEN IN EINEM POLYACRYLAMIDGEL

Da die Silberfärbung von Polyacrylamidgelen (PAA-Gelen) eine größere Sensitivität liefert als die Ethidiumbromidfärbung von Agarosegelen, wurden schwer nachzuweisende PCR-Produkte auf 8% PAA-Gelen mit 1× TBE als Laufpuffer aufgetrennt. Dazu wurden 26,4 ml Acrylamidstocklösung (Acrylamid/Bis 29:1) mit 63,1 ml H_2O , 10 ml 10× TBE-Puffer, 75 µl TEMED und 0,5 µl 10% Ammoniumpersulfat gemischt und ein 16×18 cm vertikales Gel gegossen. Nach mind. 30 min Polymerisation und einem Vorlauf von 15 bis 60 min bei 200 Volt konnten die mit Auftragspuffer versetzten Proben aufgetragen werden. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte üN bei 150 Volt.

4.1.5.4 SILBERFÄRBUNG VON POLYACRYLAMIDGELEN

Nach Fixierung des Gels für mindestens 2× 3 min in Fixierlösung (10% technischer Ethanol, 0,5% Essigsäure) wurde es 10 min in 0,1% AgNO_3 bewegt, 2-3× mit H_2O gespült und anschließend in frisch angesetztem Entwickler (1,5% NaOH, 0,01% NaBH_4 , 0,4% Formaldehyd in H_2O) geschwenkt, bis die gewünschte Farbtintensität der Banden auftrat. Das Abstoppen der Farbreaktion erfolgte mit 7,5% Na_2CO_3 .

4.1.5.5 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 (50% Ficoll, 1 mM EDTA, pH 8, 0,4% Bromphenolblau, 0,4% Xylencyanol FF) versetzt und aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 1-2 V/cm.

4.1.5.6 NORTHERNBLOT

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

4.1.6 HYBRIDISIERUNG MIT DIGOXIGENIN-MARKIERTEN SONDEN UND DETEKTION

(Engler-Blum *et al.* 1993)

4.1.6.1 HYBRIDISIERUNG MIT DIGOXIGENIN-MARKIERTEN DNA-SONDEN UND DETEKTION

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 eine Stunde im Wasserbad bei 68°C äquilibriert. Danach wurde die Prähybridisierungslösung durch die Hybridisierungslösung (pro 100 cm² Membran 10 ml Prähybridisierungslösung mit 2,5 ng/ml denaturierter Sonde für Southernblots, 10 ng/ml für Northernblots) ersetzt und bei 68°C im Schüttelwasserbad über Nacht inkubiert. Nach 3x 20minütigem stringentem 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 Stunde. Anschließend wurde die Membran für 30 min in Konjugatpuffer (α-DIG-AP 1:15.000 in Blockpuffer) in-

kubiert, 4x 10 Minuten 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 (CSPD bzw. CDP* 2,5mM in Substratpuffer) bedeckt. Danach wurde der Filter in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm aufgelegt.

4.1.6.2 HYBRIDISIERUNG MIT DIGOXIGENIN-MARKIERTEN OLIGONUKLEOTIDEN

Die Markierung und Überprüfung der verwendeten Oligonukleotide erfolgte mit dem DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit (Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers.

Die Membranen wurden 30 min in Blockierungslösung (4x SSC, 1% Blocking Reagens, 0,1% Laurylsarcosin) und danach 30 min in Prähybridisierungslösung (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,1% SDS, 3 M TMAC, 2 mM EDTA) geschwenkt. Die Hybridisierung erfolgte mit 7,5 pmol markiertem Oligonukleotid/ml Prähybridisierungslösung für 60 min. Die Temperatur für Blockierung, Prähybridisierung und Hybridisierung betrug dabei 50°C. Überschüssige und unspezifisch gebundene Sonde wurde durch zweimaliges zehnmütiges Schwenken bei RT in Waschlösung A (2x SSC, 0,1% SDS) und anschließendes 15minütiges stringentes Waschen in vorgewärmter Prähybridisierungslösung bei der für jedes Oligonukleotid spezifisch ausgetesteten Temperatur entfernt (G2-3': 55°C; G3-5 und G-In4-2: 57°C).

Sollte die Membran mit einer weiteren Sonde hybridisiert werden, so wurde sie einem Dehybridisierungsschritt zur Entfernung der alten Sonde unterzogen, der aus jeweils 30 min Inkubation bei 50°C in 0,4 M NaOH und in Dehybridisierungslösung (200 mM Tris, pH 7,5, 0,1x SSC, 0,5% SDS) und 10minütigem Waschen in 3x SSC bei RT bestand.

Die Detektion erfolgte wie unter 4.1.6.1 beschrieben ab dem 5minütigen Waschschrift in Waschpuffer.

4.1.7 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

4.1.7.1 ZENTRIFUGATION DURCH GLASWOLLE

Das zu isolierende Fragment wurde unter UV-Licht möglichst knapp ausgeschnitten, durch Glaswolle zentrifugiert, einer Phenolextraktion und einer anschließenden Chloroformextraktion unterzogen, mit 2 Vol. 100% Ethanol in Kälte gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich nach kurzem Lufttrocknen in H₂O gelöst. Die Konzentration wurde durch Auftrag

eines Aliquots auf ein Agarosegel und Vergleich mit dem Molekulargewichtsstandard bestimmt.

4.1.7.2 ISOLIERUNG MITTELS GLASMILCH

Diese Art der Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem GENE CLEAN II Kit (BIO 101 Inc., La Jolla, Ca) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

4.1.8 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 1:1 oder 2:1 eingesetzt. Die Berechnung der eingesetzten Fragmentmenge erfolgte dabei nach folgender Formel:

$$\text{Fragmentlänge (ng)} = \frac{\text{Fragmentlänge (bp)} \times 50 \text{ ng Vektor}}{\text{Vektor (bp)}}$$

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 üN bei 14-16°C.

4.2 ARBEITEN MIT BAKTERIEN

4.2.1 LAGERUNG

Bakterien in Flüssigkulturen oder auf Agarplatten können für mehrere Tage bei 4°C gelagert werden. Für die Langzeitlagerung erfolgte der Zusatz von 20% autoklaviertem Glycerol zur Bakteriensuspension und die Verwahrung bei -80°C.

4.2.2 KOMPETENZINDUKTION VON BAKTERIEN MIT CaCl_2 (Tang *et al.* 1994)

Eine Einzelkolonie wurde über Nacht in 5 ml LB-Medium (1% Pepton 140, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7,4) angeschüttelt und anschließend 1:100 in 50 ml 37°C warmem LB-Medium verdünnt. Diese Bakteriensuspension wurde bis zu einer OD_{600} von 0,9 angeschüttelt, auf Eis gekühlt und 3x mit 5 ml eiskalter 80 mM CaCl_2 /50 mM MgCl_2 -Lösung gewaschen, wobei zwischen den Waschschritten 10 min auf Eis inkubiert wurde. Danach wurde das Bakteriensediment in 2 ml eiskalter 0,1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert und mit 1 Volumen eiskaltem 50 %igem Glycerol versetzt. Pro Transformationsansatz wurden 100 μl eingesetzt, Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

4.2.3 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 eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 37°C für 5 min, dann wurde der Ansatz sofort für eine Minute 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 MgCl_2) versetzt und anschließend eine halbe Stunde 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 Blau-Weiß-Selektion bei Transformationen in $\text{Inf}\alpha\text{F}'$ aus dem TA Cloning Kit wurden auf den Platten außerdem 40 μl X-Gal (Stocklösung 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 mußten diese zunächst 2x mit PBS (139,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen werden. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,05% Trypsin/1mM 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), 3 bis 6x 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 mußten diese rasch auf 37°C erwärmt, einmal mit Medium gewaschen und in eine geeignete Flasche überführt werden.

4.3.2 HERSTELLUNG VON HYBRIDOMEN

4.3.2.1 GEWINNUNG VON ZELLEN FÜR DIE KULTIVIERUNG VON FEEDERLAYER FÜR HYBRIDOME

Für die Kultivierung der Hybridome wurde ein Teil der Zellen auf Feederlayer ausgesät, die aus zwei Mäusen gewonnen wurden, die andere Hälfte der Hybridome wurde mit IL-6 versorgt. Am Tag vor der Herstellung der Hybridome wurden die Bauchhöhlen toter Mäuse geöffnet und pro Maus mit 15-20 ml eiskaltem PBS gespült. Die so erhaltenen Zellen wurden in einem eisgekühlten 50-ml-Röhrchen bei 4°C zentrifugiert und in 45 ml HAT-Medium (DMEM, 10% konditioniertes sterilfiltriertes Medium von konfluenten X63-Zellen, 10% FCS, 1x HAT, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 1 mM Na-Pyruvat, 1% NEAA) aufgenommen. Pro Vertiefung einer 96-fM-Platte wurden 150 µl dieser Zellsuspension ausgesät.

4.3.2.2 FUSION VON ZELLEN ZUR GENERIERUNG VON HYBRIDOMEN

Die Milz der Maus wurde entnommen, in vier Stücke zerkleinert und mit 15 ml auf 37°C vorgewärmtem RPMI/20% FCS in einen Potter gegeben. Nach Freisetzung der Zellen aus dem Gewebeverband durch 5 Hübe mit dem Pistill (R) und kurzem Stehenlassen zum Absetzen der restlichen Klumpen wurde die Zellsuspension bei RT zentrifugiert (5 min, 228 g), das Sediment 1x mit Medium gewaschen, in 4 ml Medium aufgenommen und ein Aliquot zum Zählen entnommen. Die Hälfte der Zellen wurde in zwei Aliquots für eine eventuelle weitere Fusion lebend weggefroren, die restlichen 2 ml ($5,8 \times 10^7$ Zellen) in die Fusion eingesetzt. Dazu wurden die Milzzellen im Verhältnis 2:1 mit X63-Zellen gemischt, 5 min bei 228 g sedimentiert und das Zellsediment leicht aufgeklopft. Unter leichtem Schütteln im 37°C Wasserbad wurde zunächst während 1 min 1 ml vorgewärmtes PEG tropfenweise zugegeben und nach 2 min Inkubation bei 37°C 10 ml DMEM innerhalb von 5 min langsam zugetropft, wobei das Röhrchen wieder leicht im 37°C Wasserbad geschwenkt wurde. Weitere 10 ml DMEM wurden etwas rascher untergerührt, bis das PEG mit dem Medium vollständig gemischt war. Nach Zentrifugation bei 272 g für 5 min wurde 10 min bei RT inkubiert, der Überstand abgesaugt, das Sediment leicht aufgeklopft und vorsichtig in 4 ml DMEM/10% FCS resuspendiert. Unter dem Mikroskop konnte nun der Fusionserfolg begutachtet werden. Eine Hälfte der Zellen wurde lebend weggefroren, der Rest in 50 ml HAT-Medium (77% DMEM, 10% konditioniertes Medium von X63-Zellen, 10% FCS, 2% HAT, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 1% NEAA) aufgenommen und ausgesät: je 100 µl/Vertiefung auf die Platten mit den Feederlayer, je 100 µl/Vertiefung auf 3 weitere 96-fM-Platten, wobei hier pro Vertiefung noch 100 µl HAT-Medium mit IL-6 (300 U/ml Endkonzentration) zugegeben wurde. Die Platten wurden anschließend in Frischhaltefolie gewickelt und im Brutschrank inkubiert.

Nach 1 Woche wurden die Zellen gefüttert, indem die Hälfte des Mediums abgesaugt und durch frisches ersetzt wurde. Überstand aus Vertiefungen, die bereits gut bewachsen waren, wurde verwahrt. Später wurde von HAT- auf HT-Medium (Zusammensetzung wie oben, nur 2% HT statt HAT) ohne zusätzliche Zugabe von konditioniertem Medium umgestellt.

4.3.3 TRANSFEKTION VON EUKARYONTISCHEN ZELLEN MITTELS ELEKTROPORATION

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in frischem Medium ausgesät (1×10^5 /ml), danach gezählt, einmal mit Medium gewaschen und auf $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden pro Transfektionsansatz Aliquots von 200 µl (5×10^6 Zellen) in eine Küvette mit 2 mm Elektrodenabstand transferiert, mit 20 µg der zu transfizierenden DNA (Konzentration 2 µg/µl) versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Der Elektroschock erfolgte für

721.221-Zellen bei 105 V, 72 Ω und 1700 μF , für K-562-Zellen bei 300 V, 13 Ω und 500 μF in einem Electro Cell Manipulator (BTX, San Diego, USA). Nach erneuter 10minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen in 6 ml Vollmedium in eine T25-Flasche überführt. 24 h (721.221) bzw. 48 h (K-562) später wurden die Zellen in einer Konzentration von $1\text{-}3 \times 10^4$ /Vertiefung in Selektionsmedium (0,4 mg/ml Hygromycin) auf 96-fM-Platten ausgesät. Nach etwa 2 Wochen konnten einzelne Klone in 24M-Platten überführt werden und, nachdem sie dort dicht genug gewachsen waren, entweder per Immunfluoreszenz (G1m) oder per ELISA (G1s) auf Expression untersucht oder in T25-Flaschen überführt werden, bis genug Zellen für die RNA-Isolierung vorhanden waren.

4.3.4 STIMULATION VON ZELLEN MIT CYTOKINEN

Für die Stimulation von Zellen mit $\text{IFN}\gamma$, IL-4 und IL-6 wurden diese am Tag vorher zu 5×10^6 Zellen pro 75 cm^2 -Flasche frisch ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium durch frisches Medium mit dem entsprechenden Cytokin in einer Konzentration von 500 U/ml ersetzt, ein gleicher Ansatz ohne Cytokin wurde als Kontrolle mitgeführt. Die Stimulation erfolgte meist für 48 h, da für diesen Zeitpunkt für $\text{IFN}\gamma$ -Behandlung die maximale Erhöhung für HLA-G in U-937-Zellen beschrieben ist (Yang *et al.* 1996).

4.3.5 INDUKTION DER OBERFLÄCHENEXPRESSION VON HLA-E DURCH INKUBATION BEI 26°C UND/ODER MIT PEPTID UND CYTOTOXIZITÄTSVERSUCH

Die Inkubation von Zellen bei 26°C erfolgte üN im Brutschrank ohne CO_2 -Begasung; deswegen wurde als Medium RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und den üblichen Zusätzen verwendet. Sollten die Zellen nur für die Immunfluoreszenz verwendet werden, wurden 2×10^5 Zellen pro Vertiefung auf einer 96rM-Platte ausgesät, bei Einsatz im Cytotoxizitätsversuch wurden 1×10^6 Zellen pro ml Medium in sterilen Röhrchen inkubiert und am folgenden Tag 50 μl der Zellsuspension pro Ak für die Immunfluoreszenz entnommen. Der Rest der Zellen wurde für die radioaktiven Cytotoxizitätsversuche verwendet, die von Dr. Matthias Ulbrecht wie beschrieben durchgeführt wurden (Ulbrecht *et al.* 2000). Für die Stabilisierung von HLA-E mit Peptid wurden 1×10^5 Zellen in 100 μl Medium mit dem in DMSO gelösten Peptid versetzt (Endkonzentration 100 μM oder 300 μM). Als Kontrollen wurden Zellen nur mit der entsprechenden Menge an DMSO mitgeführt.

4.3.6 INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ

Je Loch einer 96rM-Platte wurden $1-2 \times 10^5$ Zellen mit 150 μ l PBS/FCS (10% FCS, 0,1% Na-Azid; alternativ auch 4% BSA, 0,1% Na-Azid in PBS) gewaschen (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-konjugiertem sekundärem Antikörper 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. Alternativ wurden die Zellen vital gefärbt und dazu in 5 μ g/ml Propidiumiodid (PI)/PBS resuspendiert.

Im FACScan[®] Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) wurden 5.000-10.000 vitale Zellen aufgenommen, die in einem für die Zellsorte charakteristischen, durch Vorwärts- und Seitwärtsstreuung bestimmten Bereich ("gate") lagen. Gemessen wurde die Intensität der Grünfärbung (Fluoreszenz 1). Bei PI-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 1 (x-Achse) aufgetragen ist.

4.3.7 SORTIEREN VON ZELLEN

Zum Sortieren von 721.221 G1m-Transfektanten auf Zellen mit starker HLA-G-Expression wurde eine FACS-Färbung an $1,5 \times 10^7$ Zellen mit W6/32-Hybridomüberstand durchgeführt, wobei alle verwendeten Lösungen azidfrei verwendet wurden, und bei Frau Dr. Heike Pohla (Institut für Tumorummunologie) am FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) sortiert.

4.3.8 ISOLIERUNG VON PERIPHEREN BLUTLYMPHOZYTEN (PBL)

Je vier ml Ficoll wurden in ein 15-ml-Röhrchen gegeben, vorsichtig mit 8 ml Heparinblut, das zuvor 1:1 mit PBS verdünnt worden war, überschichtet und 20 min bei 1200 g und ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Die zellhaltige Intermediärphase wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und 2x mit PBS gewaschen (10 min, 300 g; 10 min 200 g). Das Zellsediment konnte dann in PBS aufgenommen und ein Aliquot der Zellen zum Zählen entnommen werden.

4.4 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

4.4.1 AUFREINIGUNG EINES REKOMBINANTEN PROTEINS MITTELS AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

4.4.1.1 INDUKTION UND REINIGUNG IM KLEINEN MAßSTAB ("BATCH-METHODE")

Um festzustellen, welche der erhaltenen Bakterienklone am besten induzierbar sind und um die günstigsten Bedingungen für die Reinigung auszutesten, wurde dies zunächst im kleinen Maßstab durchgeführt. Einzelne Kolonien wurden in 1,5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin üN angeschüttelt, dann mit 8,5 ml vorgewärmtem Medium verdünnt, auf zwei Aliquots verteilt (ein Aliquot diente als uninduzierte Kontrolle) und 30 min bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,7 bis 0,9 geschüttelt. Durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 2 mM) wurde die Expression induziert. Um die effektivste Inkubationsdauer herauszufinden, wurden in 1stündigen Abständen (1-7 h und üN) 600-µl-Aliquots entnommen und auf einem SDS-PAA-Gel getestet. Die beste Induktion lag zwischen 5 und 6 h. Die Reinigung wurde mit einem Zellsediment aus 3 ml induzierten Bakterien und Ni-NTA-Resin (Qiagen) als "batch-Methode" ausgetestet: Das Sediment wurde in 600 µl 8 M Harnstoffpuffer (8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 8,0) lysiert, 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit 60 µl Ni-NTA-Resin, das vorher 3x mit 500 µl des Harnstoffpuffers gewaschen worden war, versetzt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde 10s bei höchster Drehzahl in der Mikroliterzentrifuge zentrifugiert, das Sediment 3x mit 1 ml 8 M Harnstoffpuffer pH 7,0 gewaschen und das Protein mit 100 µl Harnstoffpuffer/100 mM EDTA eluiert. Der Auftrag dieses Eluats auf ein SDS-PAA-Gel zeigte eine sehr effiziente Reinigung ohne kontaminierende Fremdproteine, so daß das Testen weiterer Waschschrte unterblieb.

4.4.1.2 BELADUNG DER SÄULE MIT NICKEL UND REGENERATION DER SÄULE

Das in 50 mM EDTA gelagerte Säulenmaterial (Chelating Sepharose Fast Flow, Pharmacia, Freiburg) wurde in eine 10-ml-Säule gefüllt, mit 10 Säulenvolumen H₂O gewaschen und mit 10 Säulenvolumen 1% NiCl₂-Lösung beladen. Überschüssiges NiCl₂ wurde durch erneutes Waschen mit 10 Säulenvolumen H₂O entfernt und die Säule schließlich mit 10 Säulenvolumen 8 M Harnstoffpuffer (8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 8,0) äquilibriert.

4.4.1.3 INDUKTION UND REINIGUNG IM GROßEN MAßSTAB (10-ml-SÄULE)

500 ml einer üN-Kultur wurden mit 5 l auf 37°C vorgewärmtem LB (25 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Ampicillin) verdünnt und 1 h bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,9 geschüttelt. Aliquots als uninduzierte Kontrollen wurden entnommen (600 µl Bakteriensuspension zentrifugieren, Sediment in 30 µl 1x red. SDS-Probenpuffer aufnehmen und bei -20°C verwahren) und anschließend die Expression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 2 mM induziert. Nach 5,5 h wurden Aliquots für die induzierten Kontrollen entnommen und die Bakteriensuspension bei 4°C und 10.000 rpm 7 min abzentrifugiert (Heraeus, Suprafuge 20). Das Sediment wurde in insgesamt 150 ml 8 M Harnstoffpuffer (8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 8,0) vollständig resuspendiert, im Eisbad 30 min mit Ultraschall beschallt und bei 4°C und 16.000 rpm 75 min zentrifugiert (Heraeus, Suprafuge 20). Aliquots wurden als Kontrolle entnommen und der Rest bei 4°C verwahrt.

Die mit 8 M Harnstoffpuffer äquilibrierte Säule wurde mit dem Lysat beladen, der Effluent verwahrt. Der Einsatz von Lysat aus 5 l Bakterienkultur sollte durch die völlige Überladung der Säule für geringere Mengen unspezifisch bindender Proteine sorgen. Anschließend wurde die Säule mit 8 M Harnstoffpuffer pH 7,0 gewaschen bis zu einer OD₂₈₀ von < 0,02. Die Elution erfolgte mit 8 M Harnstoffpuffer pH 4,5, wobei jeweils 10-ml-Fractionen aufgefangen und die OD₂₈₀ bestimmt wurde. Aliquots der erhaltenen Fractionen wurden auf einem Polyacrylamidgel getestet. Es zeigte sich, daß die Entfernung unspezifischer Proteine noch nicht ausreichend gelungen war, und deshalb wurden die erhaltenen Eluate ein zweites Mal über die Säule gereinigt, wobei ein weiterer Waschschrift bei niedrigerem pH-Wert (pH 6,3) eingefügt wurde. Wieder wurden Aliquots der gesammelten Fractionen auf einem Polyacrylamidgel getestet, und es zeigte sich, daß die Menge an unerwünschten Proteinen durch diesen zweiten Reinigungsschrift verringert worden war.

4.4.2 HERSTELLUNG VON ZELL-LYSATEN

Anfangs waren Zellsedimente in 1x reduzierendem SDS-Auftragspuffer resuspendiert, bei 95°C 10 min aufgekocht und nach 10 min Zentrifugation aufgetragen worden. Bessere Ergebnisse wurden aber später mit der Herstellung von Zelllysaten erreicht.

Die Zellsedimente wurden dabei in Lysepuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1% TritonX-100, 2% Trasylol (Bayer), 1 mM PMSF; Crisa *et al.* 1997) gründlich resuspendiert, eine halbe Stunde auf Eis inkubiert und anschließend eine halbe Stunde zentrifugiert (4°C, 13.000 rpm, Heraeus Biofresco). Anschließend wurde die Proteinkonzentration in den Überständen bestimmt.

4.4.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN (Bradford 1976)

Zur Erstellung einer Eichkurve wurden 2, 4, 6, ... bis 16 μl einer BSA-Stammlösung (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in eine Mikrotiterplatte pipettiert, von den zu bestimmenden Proben jeweils Doubletten von 1 μl einer 1:10 oder 1:20 Verdünnung. Nach Zugabe von 150 μl 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) bei λ_{1-2} 650 nm - 450 nm.

4.4.4 IMMUNPRÄZIPITATION

4.4.4.1 VORBEREITUNG DER SEPHAROSE

Protein A-Sepharose CL-4B (pASph, Pharmacia, Freiburg) wurde üN bei 4°C in 15 ml PBS oder TBS (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% NaN_3) gequollen, 2x mit PBS bzw. TBS gewaschen (3 min, 2500 rpm), mit 2 Volumen PBS bzw. TBS versetzt (33 %ige pASph-Lösung) und nach Zugabe von 0,2% NaN_3 (bei PBS) bei 4°C gelagert.

4.4.4.2 PRÄZIPITATION

Anfangs wurden pro Ansatz 1×10^7 Zellen in 0,6 ml Lysepuffer (1% NP-40 (w/v), 1 mM PMSF, 2% Trasylol (v/v; entspricht 28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin) in PBS) gründlich resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4°C und 10.000 rpm (Heraeus, Biofuge fresco) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 200 μl Ak-Überstand bzw. 5 μg gereinigtem Ak versetzt, 45 min bei 4°C auf einem Rad inkubiert, 50 μl 33% Protein A-Sepharose CL-4B-Lösung zugegeben, weitere 20 min bei 4°C auf dem Rad gedreht, 2 min bei 4°C und 10.000 rpm zentrifugiert und das Sediment 5x mit je 1 ml eiskaltem 0,1% NP-40/PBS gewaschen. Das Sediment wurde mit 25 μl 1x reduzierendem SDS-Probenpuffer (Roti®-Load, Roth) versetzt, gemischt, 1 min abzentrifugiert und konnte bei 4°C gelagert werden. Später wurden die Bedingungen etwas geändert. Pro Ansatz wurden nun 1×10^7 Zellen in 100 μl Lysepuffer (40 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% NP-40, 2 mM PMSF, 5 mM IAA) aufgenommen. Die Ak-Menge wurde auf 30 μl , die Sepharosemenge auf 15 μl reduziert; gewaschen wurde 3x mit je 1 ml Lysepuffer. Sollte eine besonders sanfte Lyse erfolgen, wurde sie in Digitoninpuffer durchgeführt (1% (w/v) Digitonin, 1 mM PMSF, 1% Trasylol in PBS), gewa-

schen wurde dann mit 0,1% Digitonin in PBS. Die Präzipitation mit dem TAP-Ak wurde mit Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

Für die Präzipitation mit dem Ak 4H84 (2,5 µl pro Ansatz) waren noch weitere Lysepuffer getestet worden, Unterschiede zur oben beschriebenen Vorgehensweise sind angegeben.

- 1) NP-40-Lyse (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris/HCl pH 8,0)
- 2) Hochsalz-Lyse (500 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris/HCl pH 8,0)
- 3) Niedrigsalz-Lyse (1% NP-40, 50 mM Tris/HCl pH 8,0)
- 4) NP-40/SDS-Lyse (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1% Trasytol, 1 mM PMSF)
- 5) Digitonin-SDS-Lyse: Puffer 1 (0,1% Digitonin, 0,5 mM PMSF in PBS), Puffer 2 (1% NP-40, 1 mM PMSF, 1% Trasytol, in PBS)

Das Zellsediment wurde in 30 µl Puffer Puffer 1 resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert, 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand nach Beigabe von 3 µl 20% SDS 5 min auf 95°C erhitzt. Durch Zugabe von 570 µl Puffer 2 wurde die SDS-Konzentration auf 0,1% verdünnt. Nach je 30 min Inkubation zunächst bei RT, dann bei 4°C und 10 min Zentrifugation bei 4°C konnte der Überstand in die Immunpräzipitation eingesetzt werden.

- 6) SDS-Lyse (2% SDS, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5)

Das Zellsediment wurde in 30 µl SDS-Lyse-Puffer resuspendiert, 10 min auf 95°C erhitzt, kurz mit Ultraschall behandelt und 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 570 µl PBS/2% BSA verdünnt, 10 min auf Eis inkubiert und schließlich 10 min bei 4°C zentrifugiert.

4.4.4.3 ABSPALTUNG VON OLIGOSACCHARIDEN MIT ENDOGLYCOSIDASE F

Die Immunpräzipitate wurden beim letzten Waschschrift auf zwei Aliquots verteilt, zentrifugiert und das Sediment mit 10 µl 2x Denaturierungslösung (0,4% SDS, 0,5% β Mercaptoethanol) versetzt. Nach 10minütiger Inkubation bei 95°C und Abkühlung auf RT wurde einem der beiden Aliquots 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,6, 10 mM EDTA, 1% NP-40 sowie 0,2 U EndoF (Endoglycosidase F/N-Glycosidase F; Boehringer Mannheim) zugegeben, dem anderen Aliquot H₂O statt Enzym (Negativkontrolle). Die Inkubation erfolgte bei 37°C üN.

4.4.4.4 ABSPALTUNG VON OLIGOSACCHARIDEN MIT ENDOGLYCOSIDASE H

Der EndoH-Verdau von Immunpräzipitaten und Zell-Lysaten wurde mit der Endoglycosidase H_f von Biolabs (New England Biolabs GmbH, Schwalbach) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Ein Aliquot wurde jeweils als Negativkontrolle mit H₂O statt Enzym mitgeführt.

4.4.5 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (Laemmli 1970)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAA-Gele). Die 6x8 cm großen, 0,5 mm dicken Trenngele [10-15% Polyacrylamid (29:1 Acrylamid/Bisacrylamid), 375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% SDS (w/v), 0,4% TEMED, 0,1% APS] wurden mit 1 cm Sammelgel (5% Polyacrylamid, 126 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 1% TEMED, 0,1% APS) überschichtet. Vor dem Auftragen wurden die Volumina der Proben angeglichen, die Ansätze mit Auftragspuffer (Roti®-Load, Roth GmbH und Co, Karlsruhe) versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert. Für den Auftrag von Zellysaten wurde entweder auf Zellzahl (meist 1×10^6) oder auf Proteinmenge (meist 100 µg) normiert. Als Größenstandard wurden der Electrophoresis Calibration Kit von Pharmacia (Pharmacia, Freiburg) oder der "Kaleidoscope Polypeptide Standard, broad range" von Biorad 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 75 V bis zum Erreichen des Trenngels und weiter bei 95 V. Nach dem Lauf wurden die Gele entweder mit Silber gefärbt oder auf Nitrocellulosemembran übertragen.

Für eine bessere Auftrennung kleiner Banden beim Arbeiten mit dem rekombinanten $\alpha 1$ -Polypeptid wurden z.T. auch 16,5%ige Tris-SDS-Gele nach der Anleitung von Schägger und Jagow verwendet (Schägger und von Jagow 1987). Der Gellauf erfolgte dabei in Tris-Tricin-Puffer (100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1% SDS) bei 30 V für eine Stunde und 90 V für den weiteren Lauf.

4.4.6 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 (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.

4.4.7 ÜBERTRAGUNG VON PROTEINEN AUF NITROCELLULOSE (WESTERNBLOT)

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 ÜN bei 25 V in einem Naßblotmodul (LKB/Pharmacia, Freiburg) geblottet. Die Membran wurde 5 min in 1x PBS geschwenkt und konnte dann detektiert werden. Für das Testen der Hybridomüberstände im Westernblot wurde ein präparativer Kamm für den Auftrag des Lysats von 1×10^7 Zellen verwendet und die Membran nach dem Blotten in schmale Streifen geschnitten.

4.4.8 IMMUNDETEKTION DES WESTERNBLOT

Die Detektion der Westernblots wurde mit dem Western-Light™ Chemiluminescent Detection System von Tropix (TROPIX, Bedford, Massachusetts, USA) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Bei Verwendung der zu testenden Hybridomüberstände für die Detektion wurden im ersten Testlauf jeweils zwei Überstände 1:1 vereinigt und je Filterstreifen insgesamt 60 µl aufgetropft. Die Inkubation erfolgte hierbei in einer feuchten Kammer.

4.4.9 "ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY" (ELISA)

Zur Bindung des Antigens bzw. Antikörpers an den Boden der 96fM-Platte (Maxisorb, Greiner) wurden je Vertiefung 100 µl davon über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einstündigem Blocken mit 200 µl 5% Magermilchpulver/0,02% Tween20/PBS wurden 50 µl 1. Ak bzw. Antigen in der geeigneten Verdünnung zugegeben, 1 h inkubiert, 4x mit 300 µl PBS/0,02% Tween20 pro Loch gewaschen und danach mit 50 µl sekundärem, Peroxidase-gekoppeltem Ak pro Vertiefung eine weitere Stunde inkubiert. Dem erneuten viermaligen Waschen folgte die Zugabe von 100 µl 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).

ÜBERSICHT ÜBER DIE IM ELISA VERWENDETEN KOMBINATIONEN:

Test der Antiseren

500 ng α 1-Protein in PBS pro Vertiefung

AS-Verdünnungen in PBS/0,02% Tween, Kontrolle: Präimmunserum

Schwein anti-Kaninchen-HRP bzw. Kaninchen anti-Maus IgG + IgM-HRP

Test der Hybridomüberstände

500 ng α 1-Protein in PBS oder 500 ng hu β ₂m-(His) in PBS pro Vertiefung oder Überstände von .221 oder .221G1s unverdünnt

Hybridomüberstände: unverdünnt

Kaninchen anti-Maus IgG + IgM-HRP

Nachweis von löslichem G1 (G1s) in den Überständen der Transfektanten

1 μ g W6/32 in PBS pro Vertiefung

Überstand der .221G1s-Transfektante unverdünnt, .221-Überstand als Negativkontrolle, HLA-E_{sol} als Positivkontrolle

Kaninchen anti-hu β ₂m-HRP

4.4.10 BESTIMMUNG DES ISOTYPS VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN

Der Isotyp der erhaltenen mAb wurde mit dem "Monoclonal antibody-based mouse Ig isotyping kit" von Pharmingen (Pharmingen, Hamburg) nach Anleitung des Herstellers bestimmt.

4.4.11 IMMUNISIERUNG MIT DEM REKOMBINANTEN α 1-POLYPEPTID UND HERSTELLUNG VON ANTISEREN

Das Kaninchen und die Mäuse für die Immunisierung wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Linke am MPI (Martinsried) zur Verfügung gestellt, der auch die Immunisierung der Tiere übernahm.

4.4.11.1 IMMUNISIERUNG EINES KANINCHENS

Dem Kaninchen wurde zunächst Blut zur Gewinnung eines Präimmunserums als Kontrolle entnommen, dann wurde es mit 100 µg rekombinantem α 1-Polypeptid in 1 M Harnstoffpuffer, 1:1 emulgiert in komplettem Freund's Adjuvans immunisiert. Nach knapp drei Wochen wurde das Kaninchenantiserum im ELISA mit rekombinantem α 1-Polypeptid getestet und erwies sich noch in einer Verdünnung von 1:10.000 im Vergleich mit dem Präimmunserum als deutlich positiv. Auf eine weitere Immunisierung des Kaninchens wurde aufgrund seines schlechten Gesundheitszustandes verzichtet, und so wurde es vier Wochen nach der ersten Immunisierung ausgeblutet.

4.4.11.2 IMMUNISIERUNG VON MÄUSEN

Drei Monate alte weibliche C57Bl6/Balb c F1-Mäuse wurden mit je etwa 30 µg rekombinantem α 1-Polypeptid in 1 M Harnstoffpuffer, 1:1 emulgiert in komplettem Freund's Adjuvans, subcutan immunisiert. Nach drei Wochen wurden erneut etwa 30 µg rekombinantes α 1-Protein in 1 M Harnstoffpuffer, 1:1 emulgiert in inkomplettem Freund's Adjuvans, injiziert, eine Woche später erfolgte die dritte Immunisierung auf dieselbe Weise. Zu diesem Zeitpunkt wurde den Mäusen Blut entnommen, um die Seren im ELISA zu testen. Das Serum einer Maus zeigte keinerlei Reaktion, zwei weitere reagierten schwach. Diese beiden wurden für die Gewinnung der Zellen für die Kultivierung einer Feederlayer benutzt. Das Serum einer Maus reagierte noch in einer Verdünnung von 1:50.000 sehr deutlich im Vergleich mit dem Präimmunserum. Diesem Tier wurden 4 Tage vor Entnahme der Milz für die Fusionierung 1×10^7 Zellen der X63G-Gen-Transfektante in PBS peritoneal injiziert.

4.4.11.3 GEWINNUNG DER ANTISEREN

Das dem Kaninchen entnommene Blut wurde in 50 ml Röhren bei 4°C für 24 h stehengelassen. Der abgenommene Überstand wurde dann 10 min bei 2.000 rpm und ein weiteres Mal bei 4.000 rpm zentrifugiert und anschließend in Aliquots bei -20°C verwahrt. Das Blut der Mäuse wurde in Hämatokritröhren zentrifugiert und sofort anschließend 1:10 mit PBS verdünnt (1 mm Röhrenlänge entspricht 1 µl).

5 ERGEBNISSE

5.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION UND STIMULIERBARKEIT VON HLA-G IN GEWEBEN UND ZELLINIEN

Von unserer Arbeitsgruppe war die Expression von HLA-G in humanen Keratinozyten *in vitro* mittels Northernblot und RT-PCR gezeigt worden (Ulbrecht *et al.* 1994). Im Rahmen dieser Arbeit war auch damit begonnen worden, die Expression von HLA-G und den HLA-G-Isoformen *in vivo* in Hautbiopsien von Gesunden und Patienten mit diversen Hauterkrankungen nachzuweisen. Diese Untersuchung wurde von mir fortgesetzt, um möglicherweise eine Korrelation einer bestimmten Krankheitsgruppe mit einem bestimmten HLA-G-Expressionsmuster festzustellen.

HLA-G wird hauptsächlich in der Plazenta exprimiert, einem Gewebe, in dem die Expression der klassischen Klasse-I-Moleküle HLA-A und -B stark herunterreguliert ist und invers mit der HLA-G-Menge korreliert zu sein scheint (Yelavarthi *et al.* 1991). Es war deshalb naheliegend zu überprüfen, ob dies auch in anderen Geweben der Fall ist, wie z.B. in Gehirn- und Muskelgeweben, von denen bekannt ist, daß Klasse-I-Moleküle im nicht-pathologischen Zustand nur in geringen Mengen exprimiert werden (Lampson 1995; Hohlfeld und Engel 1994).

Die Untersuchung von Muskelbiopsien und -zellen wurde in Kooperation mit Dr. Reinhard Hohlfeld (MPI für Neurobiologie, Martinsried) durchgeführt.

5.1.1 UNTERSUCHUNG DES HLA-G-EXPRESSIONSMUSTERS IN HAUTBIOPSIEN

Um das HLA-G-Expressionsmuster in Hautbiopsien zu untersuchen, wurde zunächst Gesamt-RNA aus Biopsiematerial isoliert und in cDNA umgeschrieben bzw. aus bereits vorhandener RNA cDNA hergestellt. Die Amplifikation dieser cDNA erfolgte mit den Oligonukleotiden $\alpha 1s$ und Ex6/3'UT, wodurch alle bislang bekannten alternativ gespleißten HLA-G-mRNA-Tran-

skripte erfaßt werden können. Als Kontrolle wurde cDNA aus der Choriocarcinomzelllinie JEG-3 mitgeführt, von der bekannt ist, daß sie HLA-G exprimiert (Rinke de Wit *et al.* 1990). Die Auftrennung der erhaltenen PCR-Produkte auf einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel zeigte in den meisten Proben nur schwache Banden (Abb. 5.1.1 a); außerdem war die Unterscheidung von HLA-G2m und -G4 aufgrund der identischen Größe dieser Amplifikate nicht möglich. Deshalb wurden vier Abzüge des Gels auf Nylonmembran geblottet und mit spezifischen Sonden hybridisiert. Ein Gesamtüberblick über das Expressionsmuster der Proben war durch Verwendung der vollständigen Digoxigenin-markierten HLA-G4-cDNA als Sonde möglich (Abb. 5.1.1 b). Die Unterscheidung der HLA-G2m- und -G4-Isoformen erfolgte durch Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotiden, die den Übergang Exon 2/Exon 4 (G2-3'; G2-spezifisch) bzw. Exon 3/Exon 5 (G3-5; G4-spezifisch) überspannen (Abb. 5.1.1 c, d). Für den Nachweis der löslichen HLA-G-Isoformen HLA-G1s bzw. -G2s wurde das Oligonukleotid G-In4-2 aus dem in diesen Formen nicht entfernten Intron 4 verwendet (Abb. 5.1.1 e). Als Kontrolle für die Qualität der cDNA wurden ein 440-bp-Stück (Exon 3-3'UT) der HLA-E-mRNA und ein 152-bp-Stück (Exon 2-3) von β -Actin amplifiziert (Abb. 5.1.1 f, g).

Die Probe 14 ist mit allen verwendeten Oligonukleotiden negativ, so daß davon auszugehen ist, daß diese cDNA nicht in Ordnung war. Als Größenvergleich auf dem Agarosegel bzw. Kontrolle für die Spezifität der Hybridisierungen wurden vereinigte Amplifikate von subklonierter cDNA der verschiedenen HLA-G-Isoformen aufgetragen, und zwar in Spur K1 HLA-G1m (799 bp), -G2m (523 bp) und -G3 (247 bp), in Spur K3 HLA-G1m, -G4 (523 bp) und -G3, sowie in Spur K2 ein Aliquot einer *Bam*H I/*Xho* I-Restriktion der in den Vektor pREP7 in diese Schnittstellen subklonierten G2s-cDNA (730 bp). Das Oligonukleotid G-In4-2 zeigte Kreuzreaktion mit HLA-G2m (siehe Spur K1 und J), allerdings konnte das Amplifikat des löslichen G2 von membranständigem G2 unterschieden werden, da es 122 bp (Intron 4) größer ist (siehe Spur J). Daraus ergab sich, daß lösliches G2 nur in JEG-3, aber in keiner der Biopsien nachzuweisen war. Die Banden bei der Hybridisierung mit G-In4-2 in den Proben 24 und 25 waren auf Kreuzreaktion mit G2m zurückzuführen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Tabelle 5.1. Lösliches G1 war außer in JEG-3 nur in vier weiteren Proben nachzuweisen: in den Proben 24 und 20 in einer mit JEG-3 vergleichbaren Stärke, in den Proben 21 und 28 nur sehr schwach. Das Transkript für G1m war als häufigstes nachweisbar (23 von 27 Biopsien), während G2m (13/27) und G3 (7/27) deutlich seltener auftraten. Auffällig war, daß im Unterschied dazu das G4-Transkript fast so oft nachweisbar war wie G1m (22/27). HLA-G1m ist auch in der RT-PCR bis auf einige Ausnahmen (z.B. Spur 21 und 23) am stärksten nachweisbar. Die Prominenz von Isoformen in einigen Hautbiopsien könnte auf eine differentielle Regulation des Spleißprozesses des HLA-G-Transkripts hindeuten.

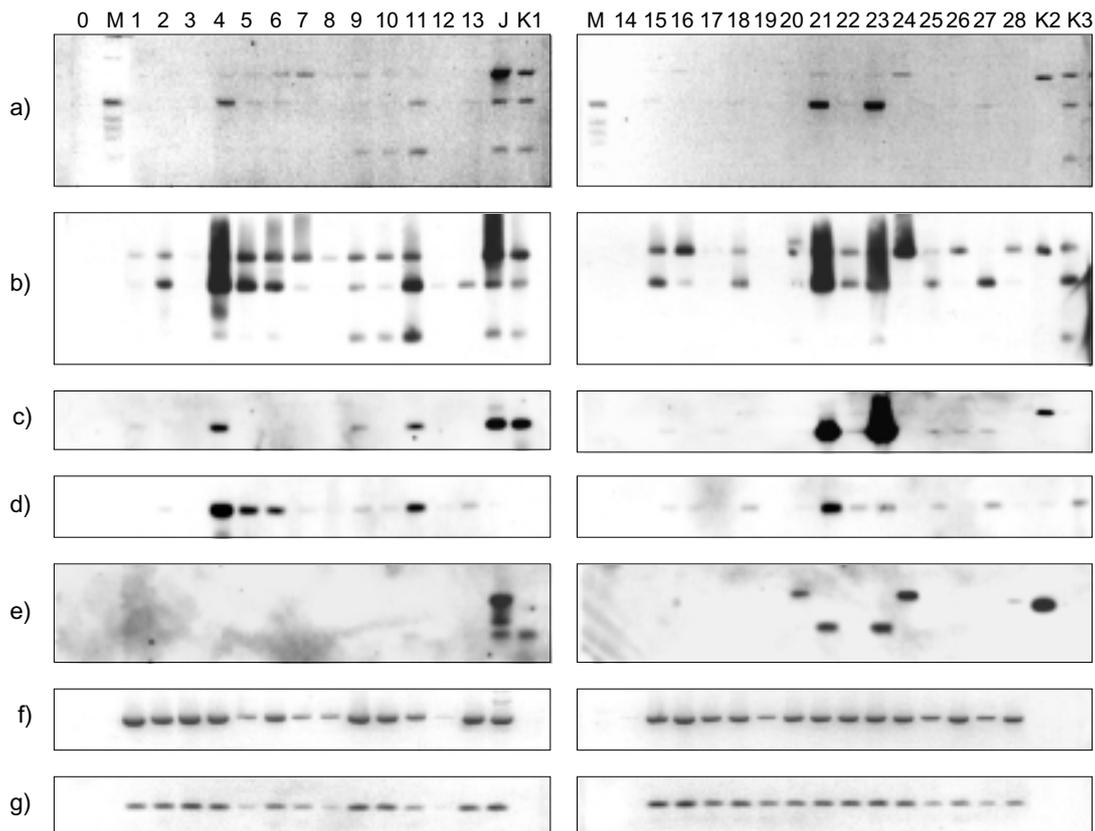


Abb. 5.1.1: HLA-G-Expression in Hautbiopsien: Ergebnisse der RT-PCR und der Hybridisierungen

a) Je 1 μ l cDNA wurde in eine Standard-PCR-Reaktion mit den HLA-G-spezifischen Oligonukleotiden α 1s und Ex6/3'UT eingesetzt und der gesamte Ansatz auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. In Spur 0 wurde die Negativkontrolle (Ansatz ohne cDNA) aufgetragen, in Spur M 200 ng des Größenstandards (1-kb-Leiter, Gibco, BRL), in Spur J 3 μ l der Positivkontrolle (Amplifikat von JEG-3). Die Kontrollen K1-K3 enthalten PCR-Amplifikate von subklonierter cDNA von G1m, G2m, G3 und G4 (K1: G1, G2, G3; K3: G1, G4, G3) bzw. ein Aliquot einer *Bam*H I/*Xho* I-Restriktion der in den Vektor pREP7 subklonierten G2s-cDNA (K2) als Größenvergleich und Kontrollen für die Hybridisierungen. Die Spren 1 bis 28 zeigen die Amplifikate der Hautbiopsien. Die Ethidiumbromidfärbung des Gels ist revertiert dargestellt.

b)-e) Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten Volle-Länge-cDNA von HLA-G4 (b) bzw. den Oligonukleotiden G2-3' (c; G2), G3-5 (d; G4), G-In4-2 (e; G1s und G2s).

f)-g) Je 1 μ l cDNA wurde in eine Standard-PCR-Reaktion mit den HLA-E spezifischen Oligonukleotiden HLA-E α 3s und HLA-E 3'UT-5' (f) bzw. den β -Actin-spezifischen Oligonukleotiden #1485 und #2077 eingesetzt (g). Der gesamte Ansatz der HLA-E-PCR bzw. 4 μ l der β -Actin-PCR wurden auf 2%igen Agarosegelen aufgetrennt.

Nr.	Diagnose	G1s	G1m	G2s	G2m	G3	G4
Gesunde Haut							
19	Vorhaut	-	-	-	-	-	-
23	gesunde Haut neben malignem Melanom	-	++	-	++++	+	+++
Erbliche Krankheiten							
17	aktinische Porokeratose	-	+	-	+	-	-
Nichtinfektiöse Krankheiten							
1	spongiotische Dermatitis	-	+	-	+	-	-
11	spongiotische Dermatitis	-	++	-	+++	++++	+++
27	subakute spongiotische Dermatitis	-	-	-	+	-	+
3	Psoriasis vulgaris (z.T. pustulös)	-	+	-	-	-	-
4	Psoriasis vulgaris	-	++	-	++++	+	++++
6	Verdacht auf Psoriasis vulgaris	-	+++	-	-	+	+++
2	oberfl. perivask. Dermatitis	-	+	-	-	-	++
12	atopisches Mamillenekzem	-	-	-	-	-	+
21	Spättyp-Allergie Typ 3	+	+++	-	++++	-	++++
28	Lichen ruber	+	+	-	-	-	+
Neoplasien							
13	Verrucae seborrhoicae	-	-	-	-	-	+
18	Verrucae seborrhoicae	-	+	-	-	-	+
9	spinozelluläres Karzinom	-	+++	-	++	+++	++
16	spinozelluläres Karzinom	-	++	-	-	-	+
10	Basaliom	-	+++	-	-	+++	+
24	Nävus bleu	++	+++	-	-	-	-
Bindegewebskrankheiten							
26	Lupus erythematoses	-	+	-	+	-	+
5	Lupus erythematoses (hyperkeratotisch)	-	+++	-	-	+	+++
7	systemische Sklerodermie	-	++++	-	-	-	+
8	narbige Alopezie, zirkumskripte Sklerodermie	-	+	-	-	-	+
15	vernarbende Alopezie, V.a. Sklerodermie	-	+	-	+	-	+
25	zirkumskripte Sklerodermie	-	+	-	+	-	+
Virusverursachte Krankheiten							
20	Verrucae vulgare	++	+	-	+	-	+
22	subcutanes Gewebe unter Verruca	-	++	-	++	-	++
Zelllinie							
J	JEG-3; Choriocarcinom	++	++++	++	++++	++++	-

++++ starkes Amplifikat; +++ schwaches Amplifikat; ++ starkes Signal nach Hybridisierung; + schwaches Signal nach Hybridisierung; - negativ;

Tab. 5.1: Nachweis der HLA-G-Expression in Hautbiopsien

Zusammenfassung der Untersuchungen mit RT-PCR und Hybridisierung mit HLA-G-Isotyp-spezifischen Oligonukleotiden.

Die Transkripte für HLA-G1 und die alternativ gespleißten HLA-G-Transkripte (außer G2s) konnten in Hautbiopsien nachgewiesen werden. Die Expression von HLA-G war aber in den meisten Fällen sehr schwach und konnte erst nach Hybridisierung mit spezifischen Oligonukleotiden gezeigt werden. Eine Korrelation zwischen einer bestimmten Krankheitsgruppe mit einem spezifischen HLA-G-Expressionsmuster war nicht feststellbar. Das Voll-Länge-Transkript ist das Hauptexpressionsprodukt des HLA-G-Gens in der Haut.

5.1.2 UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION VON HLA-G IN GEHIRNMATERIAL UND GLIOBLASTOMZELLINIEN

5.1.2.1 NACHWEIS DER EXPRESSION VON HLA-G IN GEHIRNMATERIAL

Im Zusammenhang mit einer anderen Arbeit stand der Gruppe Material aus verschiedenen Gehirnarealen zur Verfügung, und es lag deshalb nahe, auch die HLA-G-Expression zu untersuchen. Um zu überprüfen, ob HLA-G in diesem Material exprimiert wird, wurde zunächst eine RT-PCR mit dem Primerpaar Ex2-5'/Ex2-3' durchgeführt, mit dem die Sequenz der α 1-Domäne von HLA-G amplifiziert werden kann, die in allen bislang bekannten Isoformen enthalten ist. Als Kontrolle für die Qualität der cDNA wurde außerdem ein 440 bp langes Stück der cDNA (Exon 3-3'UT) von HLA-E mit den Oligonukleotiden E- α 3s und 3'UT-5' amplifiziert. Es zeigte sich, daß in allen untersuchten Proben die Transkripte für die HLA-G- α 1-Domäne und auch für HLA-E nachzuweisen waren (Abb. 5.1.2).

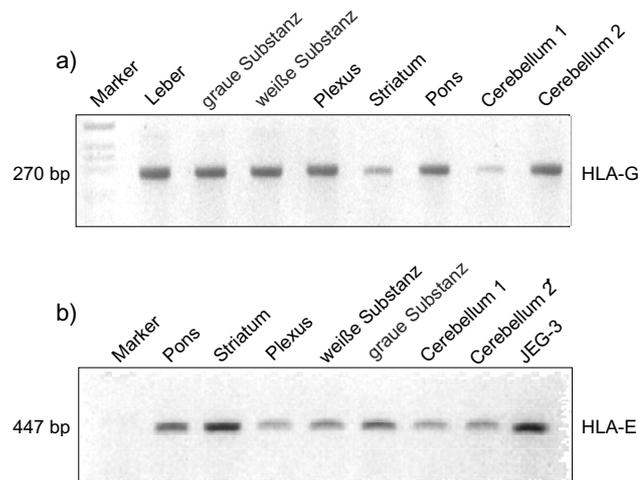


Abb. 5.1.2: Amplifikation der Sequenz von HLA-G Exon 2 und von HLA-E aus cDNA von Gehirnmaterial

Je 1 µl cDNA wurde mit dem Primerpaar HLA-G Ex2-5'/Ex2-3' (Abb. a) bzw. HLA-E α3s/-3'UT-5' (Abb. b) amplifiziert und der gesamte 20-µl-PCR-Ansatz auf einem 2%igen (a) bzw. 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt. Als Größenstandard sind jeweils 200 ng des Molekulargewichtstandards (1-kb-Leiter, Gibco, BRL) aufgetragen.

Die Ethidiumbromidfärbung der Gele ist revertiert dargestellt.

Für den Nachweis in der Northernblotanalyse erwies sich die Menge an HLA-G-Transkripten in den Gehirnproben als zu gering. Deshalb wurde das mRNA-Expressionsmuster mittels RT-PCR weiter untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Oligonukleotide 5'UT und Ex6/3'UT verwendet, die eine gleichzeitige Amplifikation aller alternativ gespleißten HLA-G-Transkripte erlauben. Gleichzeitig kann eine Unterscheidung anhand der Größe vorgenommen werden, mit Ausnahme von G2m und G4, deren PCR-Amplifikate die gleiche Länge aufweisen. Um eine größere Sensitivität als im Agarosegel zu erreichen, erfolgte der Auftrag der RT-PCR-Produkte, die im gleichen Ansatz mit Primern für β-Actin (152 bp) koamplifiziert wurden, auf einem Polyacrylamidgel (PAA-Gel) mit anschließender Silberfärbung (Abb. 5.1.3). In allen Gehirnarealen wurden die Transkripte von G2/G4 am stärksten amplifiziert, die G3-cDNA gleich stark in der grauen Substanz und schwächer in Plexus und Striatum. Volle-Länge-G1-Transkripte wurden nur in den Cerebelli-Proben, grauer und weißer Substanz nachgewiesen. Es konnte also in den untersuchten Gehirnmaterialien eine differentielle Expression der HLA-G-Transkripte gezeigt werden.

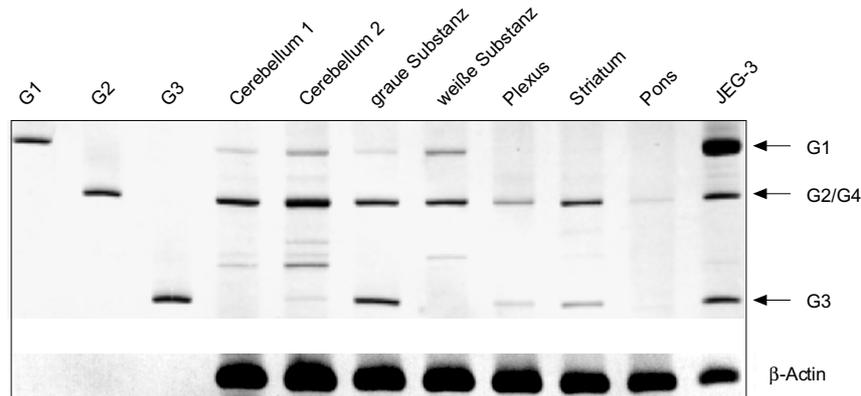


Abb. 5.1.3: Analyse des HLA-G-Expressionsmusters in Gehirnmateriale mittels RT-PCR

Je 1 µl cDNA des Hirnmateriale sowie der Zelllinie JEG-3 wurde mit den Primerpaaren HLA-G 5'UT+Ex6/3'UT und β-Actin #2077+#1485 in einem 20-µl-PCR-Ansatz koamplifiziert. 15 µl dieser Reaktion bzw. 1 µl der Reaktion mit RNA von JEG-3, wurden auf einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach dem Lauf silbergefärbt. Als Größenkontrolle wurde subklonierte cDNA von G1, G2 und G3 mit demselben HLA-G-Primerpaar amplifiziert und in die Spuren 1-3 geladen.

5.1.2.2 ÜBERPRÜFUNG EINER HLA-G-SPEZIFISCHEN SONDE

Für den Nachweis von HLA-G-Transkripten im Northernblot wurde die von Onno (Onno *et al.* 1994) beschriebene Sonde aus dem 3'UT verwendet und ihre Spezifität zunächst in einem Southernblot überprüft (Abb. 5.1.4). Dazu wurde genomische DNA der für den HLA-Komplex hemizygoten Zelllinien .45, .221, der Zelllinien K-562 und Olga sowie der Person MS mit *Hind* III verdaut. In allen untersuchten Proben fand sich das von Pook 1991 beschriebene 5,4-kb-Fragment (Pook *et al.* 1991). Des weiteren wurde eine *Taq* I-Restriktion wie bei Alizadeh beschrieben und eine *Pst* I-Restriktion zur weiteren Charakterisierung durchgeführt (Alizadeh *et al.* 1993). Der dort gezeigte Polymorphismus für *Taq* I konnte bestätigt werden: ein etwa 3,9-kb-Fragment für DNA von .45 und .221 bzw. ein etwa 1,3-kb-Fragment für K-562 und Olga. Die Person MS scheint heterozygot zu sein, allerdings ist diese Restriktion unvollständig. Der *Pst* I-Verdau zeigte eine 1,9-kb-Bande für DNA von .45 und .221 sowie 3,5-kb-, 1,3-kb- und etwa 0,7-kb-Banden für K-562 und Olga. Die Person MS scheint auch hier heterozygot zu sein, allerdings ist auch diese Restriktion nicht vollständig.

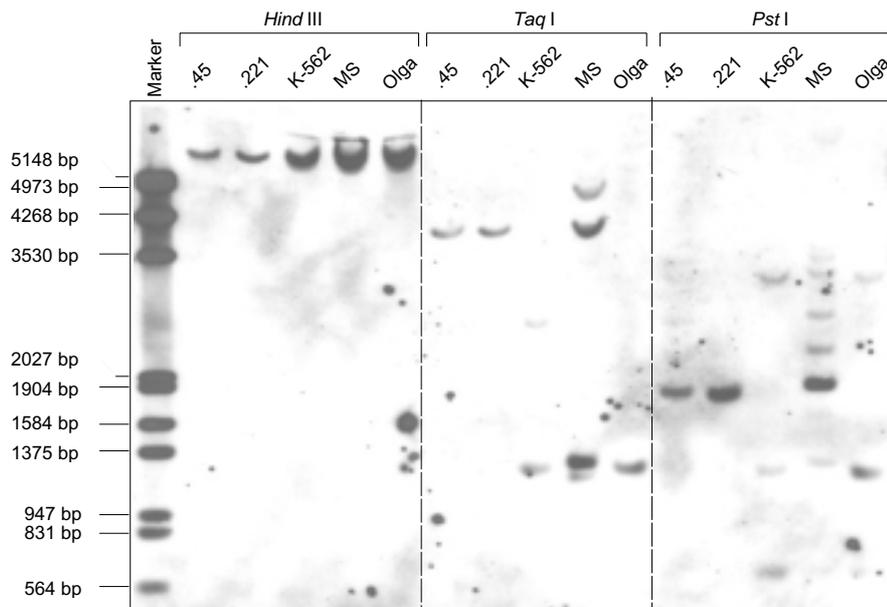


Abb. 5.1.4: Nachweis der Spezifität der HLA-G-3'UT-Sonde im genomischen Southernblot

Je 10 µg genomische DNA der Zelllinien .45, .221, K-562 und Olga sowie der Person MS wurden mit *Hind* III, *Taq* I bzw. *Pst* I verdaut und auf einem 0,7%igen TPE-Agarosegel ün aufgetrennt. Nach Immobilisierung der DNA auf Nylonmembran erfolgte der Nachweis mit der HLA-G-3'UT-Sonde. In der ersten Spur sind 5 µl des Digoxigenin-markierten Markers aufgetragen (Boehringer Mannheim, Standard III).

5.1.2.3 NACHWEIS DER HLA-G-EXPRESSION IN GLIOBLASTOMZELLINIEN NACH STIMULATION MIT IFN γ IM NORTHERNBLOT

Mittels RT-PCR war gezeigt worden, daß HLA-G-Transkripte im untersuchten Gehirnmateriale vorhanden sind. Aus diesem Ergebnis konnte jedoch nicht abgeleitet werden, ob HLA-G im Gehirn selbst transkribiert wird. Deshalb wurden zwei Glioblastomzelllinien (T98 und N59) gewählt, deren Untersuchung auf RNA- und Proteinebene diese Frage klären sollte. Nachdem gezeigt worden war, daß IFN γ die HLA-G-Expression in Monozyten- und Makrophagenzelllinien steigern kann, sollte auch dies sowie die Stimulation mit IL-4 und IL-6 in den Zelllinien untersucht werden (Yang *et al.* 1996). Die Stimulation mit diesen Cytokinen erfolgte für jeweils 48 Stunden. Danach wurde zunächst die Expression in unstimulierten und stimulierten Zellen auf RNA-Ebene im Northernblot überprüft.

Die Hybridisierung erfolgte zum einen mit der HLA-G-3'UT-Sonde, zum andern, als Kontrolle, mit einer 3'UT-Sonde spezifisch für HLA-B (Abb. 5.1.5). Es zeigte sich, daß in unstimulierten

Zellen ein Transkript für HLA-G kaum, für HLA-B schwach nachweisbar war. Nach Stimulation mit IFN γ war die Menge beider Transkripte stark erhöht. Stimulation mit IL-4 und IL-6 zeigte keinen Effekt (nicht gezeigt).

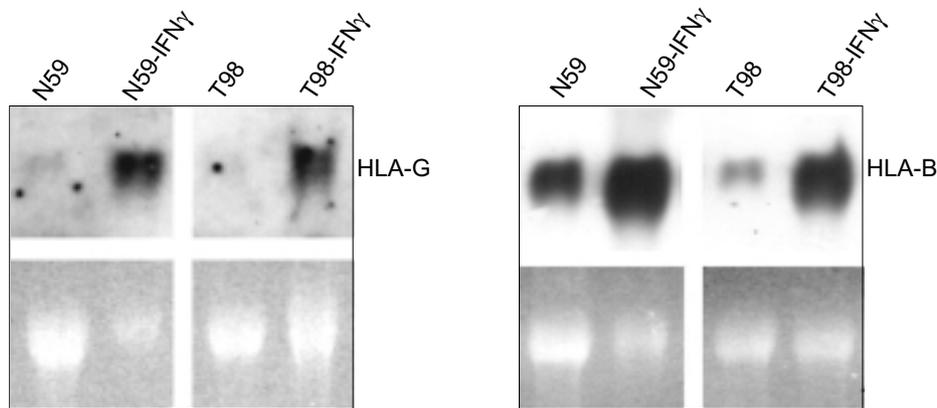


Abb. 5.1.5: Stimulation der HLA-G-Expression durch IFN γ in Glioblastomzellen

Je 5 μ g Gesamt-RNA aus unstimulierten und stimulierten T98- und N59-Glioblastomzellen wurden auf einem 1,2%igen Formaldehydgel aufgetrennt und anschließend auf Nylonmembran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit der HLA-G-3'UT-Sonde (links) bzw. der HLA-B-spezifischen Sonde (rechts). Die Menge der aufgetragenen RNA wird durch die Ethidiumbromidfärbung der 28S rRNA angezeigt.

5.1.2.4 NACHWEIS DER ALTERNATIV GESPLEIßTEN HLA-G-mRNA IN GLIOBLASTOMZELLINIEN NACH STIMULATION MIT IFN γ MITTELS RT-PCR

Im Northernblot waren die alternativ gespleißten HLA-G-Transkripte nicht nachweisbar. Deshalb wurde auch hier wieder auf den Nachweis mittels RT-PCR zurückgegriffen und HLA-E-cDNA als Kontrolle amplifiziert (Abb. 5.1.6 a). Die RT-PCR-Analyse bestätigte das Ergebnis des Northernblot, daß HLA-G1m in beiden Zelllinien das vorherrschende Transkript ist, während die verkürzten Amplifikate nur sehr schwach nachweisbar waren. Durch IFN γ -Stimulation wurde HLA-G1m selektiv hochreguliert. IL-4 und IL-6 zeigten keinen Effekt. Die Untersuchung der Isoformen erfolgte wieder mittels eines PAA-Gels (Abb. 5.1.6 b) mit anschließender Silberfärbung, und es bestätigte sich das Ergebnis des Agarosegels, daß die alternativ gespleißten Transkripte nur sehr schwach und unbeeinflusst von der Cytokinstimulation exprimiert werden. Deshalb wurde auf die Unterscheidung von G2 und G4 durch Hybridisierung

mit spezifischen Oligonukleotiden verzichtet. Die Stimulation der Glioblastomzelllinien mit IFN γ resultierte nur in einem Anstieg der HLA-G1-mRNA.

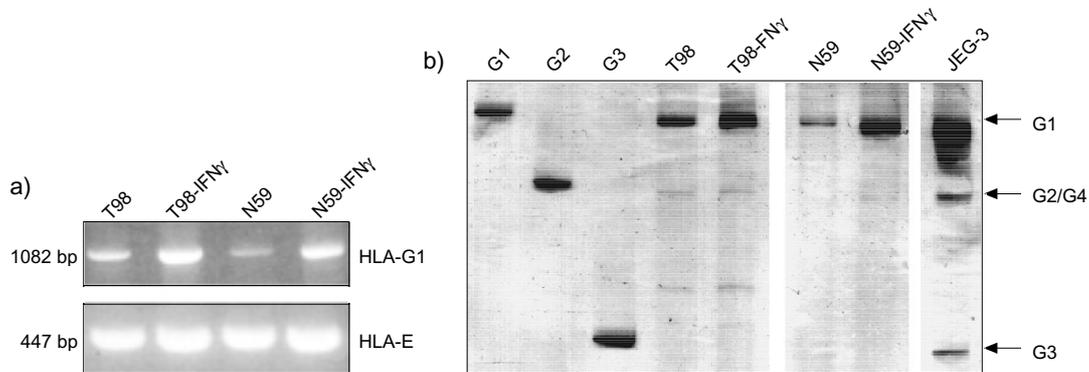


Abb. 5.1.6: Analyse des HLA-G-Expressionsmusters in Glioblastomzelllinien nach Stimulation mit IFN γ mittels RT-PCR

Je 1 μ l cDNA der Glioblastomzellen T98 und N59, vor und nach 48stündiger Stimulation mit IFN γ , sowie von JEG-3 wurde mit dem Primerpaar 5'UT+Ex6/3'UT in einem 20- μ l-PCR-Ansatz amplifiziert. 10 μ l dieser Reaktion, bzw. 1 μ l der Reaktion mit cDNA von JEG-3, wurden auf einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach dem Lauf silbergefärbt. Als Größenkontrolle wurde subklonierte cDNA von G1, G2 und G3 mit demselben Primerpaar amplifiziert und je 1 μ l in die Spuren 1-3 geladen.

5.1.2.5 UNTERSUCHUNG DER HLA-G-EXPRESSION IN GLIOBLASTOMZELLINIEN AUF PROTEINEBENE MITTELS FACS-ANALYSE UND WESTERNBLOT

Der nächste Schritt war die Untersuchung der HLA-G-Expression auf Proteinebene mittels FACS-Analyse und Westernblot. Unstimulierte Glioblastomzellen zeigten eine nur sehr schwache Expression von HLA-G auf der Zelloberfläche, die nach Inkubation mit IFN γ signifikant erhöht war (Abb. 5.1.7). Dabei war die Stimulation in T98-Zellen deutlicher als in N59-Zellen, was auch mit dem Ergebnis des Northernblot übereinstimmt. Neben 87G als HLA-G-spezifischem Antikörper wurde zur Kontrolle die Färbung mit dem Antikörper 4E durchgeführt, der bestimmte HLA-B- und -C-Allele erkennt. Für U-937-Zellen war die im FACS mit den Antikörpern 87G und 4E nachweisbare Verstärkung der Oberflächenexpression von Klasse-I-Molekülen nach IFN γ -Stimulation gezeigt worden, und deshalb wurde diese Zelllinie als Kontrolle mitgeführt (Yang *et al.* 1996). Als Positivkontrolle für 87G wurden die .221G-Gen-

und G1m-Transfektanten eingesetzt, deren HLA-G-Expression durch IFN γ -Behandlung nicht stimuliert werden kann. Auch in der FACS-Analyse unterschieden sich T98 und N59 in der Expressionsstärke.

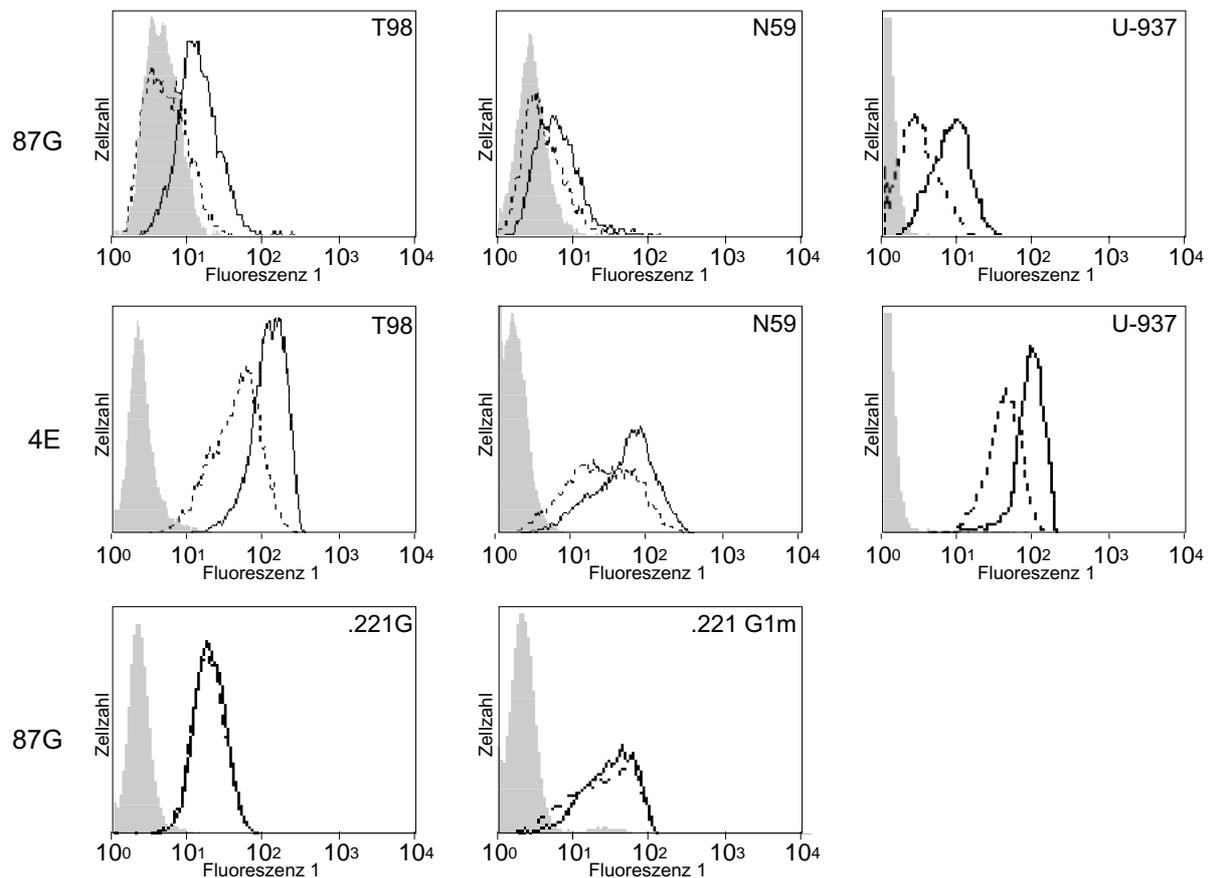


Abb. 5.1.7: Analyse der Zelloberflächenexpression von HLA-G und Klasse I in T98- und N59-Glioblastomzelllinien nach IFN γ -Stimulation

Je 2×10^5 Zellen wurden für 48 h mit oder ohne IFN γ inkubiert und entweder mit dem HLA-G-spezifischen Antikörper 87G oder dem anti-HLA-B/-C-Antikörper 4E gefärbt und im FACS analysiert. Die Transfektanten .221G und -G1m wurden als Positivkontrollen für 87G eingesetzt. Es sind jeweils die unbehandelten Zellen (gestrichelte Linie) mit den stimulierten Zellen (durchgezogene Linie) und mit der Negativkontrolle (nur zweiter Antikörper, grauschattiert) verglichen.

Das Resultat der FACS-Analyse bestätigte sich auch im Westernblot. Zellysate der unstimulierten und stimulierten Glioblastomzellen sowie von JEG-3 wurden mit dem HLA-G-spezifischen Antikörper 4H84 sowie dem Klasse-I-spezifischen Antikörper TP25.99, der HLA-G

nicht erkennt, untersucht. In den mit IFN γ stimulierten Zellen zeigte sich die verstärkte Expression von Klasse I (Abb. 5.1.8 a) sowie von HLA-G1 (Abb. 5.1.8 b). Obwohl eine HLA-G-schwere-Kette bereits im Lysat der unbehandelt kultivierten Zellen zu sehen war, führte dies nicht zu einer eindeutig nachweisbaren Zelloberflächenexpression. Stimulation mit IFN γ erhöhte die Menge an HLA-G Polypeptid und resultierte in einem eindeutig nachweisbaren Zelloberflächentransport. Verkürzte HLA-G-Polypeptide ließen sich nur im JEG-3-Zellysat nachweisen.

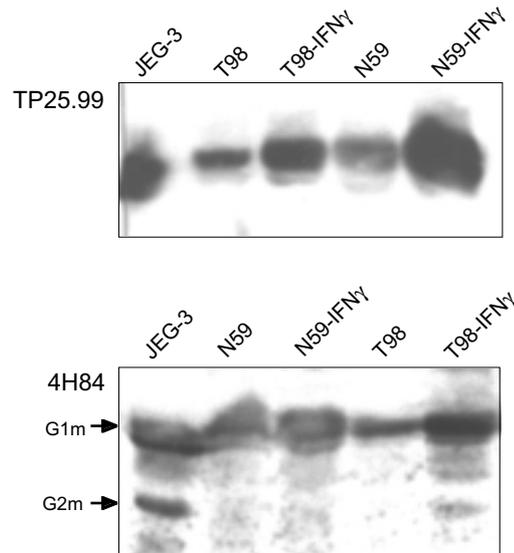


Abb. 5.1.8: Analyse der HLA-G-Expression in Glioblastomzelllinien vor und nach IFN γ -Behandlung durch Westernblotanalyse

Je 100 μ g Zellysat von T98- und N59-Zellen, mit bzw. ohne 48stündige IFN γ -Behandlung sowie von JEG-3-Zellen wurden auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und mit dem Klasse-I-spezifischen Antikörper TP25.99 (oben) bzw. dem G-spezifischen Antikörper 4H84 (unten) gefärbt.

Es konnte gezeigt werden, daß HLA-G-mRNA und die alternativ gespleißten Transkripte im humanen Gehirn exprimiert werden. In den untersuchten Glioblastomzelllinien T98 und N59 führte die Stimulation mit IFN γ zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von HLA-G1, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene. Stimulation mit IL-4 und IL-6 zeigte keinen Effekt, ebenso blieb die Expression der HLA-G-Isoformen von den verwendeten Cytokinen unbeeinflusst.

5.1.3 HLA-G-EXPRESSION IN MUSKELBIOPSIEN UND MYOBLASTEN

Unstimulierte und mit IFN γ stimulierte Myoblasten (Myo-, Myo+) wurden von Dr. Hohlfeld zur Verfügung gestellt, ebenso wie cDNA aus Biopsiematerial: von drei nicht-myopathischen Kontrollen (N1-N3), von zwei Patienten mit Dermatomyositis (D1, D2) und zwei Patienten mit Polyomyositis (P1, P2). Der Nachweis von HLA-G und den alternativ gespleißten Transkripten erfolgte in einer PCR-Reaktion mit dem Primerpaar HLA-G α 1s und Ex6/3'UT, wobei cDNA von JEG-3 als Kontrolle diente. Die Qualität der cDNA wurde durch Amplifikation eines 152-bp-Stücks (Exon 2-3) der β -Actin-mRNA überprüft, wobei sich zeigte, daß die Qualität der cDNA aus dem Biopsiematerial deutlich schlechter war als die der Myoblasten und JEG-3-Zellen (Abb. 5.1.9 e). In unstimulierten Myoblasten und in allen Muskelbiopsien waren auf dem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel keine Banden zu sehen. Nur in stimulierten Myoblasten und in JEG-3-Zellen konnten Banden für G1, G2/4 und G3 nachgewiesen werden (Abb. 5.1.9 a), erst nach Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten G4-cDNA als Sonde auch in den anderen Proben (Abb. 5.1.9 b). Dabei war G3 die vorherrschende Isoform, während die Expression der übrigen Formen von Probe zu Probe sehr unterschiedlich war. Zur Unterscheidung von HLA-G2 und -G4 wurde mit isoformspezifischen Oligonukleotiden hybridisiert (Abb. 5.1.9 c und e). Hierbei erwies sich G2 als häufigste Isoform, während G4 nur in den Proben N3 und P2 und in geringer Menge in Myoblasten vorkam. In den Muskelbiopsien verhielten sich die alternativ gespleißten Transkripte gegenläufig. Es konnte entweder die G2- oder die G4-cDNA-Sequenz amplifiziert werden. In kultivierten Myoblasten waren G2 und G4 exprimiert, nach Stimulation mit IFN γ war aber nur die Expression von G2 erhöht. Diese Ergebnisse wurden durch Reamplifikation der einzelnen Banden der stimulierten Myoblasten und anschließende Sequenzierung bestätigt. Die gefundene Sequenz entspricht dem G*01011-Allel (HLA-6.0; Geraghty *et al.* 1987). Die Sequenz der G4-Isoform konnte als Hintergrund in der G2-Sequenz sehr schwach, aber deutlich gelesen werden.

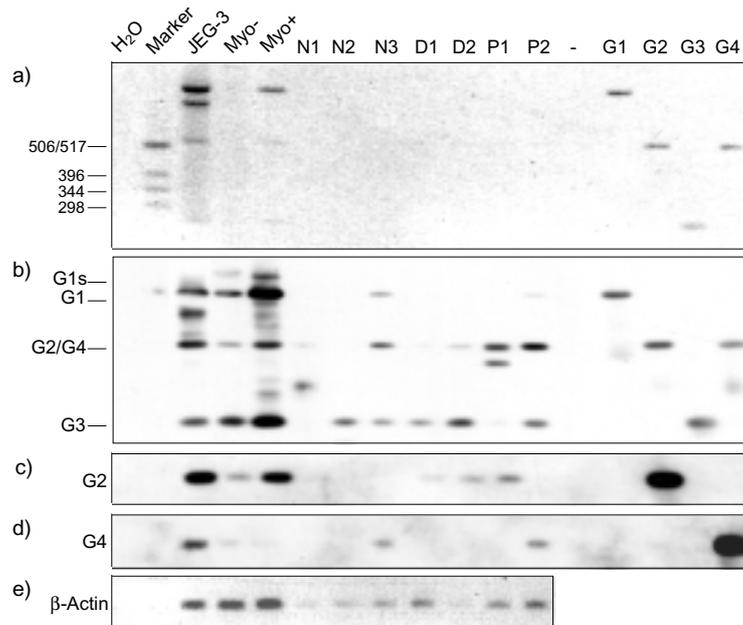


Abb. 5.1.9: Nachweis der HLA-G-mRNA-Expression in Myoblasten und Muskelbiopsien

a) Je 1 µl cDNA von unstimulierten und IFN γ -stimulierten Myoblasten (Myo-, Myo+) und von Muskelbiopsien - drei nicht-myopathische Muskelgewebe (N1-N3), zwei Biopsien von Dermatomyositispatienten (D1-D2), zwei Proben von Polyomyositispatienten (P1-P2) - wurde in eine Standard-PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden α 1s und Ex6/3'UT eingesetzt und der gesamte Ansatz auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. In Spur 1 (H₂O) wurde die Negativkontrolle (Ansatz ohne cDNA) aufgetragen, in Spur 2 (Marker) 200 ng des Größenstandards (1-kb-Leiter, Gibco, BRL), in Spur 3 10 µl Amplifikat der Positivkontrolle JEG-3. Die letzten vier Spuren enthalten PCR-Amplifikate subklonierter cDNA von G1, G2, G3 und G4 als Größenvergleich und Kontrollen für die Hybridisierungen.

b)-d) Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten cDNA von HLA-G4 (b), dem für HLA-G2 spezifischen Oligonukleotid G2-3' (c) bzw. dem für HLA-G4 spezifischen Oligonukleotid G3-5 (d).

e) Je 1 µl cDNA wurde in eine Standard-PCR-Reaktion mit den β -Actin-spezifischen Oligonukleotiden #1485 und #2077 eingesetzt und 3 µl der Reaktion auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

Die Ethidiumbromidfärbung der Gele ist revertiert dargestellt.

HLA-G-mRNA war in Muskelgewebe und in Myoblasten nachweisbar. Die Expression konnte in Myoblasten durch Stimulation mit IFN γ signifikant erhöht werden. Im Muskelgewebe war G3 die vorherrschende Isoform, während die Transkripte für die löslichen G-Isoformen nicht nachgewiesen werden konnten.

5.2 HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES KANINCHENSERUMS UND EINES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS GEGEN DIE α 1-DOMÄNE VON HLA-G

Zu Beginn der Arbeit stand nur der Antikörper 87G zur Verfügung, mit dem HLA-G1 im FACS und in der Immunocytochemie nachgewiesen werden kann. Für den Nachweis im Westernblot oder die Detektion der Isoformen waren aber keine Reagenzien vorhanden. Deshalb war es zunächst das Ziel, ein Antiserum bzw. einen monoklonalen Antikörper für diese Zwecke zu generieren, und zwar zunächst gegen die in allen HLA-G-Isoformen vorkommende α 1-Domäne. Dazu wurde diese im Vektor pQE30 als rekombinantes Protein mit einem Histidinanhang [(His)₆] am N-Terminus in Bakterien exprimiert, über dieses Epitop mittels Metallchelataffinitätschromatographie gereinigt, gegen 1 M Harnstoffpuffer dialysiert und für die Immunisierung eines Kaninchens und von Mäusen eingesetzt (s. 3.9.4.2, 4.4.1, 4.4.11).

Abbildung 5.2.1 zeigt das etwa 14 kDa schwere rekombinante Protein vor und nach der Reinigung. Der Nachweis erfolgte durch Auftrag auf SDS-Polyacrylamidgele mit anschließender Silberfärbung. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse konnten auch im Westernblot mit einem gegen den (His)₆-Anhang gerichteten Antikörper bestätigt werden (nicht gezeigt). Die Expression wird durch Zugabe von IPTG zur Bakterienkultur stark induziert und erreicht ihr Maximum nach 5,5 Stunden, findet aber in geringer Menge schon in uninduzierten Bakterien statt, da die Regulation der Genexpression etwas durchlässig ist. Aliquots der Eluate wurden nach der Reinigung aufgetragen, um zum einen die Reinheit zu überprüfen, wobei sich zeigte, daß einige kontaminierende Proteine im Bereich über 30 kDa noch im Eluat enthalten waren. Zum anderen wurde durch den Auftrag von in Anwesenheit von β -ME gekochter Probe bzw. ohne β -ME ungekochter Probe überprüft, ob möglicherweise Aggregate gebildet werden oder ob eine Verschiebung der Bande eine mögliche Faltung des Proteins anzeigt. Beides war aber nicht der Fall.

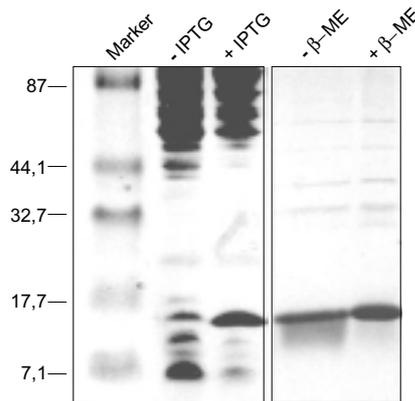


Abb. 5.2.1: Überprüfung des rekombinanten HLA-G- α 1-Polypeptids mittels Polyacrylamid-gelelektrophorese

Spur 2, 3: Das Sediment von je 300 μ l Suspension uninduzierter oder mit 1 mM IPTG für 5,5 h induzierter Bakterien wurde in 1x SDS-Auftragspuffer mit β -ME aufgenommen, aufgeköcht und auf einem 16,5%igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt. In Spur 1 sind 15 μ l Proteinmarker (Kaleidoscope Prestained Standard, broad range, BIORAD) aufgetragen.

Spur 4, 5: Je 1 μ g Säuleneluat nach der Dialyse wurde entweder mit β -ME-haltigem Auftragspuffer gekocht oder mit Auftragspuffer ohne β -ME und ungeköcht auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Gele wurden nach dem Lauf silbergefärbt.

5.2.1 HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES KANINCHENSERUMS GEGEN DIE α 1-DOMÄNE VON HLA-G

Das rekombinante HLA-G- α 1-Polypeptid wurde zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet, das vier Wochen nach der ersten Immunisierung ausgeblutet werden mußte, da eine zweite Immunisierung wegen Erkrankung des Tieres nicht durchgeführt werden konnte.

Das Kaninchenserum wurde zunächst in verschiedenen Verdünnungen im ELISA auf rekombinantem α 1-Polypeptid getestet und reagierte noch in einer Verdünnung von 1:50.000 deutlich im Vergleich mit dem Präimmunserum (nicht gezeigt), erkannte aber kein hu β ₂m mit His-Epitop. Auch im Westernblot reagierte es deutlich mit dem rekombinanten HLA-G- α 1-Polypeptid.

Transfektanten der HLA-G-Isoformen standen zu Beginn dieser Untersuchung noch nicht zur Verfügung, deshalb wurde eine FACS-Färbung von X63-Zellen durchgeführt, die mit hu β ₂m

(X63M) bzw. mit hu β_2 m und den Genen für HLA-E (X63ME), HLA-G (X63MG) oder HLA-B27 (X63MB27) transfiziert waren. Keine der Transfektanten zeigte mit dem Serum ein Signal (nicht gezeigt). Ein mit Zellysat dieser Transfektanten durchgeführter Westernblot, der mit dem Kaninchenserum gefärbt wurde, ergab eine große Anzahl unspezifischer Banden in allen Proben. In der HLA-G-Transfektante war allerdings nach längerer Exposition schwach eine Bande zu erkennen, die in den anderen Transfektanten nicht vorkam und deren Größe G1 entsprach. Banden in der Größe der HLA-G-Isoformen konnten nicht entdeckt werden, allerdings war aus den RT-PCR-Ergebnissen mit X63MG bekannt, daß HLA-G1m das vorherrschende Transkript ist und HLA-G2m/-G4 und -G3 nur schwach exprimiert werden.

Nachdem die Transfektanten der HLA-G-Isoformen charakterisiert waren (siehe Kapitel 5.3 und 5.4), konnten sie für die weitere Untersuchung des Serums eingesetzt werden. In der FACS-Analyse zeigten die .221 G1m-Transfektante sowie die B-LCL LG2- und .45-Zellen ein schwaches positives Signal, während untransfizierte .221-Zellen und U-937-Zellen sowie .221 G2-, G3- und G4-Transfektanten negativ waren (Abb. 5.2.2). Alle Zellen, die HLA-G auf der Oberfläche tragen, wurden schwach mit dem Kaninchenserum gefärbt. Kontrollfärbungen wurden mit den Ak 87G für HLA-G1-Expression und A1.4 zum Nachweis von HLA-Klasse-I-Molekülen durchgeführt.

Die Fähigkeit des Kaninchenserums, die Proteine der HLA-G-Isoformen zu erkennen, konnte nachgewiesen werden, nachdem der Antikörper 4H84 für den Nachweis aller HLA-G-Formen im Westernblot zur Verfügung stand (siehe 5.2.2.2 und Abb. 5.2.7).

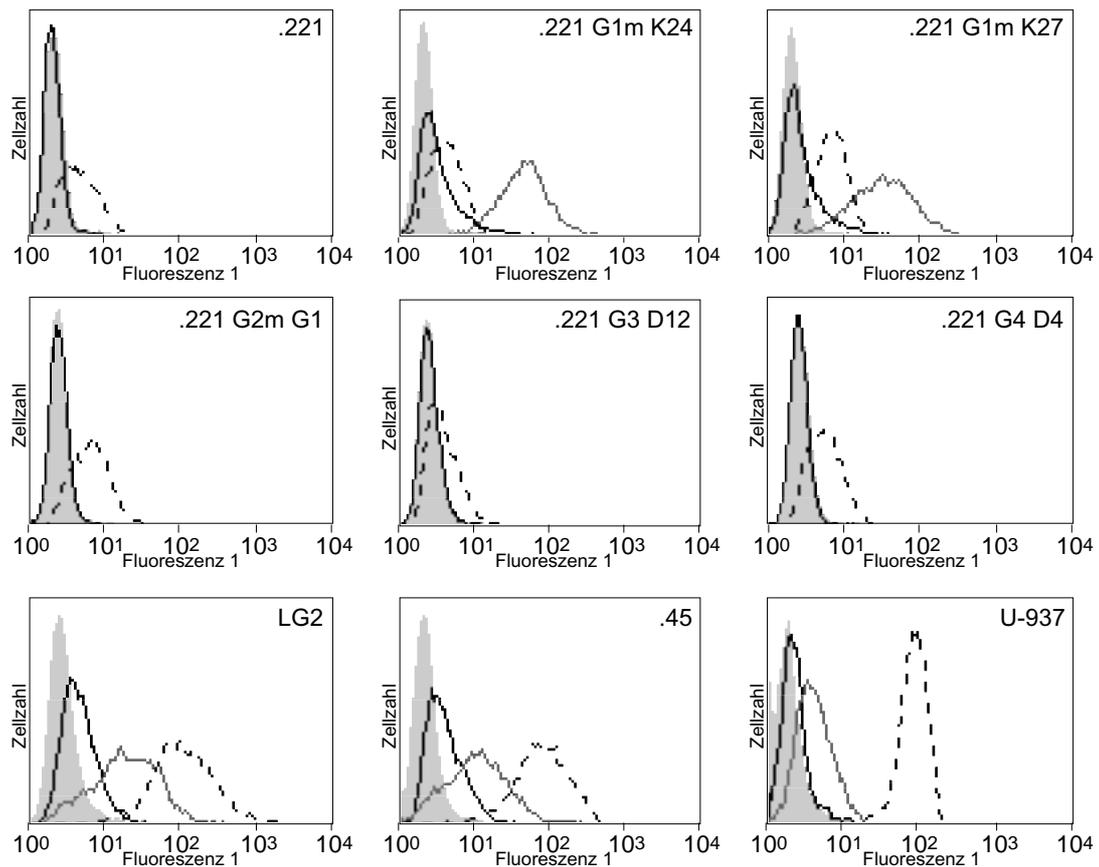


Abb. 5.2.2: FACS-Analyse der Transfektanten für die HLA-G-Isoformen mit dem HLA-G- α 1 Kaninchensereum

Je 2×10^5 Zellen von .221, den Transfektanten G1m K24 und K27, G2m G1, G3 D12, G4 D4 sowie LG2-, .45- und U-937-Zellen wurden mit Kaninchensereum in einer Verdünnung von 1:250 gefärbt (durchgezogene schwarze Linie). Als Negativkontrolle wurde die Färbung mit Präimmunsereum in der gleichen Verdünnung durchgeführt (schattiert). Weitere Kontrollen waren die Färbung von HLA-Klasse I mit A1.4 (gestrichelte Linie) und von HLA-G mit 87G (graue durchgezogene Linie).

5.2.2 UNTERSUCHUNG DER HYBRIDOME

Die Überstände der erhaltenen Hybridome wurden zunächst im FACS auf den HLA-G-Gen-Transfektanten X63MG und .221G getestet, da Transfektanten der einzelnen G-Isoformen zu diesem Zeitpunkt noch nicht etabliert waren. Hierbei erwiesen sich aber alle Überstände als negativ. Als nächstes wurde ein ELISA mit dem rekombinanten α 1-Polypeptid durchgeführt. Eine ganze Reihe an Überständen ergab ein positives Signal; viele davon reagierten aber auch in einem ELISA mit rekombinantem hu β _{2m} mit einem Histidinepitop, so daß die Reaktivität auf eine Erkennung der Histidine und nicht des α 1-Polypeptids zurückzuführen war. Ein wei-

terer ELISA wurde mit dem inzwischen vorhandenen Überstand der G1s-Transfektante und mit dem Überstand der untransfizierten .221-Zellen als Negativkontrolle durchgeführt. Keiner der Hybridomüberstände reagierte nur mit dem löslichen G1. Schließlich wurden die Überstände noch im Westernblot eingesetzt, zum einen für den Nachweis von rekombinantem α 1-Polypeptid, das von allen gleichermaßen gut erkannt wurde, zum andern für die Färbung von Zellysat der X63MG-Transfektante (beide ohne Abbildung). In diesem Lysat wurde eine ganze Reihe unspezifischer Banden nachgewiesen, aber nur ein Hybridomüberstand zeigte ein davon abweichendes Muster mit einer zusätzlichen Bande, die sonst nirgends zu sehen war. Dieses Hybridom, 2G12, wurde daraufhin näher untersucht.

5.2.2.1 CHARAKTERISIERUNG DES ANTIKÖRPERS 2G12

Der Überstand des Hybridoms 2G12 war, wie alle anderen Überstände, im FACS mit der X63MG-Transfektante negativ gewesen, hatte im ELISA nicht mit dem rekombinanten hu β _{2m} mit Histidinanhang reagiert, wohl aber mit dem rekombinanten α 1-Polypeptid, gleichermaßen gut mit dem Überstand der G1s-Transfektante, aber auch mit dem Überstand der untransfizierten .221-Zellen. Im Westernblot hatte er das rekombinante α 1-Polypeptid erkannt und mit Zellysat der X63MG-Gen-Transfektante eine zusätzliche größere Bande gezeigt, die mit den anderen Überständen nicht erhalten wurde.

Mit den mittlerweile zur Verfügung stehenden Transfektanten der HLA-G-Isoformen wurde erneut eine FACS-Analyse mit dem 2G12-Überstand durchgeführt (Abb. 5.2.3). In den vorher verwendeten HLA-G-Gen-Transfektanten X63MG und .221G war die Expression von G1, v.a. aber der alternativ gespleißten G-Formen, sehr viel schwächer als in den Einzeltransfektanten und deshalb möglicherweise für einen Nachweis nicht ausreichend gewesen. Außerdem war das Vorhandensein von Protein der Isoformen zu diesem Zeitpunkt noch nicht bestätigt worden. Wie schon das Kaninchenserum, zeigte 2G12 ein schwaches Signal mit der G1-Transfektante und färbte auch die Transfektanten der Isoformen. Allerdings war bereits die Reaktion mit den untransfizierten .221-Zellen von vergleichbarer Stärke. Mit LG2-Zellen zeigte sich eine deutliche Färbung, mit .45-Zellen nur eine sehr schwache, im Gegensatz zum Kaninchenserum, das mit diesen beiden Zelllinien etwa gleich stark reagiert hatte. Der mAk 2G12 erkennt nicht das HLA-G-Protein auf der Zelloberfläche. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit dem HLA-Klasse-I-Ak W6/32 gefärbt.

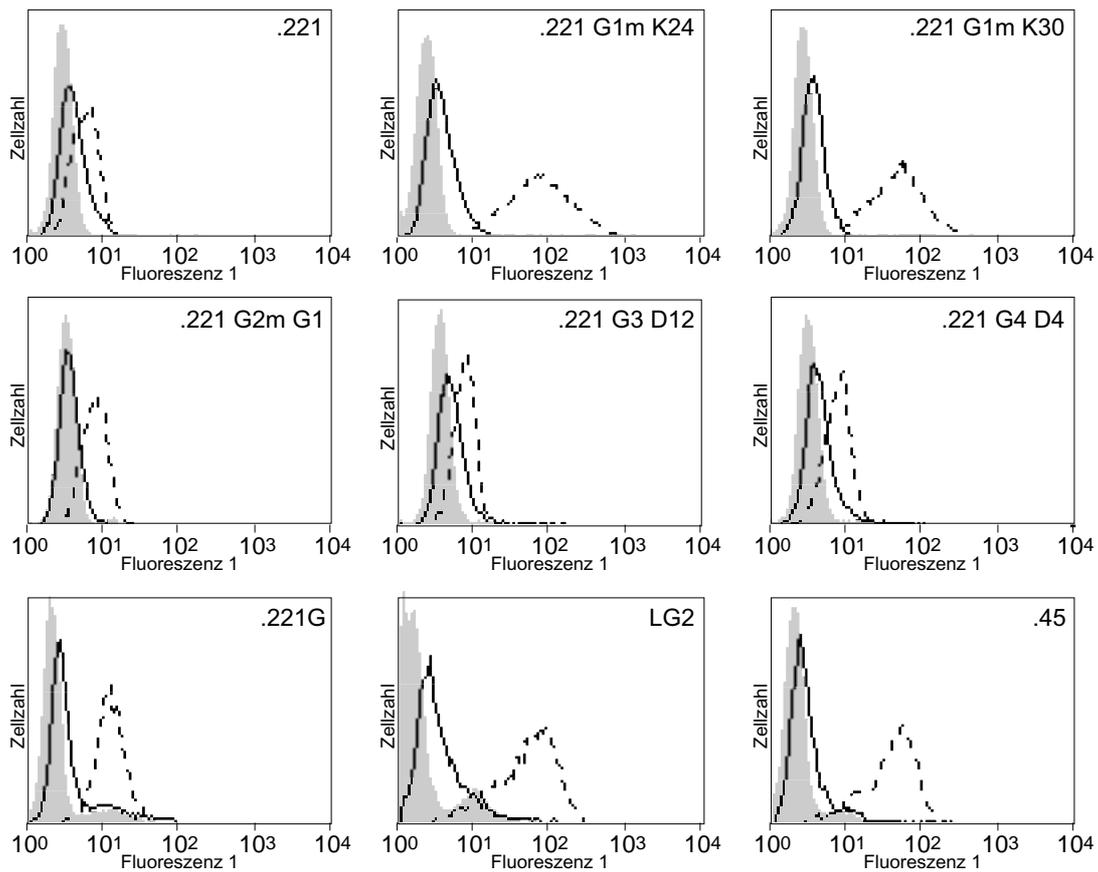


Abb. 5.2.3: FACS-Analyse der Transfektanten der HLA-G-Isoformen mit dem Hybridomüberstand 2G12

Je 2×10^5 Zellen der HLA-G-Gen-Transfektante .221G, der .221-Transfektanten G1m K24 und K30, G2m G1, G3 D12 und G4 D4 sowie von LG2- und .45-Zellen wurden mit Überstand des Hybridoms 2G12 gefärbt (durchgezogene Linie). Als Negativkontrolle ist die Färbung ohne 1. Ak (schattiert) gezeigt, als Positivkontrolle die Färbung mit W6/32 (gestrichelte Linie).

Die im Westernblot mit dem Zellysat der X63MG-Gen-Transfektante von 2G12 erkannte zusätzliche Bande konnte auch im Zellysat der .221G-Gen-Transfektante gesehen werden, zeigte sich aber auch bereits in untransfizierten .221-Zellen. Deshalb mußte zunächst gezeigt werden, daß 2G12 in der Lage ist, tatsächlich HLA-G zu erkennen. Denn auch bei Kreuzreaktion mit dem von .221-Zellen exprimierten HLA-E, die vermutet werden mußte, war das Hybridom 2G12 interessant, falls es doch die HLA-G-Isoformen erkennen könnte. Nachdem der Auftrag von Gesamtzellysat von .221-Zellen und der .221G-Gen-Transfektante sehr viele unspezifische Banden gezeigt hatte, wurden in der Folge Immunpräzipitationen durchgeführt, wobei zunächst wieder das Problem bestand, keinen Antikörper für den Nachweis von HLA-G im Westernblot zur Verfügung zu haben.

Präzipitation von frisch isolierten PBL, .221-Zellen, .221G- sowie X63MB27- und X63ME-Transfektanten mit 2G12 und Färbung mit TP25.99 zeigte deutliche Signale nur bei .221-Zellen und der .221G-Transfektante. Die zur Kontrolle durchgeführte Präzipitation mit dem Ak B9.12.1 ergab das erwartete Signal für die Klasse-I-Moleküle in allen Zellen (Abb. 5.2.4; auf die Präzipitation der .221G-Transfektante mit B9.12.1 und Färbung mit TP25.99 wurde verzichtet, da TP25.99 HLA-G nicht erkennt). Präzipitation mit B9.12.1 und Färbung mit 2G12 ergab ebenfalls nur Signale in .221-Zellen und der .221G-Transfektante, nicht aber in X63MB27, X63ME, X63MG, PBL und BeWo (ohne Abbildung). 2G12 präzipitiert also weder HLA-B27 noch HLA-E und erkennt auch nicht die Klasse-I-Moleküle der PBL (A1, A29, B44, Cw4, DR7). Auffallend ist jedoch, daß 2G12 ein Klasse-I-Molekül in .221 und der .221G-Transfektante präzipitiert, welches nicht entsprechend stark mit B9.12.1 reagiert.

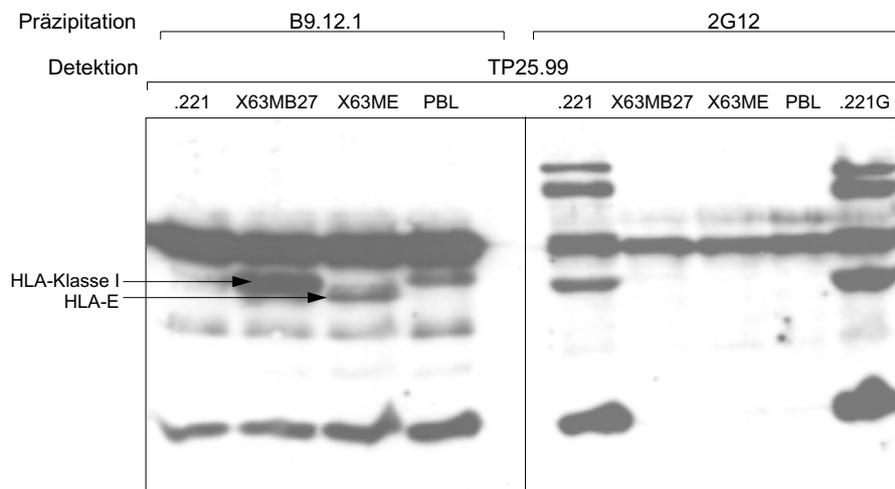


Abb. 5.2.4: Immunpräzipitation mit 2G12 und B9.12.1 und Färbung mit TP25.99

Je 1×10^7 Zellen von untransfizierten .221-Zellen, PBL sowie der HLA-G-Gen-Transfektante .221G, der hu β_2 m/HLA-B27-Gen-Transfektante X63MB27 und der hu β_2 m/HLA-E-Gen-Transfektante X63ME wurden nach NP40-Lyse mit Überstand von B9.12.1 bzw. 2G12 präzipitiert, auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit dem Ak TP25.99 gefärbt. Die Größen der HLA-Klasse-I-Moleküle bzw. von HLA-E sind durch einen Pfeil angezeigt.

Um auszuschließen, daß die mit 2G12 gefärbte Bande auf unspezifische Bindung zurückzuführen ist, wurde Lysat der .221G-Transfektante vor Zugabe des spezifischen Antikörpers zuerst mit einem irrelevanten Antikörper präzipitiert (3D11, anti-Faktor H), anschließend mit B9.12.1 bzw. 2G12 nachpräzipitiert und schließlich mit TP25.99 nachgewiesen. Dabei ergab

sich aber dasselbe Bild wie oben beschrieben, so daß Unspezifität ausgeschlossen werden konnte.

Um die Erforderlichkeit eines Antikörpers für den Nachweis zu umgehen, wurden die Gele nach Auftrennung der Immunpräzipitate schließlich silbergefärbt. Die Zelllinie LG2 sowie die Transfektanten .221G, G1m und G2m wurden mit 2G12 und als Kontrolle mit W6/32 präzipitiert. Für G1m war die Erkennung durch W6/32 aus der FACS-Analyse bekannt, für G2m war die Präzipitation mit W6/32 publiziert worden (Rouas-Freiss *et al.* 1997). In allen verwendeten Zellen zeigte sich mit beiden Antikörpern eine Bande in der Größe eines Klasse-I-Moleküls. Eine kleinere Bande für HLA-G bzw. für G2m konnte nicht gesehen werden, allerdings war zu diesem Zeitpunkt in den G2m-Transfektanten der Nachweis der Expression nur auf RNA-Ebene, nicht aber auf Proteinebene möglich. Als Negativkontrolle wurde eine Präzipitation des Lysepuffers alleine durchgeführt, um die durch die Bindung des Antikörpers an die Sepharose erhaltenen Banden von den durch die Präzipitation der Klasse-I-Moleküle hervorgerufenen unterscheiden zu können. Das Ergebnis für die Zelllinie LG2 konnte im Westernblot durch Färbung mit TP25.99 bestätigt werden (nicht gezeigt).

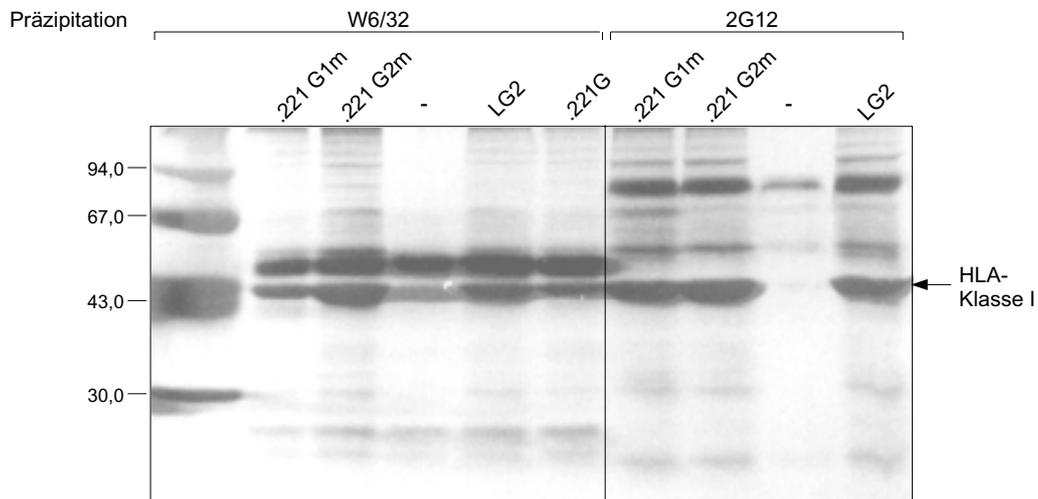


Abb. 5.2.5: Immunpräzipitationen mit 2G12 und W6/32 und Silberfärbung des Polyacrylamidgels

Je 1×10^7 Zellen von LG2-Zellen sowie von .221G, G1m- und G2m-Transfektanten wurden mit Überstand von 2G12 bzw. W6/32 präzipitiert, auf einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend silbergefärbt. Die Größe der HLA-Klasse-I-Moleküle ist durch einen Pfeil angezeigt. Zur Darstellung der von den Antikörpern stammenden Banden wurde eine Präzipitation nur mit Lysepuffer (Spur 4 bzw. 9) durchgeführt. In Spur 1 sind 5 µl Proteinstandard (Electrophoresis Calibration Kit, Pharmacia) aufgetragen.

Das rekombinante α 1-Polypeptid, das für die Immunisierung verwendet worden war, war in Bakterien hergestellt worden und deshalb unglycosyliert. Es stellte sich folglich die Frage, ob die in eukaryontischen Zellen stattfindende Glycosylierung der Klasse-I-Moleküle für die schwache Erkennung durch 2G12 verantwortlich sein könnte. Deshalb wurde nach der Immunpräzipitation ein EndoF-Verdau durchgeführt, um feststellen zu können, ob durch Abspaltung der Zucker die Stärke der Erkennung zunimmt. Präzipitiert wurden Lysate von .221- und LG2-Zellen mit B9.12.1, die Präzipitate mit EndoF verdaut bzw. als Kontrolle unverdaut aufgetragen und mit den Antikörpern 2G12 bzw. TP25.99 gefärbt. Während die Stärke der Erkennung mit TP25.99 sich nach dem Verdau nicht verändert, sieht man mit 2G12 bei .221-Zellen eine deutliche Zunahme, die auch in LG2-Zellen auftritt (Abb. 5.2.6). EndoF-Verdau von Präzipitaten der X63ME- und MG-Transfektanten oder von PBL führte aber zu keiner verstärkten Erkennung durch 2G12 (nicht gezeigt). In allen Untersuchungen erkannte der mAk Moleküle der Größe von HLA-Klasse-Ia und HLA-E, er reagierte aber nie mit HLA-G.

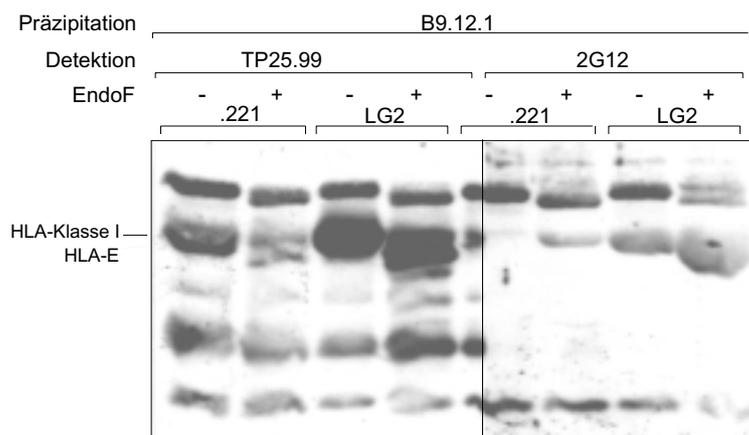


Abb. 5.2.6: Der mAk 2G12 reagiert stärker mit nicht-glycosylierten HLA-Klasse-I α -Ketten

Je 4×10^7 Zellen von LG2 und .221 wurden nach NP40-Lyse in je zwei Aliquots mit B9.12.1 präzipitiert. Ein Aliquot wurde anschließend mit EndoF verdaut, das andere wurde derselben Prozedur, nur ohne Zugabe des Enzyms, unterzogen und diente als Kontrolle. Die Aliquots wurden erneut geteilt, auf ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetragen, und mit den Antikörpern TP25.99 bzw. 2G12 gefärbt.

5.2.2.2 NACHWEIS DER HLA-G-PROTEINE MIT DEM AK 2G12 UND DEM KANINCHENSERUM

Nachdem der Antikörper 4H84 für den Nachweis aller HLA-G-Isoformen im Westernblot zur Verfügung stand (Crisa *et al.* 1997) und die Transfektanten der HLA-G-Isoformen auch auf Proteinebene charakterisiert waren (Kap. 5.4), konnten das Kaninchenserum und der Ak 2G12, dessen Isotyp mittlerweile als IgM bestimmt worden war, auf ihre Fähigkeit, die HLA-G-Isoformen zu erkennen, getestet werden. Der Versuch, in Zellysaten der Transfektanten im Westernblot HLA-G nachzuweisen, hatte kein Ergebnis gebracht. Erst nach Immunpräzipitation und anschließender Färbung mit dem Ak 4H84 konnte gezeigt werden, daß das Kaninchenserum in der Lage ist, alle Isoformen von HLA-G gleichermaßen gut zu präzipitieren, während 2G12 HLA-G1m und die Isoformen G2m und G3 präzipitiert, allerdings sehr viel schwächer als das Kaninchenserum. Ein Signal für die G4-Isoform konnte für 2G12 auch nach längerer Exposition nicht gesehen werden, was möglicherweise mit der geringeren Menge an G4-Protein im Lysat zusammenhängt (Abb. 5.2.7).

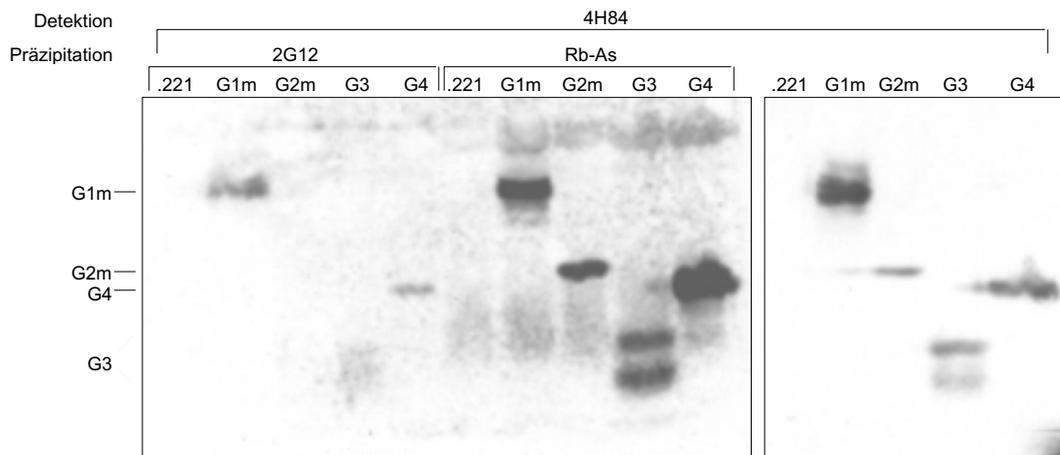


Abb. 5.2.7: Nachweis der Immunpräzipitation der HLA-G-Isoformen mit dem Ak 2G12 und dem Kaninchenserum

Je 1×10^7 Zellen von untransfizierten .221-Zellen sowie von G1m-, G2m-, G3- und G4-Transfektanten wurden nach NP40-Lyse mit dem Kaninchenserum (Rb-As) bzw. dem Hybridomüberstand 2G12 präzipitiert, auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit dem Ak 4H84 gefärbt. Zur Abschätzung der in den Transfektanten vorhandenen Menge an Protein wurden auf einem zweiten Gel je ein Aliquot des Lysats, das der Menge von 1×10^6 Zellen entsprach, aufgetragen und ebenfalls mit 4H84 nachgewiesen.

Die $\alpha 1$ -Domäne von HLA-G wurde als rekombinantes Protein in Bakterien hergestellt und für die Immunisierung eines Kaninchens und von Mäusen benutzt. Das erhaltene Kaninchenserum war in der Lage, alle HLA-G-Isoformen gleichermaßen gut zu präzipitieren, ist aber nicht HLA-G-spezifisch und erkannte HLA-G nicht auf der Zelloberfläche. Der erhaltene monoklonale Antikörper 2G12 (IgM-Isotyp) zeigte dasselbe Reaktionsmuster. In der Immunpräzipitation erkannte er zwar die HLA-G-Isoformen, aber sehr viel schwächer als das Serum. Wegen der schwachen Reaktivität für HLA-G im Vergleich mit dem mAk 4H84 sind die von mir hergestellten Reagenzien nur bedingt zum Nachweis der HLA-G-Polypeptide geeignet.

5.3 CHARAKTERISIERUNG DER HLA-G-TRANSFEKTANTEN

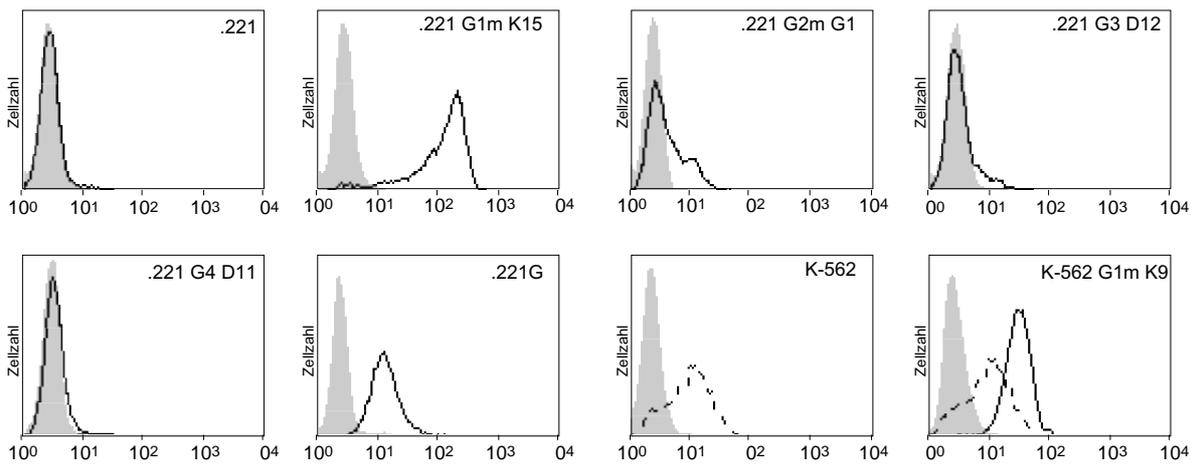
Die zu Beginn der Arbeit zur Verfügung stehenden HLA-G-Gen-Transfektanten .221G und X63MG enthalten das HLA-G-Gen und exprimieren, wie durch RT-PCR mit anschließender Klonierung und Sequenzierung bestätigt wurde, alle G-Isoformen, allerdings sind die verkürzten Polypeptide im Zellysat kaum nachweisbar. Für die Untersuchung der Effekte der einzelnen Isoformen war es aber notwendig, Einzeltransfektanten der Isoformen herzustellen, besonders in Hinblick auf die zu der Zeit auftretenden Hinweise auf eine besondere Rolle von HLA-G bei der Erkennung durch inhibitorische Rezeptoren auf NK-Zellen in der Plazenta. Dazu wurde die entsprechende Volle-Länge-cDNA der verschiedenen alternativ gespleißten Transkripte in den episomalen Vektor pREP eingebaut und in die Klasse-I-negative Zelllinie .221 transfiziert. Für HLA-G1m erfolgte die Transfektion auch in die ebenfalls als Klasse-I-negativ beschriebene Zelllinie K-562. Es wurden jeweils mehrere unabhängige Klone für eine HLA-G-Isoform analysiert.

Zunächst wurden die HLA-G-Transfektanten (.221 mit HLA-G1m, -G2m, -G3, und -G4 sowie K-562-G1m) mittels FACS-Analyse auf Zelloberflächenexpression hin untersucht. Als HLA-G-spezifischer Antikörper stand zu diesem Zeitpunkt nur der mAk 87G zur Verfügung, von dem nicht bekannt war, ob er die Isoformen auf der Zelloberfläche überhaupt erkennen würde. Deshalb wurden als weitere Antikörper W6/32, B9.12.1 (erkennen HLA-Klasse-I-Moleküle, wenn sie mit β_2m assoziiert sind) und BBM1 (erkennt hu β_2m) eingesetzt, da, neben G1m, zumindest von HLA-G2m beschrieben worden war, daß es mit β_2m assoziiert sei und von W6/32 erkannt würde; des weiteren A1.4 und TP25.99 (erkennen Klasse-I-Moleküle, außer

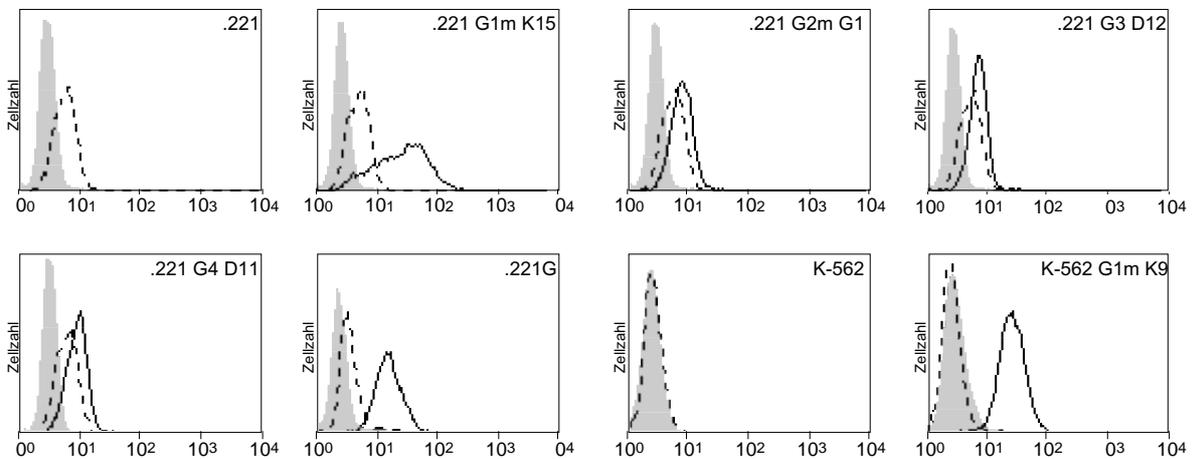
HLA-G und unabhängig von β_2m). Es zeigte sich, daß die Expression von HLA-G1m auf der Oberfläche von .221- und K-562-Zellen mit den Ak 87G, W6/32, B9.12.1 und BBM1 eindeutig nachweisbar war, und die am besten exprimierenden Klone wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die Transfektanten der Isoformen reagierten hingegen nicht mit 87G. Auch die Inkubation der Zellen bei 26°C üN, die bei HLA-E zur Oberflächenexpression bzw. zur Verstärkung der Expression führen kann, zeigte keinen Effekt (nicht gezeigt). Mit den übrigen Antikörpern sah man im Vergleich mit der untransfizierten .221-Zelle bei einigen der untersuchten Klone eine schwache Zunahme, die durch Inkubation bei 26°C verstärkt war und, wie sich später herausstellte, auf HLA-E zurückzuführen war (siehe Abschnitt 5.5).

Da die Ergebnisse für W6/32 und B9.12.1 sowie für A1.4 und TP25.9 übereinstimmten, wird jeweils nur das Ergebnis für einen der beiden Antikörper und nur je einen Klon gezeigt.

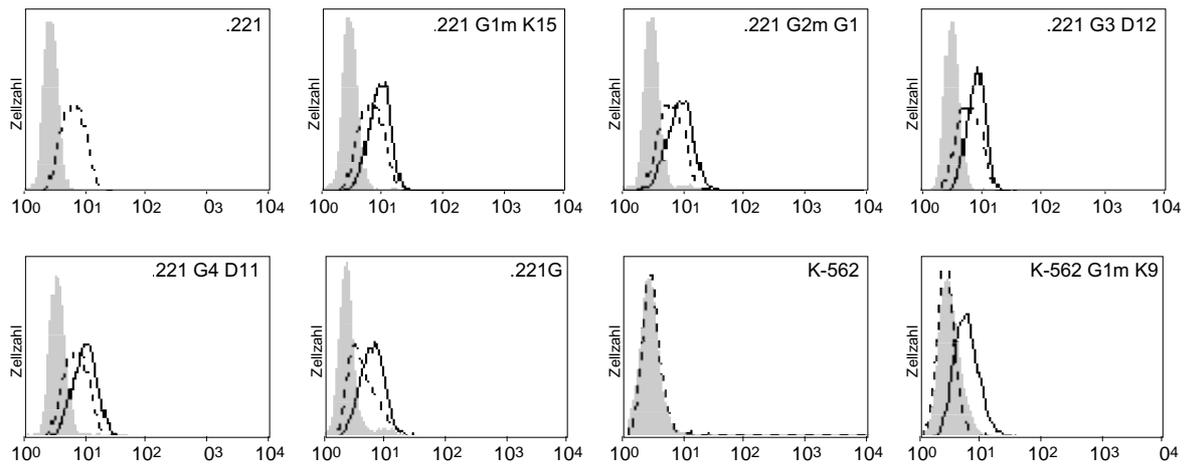
87G



W6/32



A1.4



BBM1

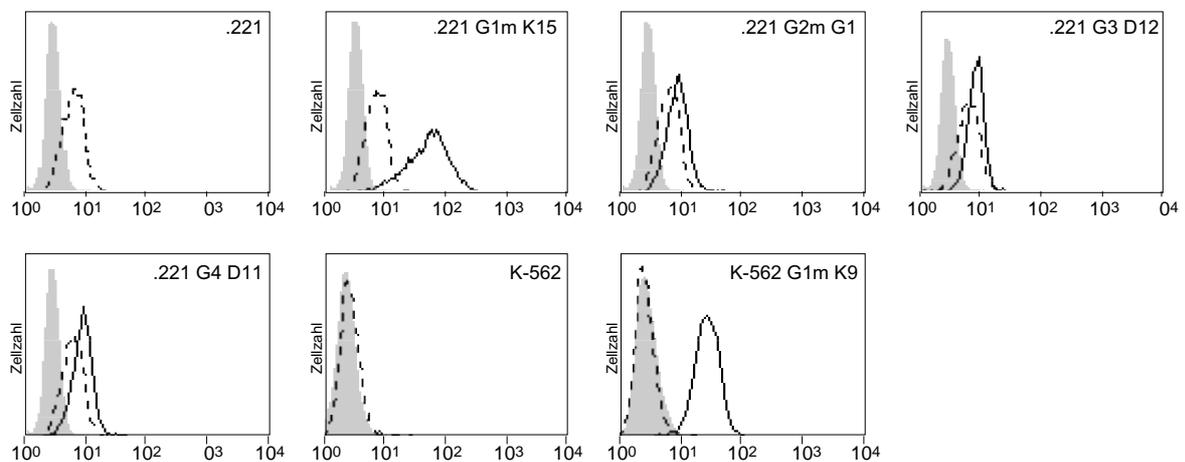


Abb. 5.3.1: Untersuchung der Expression der HLA-G-Transfektanten mittels FACS-Analyse

Je 2×10^5 Zellen der .221-Transfektanten G1m K15, G2m G1, G3 D12 und G4 D11 und der K-562-Transfektante G1m K9 (jeweils durchgezogene Linie) sowie von untransfizierten .221- und K-562-Zellen (jeweils gestrichelte Linie) wurden mit den Antikörpern 87G, W6/32, A1.4 und BBM1 gefärbt. Als Negativkontrolle erfolgte die Inkubation ohne 1. Antikörper (schattiert dargestellt). Auf der x-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz 1 angegeben.

Um zu prüfen, ob die mit W6/32, BBM1 und A1.4 etwas variable, aber doch reproduzierbar erhaltene schwache Zunahme der Zelloberflächenexpression auf zu geringe Menge der Isoformen zurückzuführen war, wurde für diese zunächst die Expression auf RNA-Ebene im Northernblot überprüft. Dabei wurde als Sonde die Digoxigenin-markierte Volle-Länge-G4-cDNA verwendet. Diese enthält nicht die $\alpha 3$ -Domäne, die innerhalb der Klasse-I-Moleküle der am meisten konservierte Bereich ist. Dennoch war eine Kreuzreaktion dieser Sonde mit der

von .221-Zellen exprimierten HLA-E-mRNA festzustellen, was für die Untersuchung der Transfektanten aber kein Problem darstellte, da zum einen die Reaktion mit HLA-E deutlich schwächer war als mit HLA-G und erst bei längerer Exposition sichtbar wurde, und außerdem die beiden HLA-E-Transkripte deutlich größer waren (1,8 kb und 2,7 kb) als die nachzuweisenden HLA-G-Transkripte (Abb. 5.3.2).

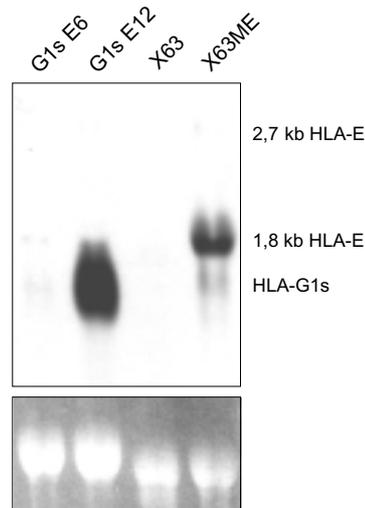


Abb. 5.3.2: Charakterisierung der HLA-G4-Sonde im Northernblot

Je 5 µg Gesamt-RNA zweier .221 G1s-Transfektanten (Klon E6 und E12) sowie von untransfizierten X63-Zellen und der X63ME-Transfektante wurden auf 1,2%igen Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Hybond-N⁺-Membran geblottet und mit der Digoxigenin-markierten G4-cDNA als Sonde hybridisiert. Die Menge der aufgetragenen RNA ist durch die Ethidiumbromidfärbung der 28S rRNA angezeigt.

Für HLA-G2m zeigten alle untersuchten Klone vergleichbare Mengen an Transkript (Abb. 5.3.3 a), während bei HLA-G2s, HLA-G3 und HLA-G4 deutlich unterschiedliche Mengen an mRNA nachgewiesen wurden (Abb. 5.3.3 b, c und d). Die am stärksten exprimierenden Klone wurden jeweils ausgewählt und für weitere Untersuchungen verwendet.

Der Nachweis von löslichem HLA-G1 (G1s) erfolgte mittels ELISA. Da bekannt war, daß G1s mit β_2m assoziiert ist, wurde die ELISA-Platte mit W6/32 beladen, mit dem Überstand der G1s-Transfektanten inkubiert und der Nachweis über einen mit Meerrettichperoxidase gekoppelten zweiten Antikörper gegen hu β_2m geführt. Es wurden nur zwei deutlich positive Klone erhalten (G1s E12 und E6), von denen sich einer als instabil erwies (E6) und die Expression einstellte. Der Nachweis der mRNA dieser Klone ist in Abbildung 5.3.2 gezeigt. Der Nachweis von G2s im Überstand konnte auf diese Weise nicht erbracht werden, wobei zu diesem Zeitpunkt nicht

zu entscheiden war, ob G2s nicht mit β_2m assoziiert ist, oder ob es nicht im Überstand enthalten ist.

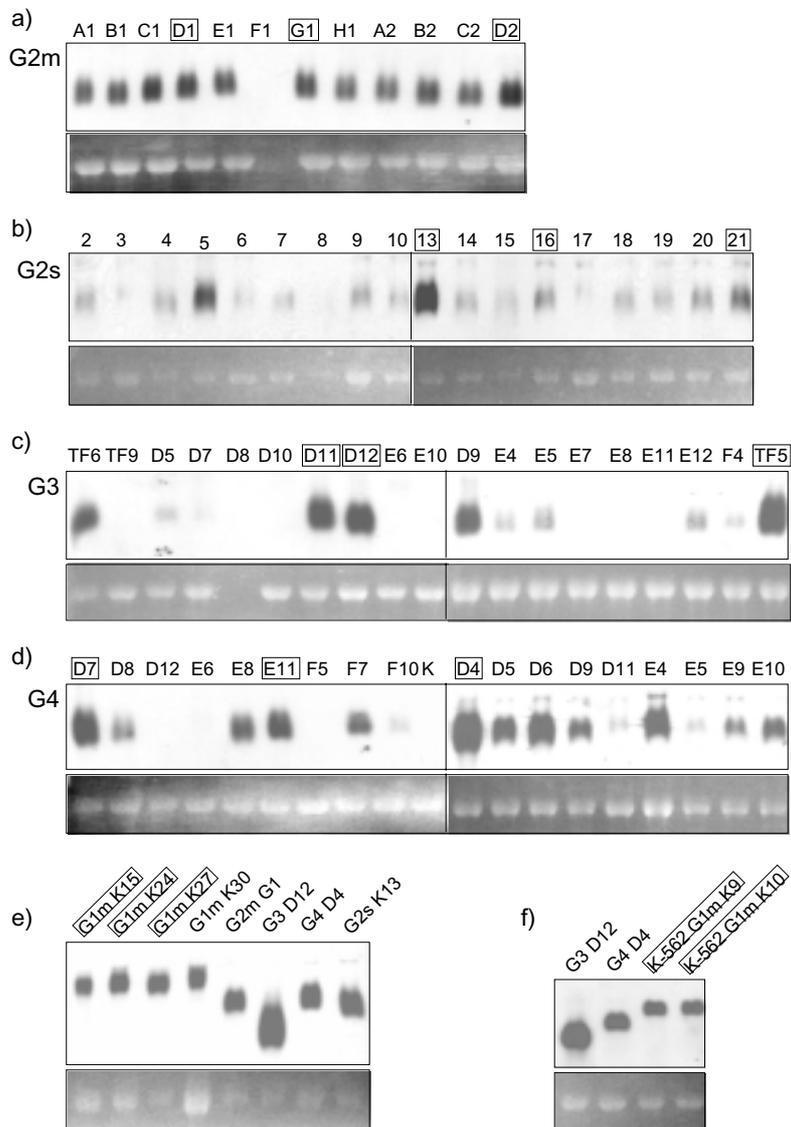


Abb. 5.3.3 : Untersuchung der Expression der HLA-G-Transfektanten auf RNA-Ebene

Je 5 μ g Gesamt-RNA der Transfektanten wurden auf 1,2%igen Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Hybond-N⁺-Membran geblottet und mit der Digoxigenin-markierten G4-cDNA als Sonde hybridisiert. Die Abschnitte a)-d) zeigen die jeweils angegebenen Transfektanten von G2m, G2s, G3 und G4 in der Zelllinie .221. In d) ist außerdem als Negativkontrolle RNA der untransfizierten .221-Zellen aufgetragen (Spur K). Für .221 G1m wurden die laut FACS-Analyse am besten exprimierenden Klone aufgetragen, neben je einem G2m-, G3-, G4- und G2s-Klon als Größenvergleich (e). In Bild f) sind die beiden nach FACS-Färbung besten G1m-Klone in der Zelllinie K-562 neben je einem G3- und G4-Klon in .221 zum Vergleich aufgetragen. Die Menge der aufgetragenen RNA ist durch die Ethidiumbromidfärbung der 28S rRNA angezeigt. Klone, die in weiteren Experimenten verwendet wurden, sind mit einem Kästchen versehen.

Die Instabilität der Transfektanten erwies sich im Verlauf der Arbeit als problematisch. Obwohl ständig in Selektionsmedium gezogen, stellten manche von ihnen die Expression ein (Abb. 5.3.4). Die G1m-Transfektante K15 wurde daraufhin im FACS sortiert und so eine stark exprimierende G1m⁺-Zelllinie erhalten (G1m K15f). Der Nachweis für die Isoformen erfolgte im Northernblot oder später auch im Westernblot.

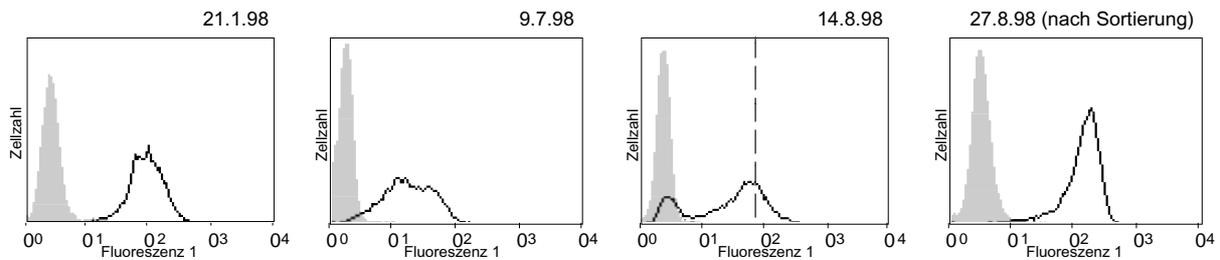


Abb. 5.3.4: Expressionsverlauf der G1m-Transfektante K15 und Selektion der stark exprimierenden G1m⁺-Transfektante K15f durch Sortierung im FACS

Jeweils 2×10^5 Zellen der .221 G1m-Transfektante K15 wurden in bestimmten Zeitabständen mit dem HLA-G-spezifischen Ak 87G gefärbt. Nachdem der Klon in der Färbung zwei Gipfel zeigte, wurden die 18% am stärksten G1m-exprimierenden Zellen per FACS aussortiert und als Klon K15f weitergezogen.

Einzeltransfektanten der HLA-G-Isoformen (G1m, G1s, G2m, G2s, G3, G4) wurden durch Klonierung der Volle-Länge-cDNA in den episomalen Vektor pREP und Transfektion in die Klasse-I-negative Zelllinie .221 (bzw. für G1m auch in K-562) hergestellt. In der FACS-Analyse wurde nur G1m von den verwendeten Antikörpern 87G, W6/32, B9.12.1 und BBM1 erkannt, nicht aber die Transfektanten der Isoformen G2m, G3 und G4. Der Nachweis der Expression konnte für die Isoformen G2m, G2s, G3 und G4 zunächst nur auf RNA-Ebene im Northernblot erbracht werden, der Nachweis von Protein für G1m in der FACS-Analyse und für G1s im ELISA.

5.4 EXPRESSION DER HLA-G-ISOFORMEN

5.4.1 NACHWEIS DER PROTEINEXPRESSION IN DEN HLA-G-TRANSFEKTANTEN

Der Nachweis der Expression der HLA-G-Isoformen G2m, G2s, G3 und G4 war anfänglich nur auf RNA-Ebene möglich gewesen (s. Abschnitt 5.3). Der Nachweis des Proteins und die Frage nach der Zelloberflächenexpression der Isoformen waren bislang aber unbeantwortet geblieben. Nachdem uns der Antikörper 4H84 zur Verfügung stand, von dem gezeigt worden war, daß er im Westernblot alle HLA-G-Isoformen erkennt, konnte die Klärung dieser Fragen in Angriff genommen werden (Crisa *et al.* 1997).

Zunächst wurden Zellysate der Transfektanten der HLA-G-Isoformen aufgetragen, um im Westernblot den Nachweis der Proteine zu erbringen (Abb. 5.4.1 a). Die verschiedenen HLA-G-Polypeptide waren in den Lysaten der jeweiligen Transfektanten nachweisbar, wobei der Größenunterschied zwischen G2m und G4 auffallend war. G2m läuft deutlich höher als G4, obwohl dieses nach Vorhersage aus der Aminosäuresequenz nur unwesentlich kleiner sein sollte (M_r 26 für G2m, M_r 25 für G4, McMaster *et al.* 1998). Dies kann auf Unterschiede in der Glycosylierung zurückzuführen sein. Die untransfizierten .221-Zellen zeigten kein Signal, ebenso wie die Zelllinien LG2, .174 und .45. In JEG-3-Zellen und der HLA-G-Gen-Transfektante .221G war das G1m-Protein am stärksten nachzuweisen. Erst nach längerer Exposition konnten in beiden Zellen Banden für G2m und, sehr schwach, G3 gesehen werden (rechter Bildteil). G4-Protein konnte in JEG-3 hier nicht nachgewiesen werden, in der .221G-Transfektante ähnlich schwach wie G3. Diese Ergebnisse des Westernblot für JEG-3 und .221G stimmen auch mit den RT-PCR-Ergebnissen für diese Zellen überein (siehe z.B. Abb. 5.1.1 für JEG-3).

Auch in den K-562-G1m-Transfektanten ließ sich das Protein mit dem Ak nachweisen, nicht aber in untransfizierten K-562-Zellen (Abb. 5.4.1 b). Als Kontrolle für den Nachweis von G1m war Lysat einer .221-G1m-Transfektante aufgetragen, die deutlich mehr Protein exprimiert. Es ist anzunehmen, daß das hier und auch in späteren Westernblots auffallende Auftreten mehrerer Banden, das sich auch als etwas variabel erwies, auf unterschiedliche Glycosylierung zurückzuführen ist, wie sie für G1m in Cytotrophoblastzellen beschrieben worden ist (McMaster *et al.* 1998).

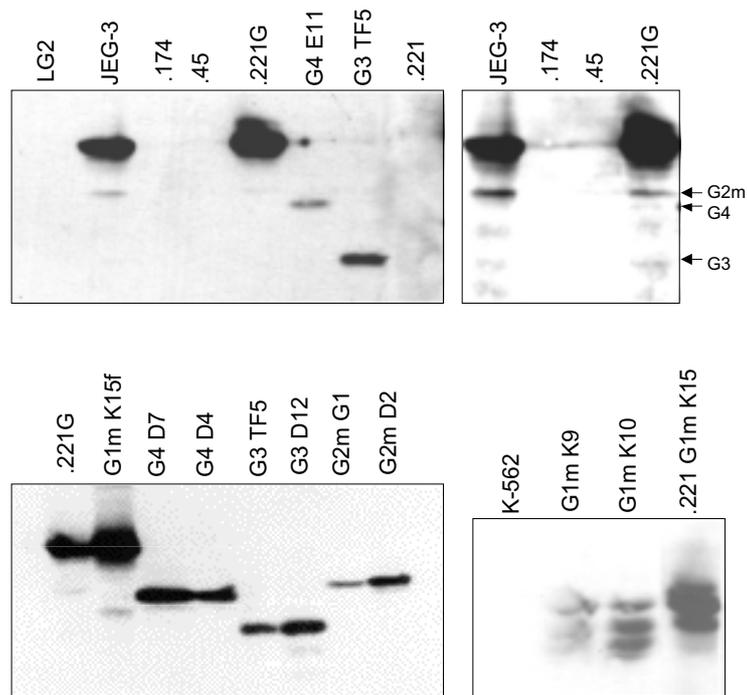


Abb. 5.4.1: Nachweis der HLA-G-Isoformen in Zellysat mit dem Antikörper 4H84

Je 100 µg Protein der angegebenen HLA-G-Transfektanten bzw. Zelllinien wurden auf 12,5%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und mit dem Antikörper 4H84 gefärbt. Der rechte obere Bildteil zeigt eine längere Exposition für die Zelllinien JEG-3, .174, .45 und .221G, die Größen der Proteine von G2m, G4 und G3 sind mit Pfeilen angegeben.

Von den G1s-Transfektanten war schon mittels ELISA gezeigt worden, daß im Kulturüberstand das Protein nachweisbar ist. Während dieses auch nach Auftrag von Kulturüberstand im Westernblot mit 4H84 nachweisbar war, zeigte der Auftrag von Zellysat und Überstand der G2s-Transfektanten, daß das G2s-Protein nur im Zellysat, nicht aber im Überstand nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.4.2). Im Zellysat der G1s-Transfektante lag der Großteil des Proteins in unreifem Zustand vor, und nur ein geringer Anteil wurde sezerniert, wie der Vergleich von Lysat und gereinigtem G1s-Protein in Abbildung 5.4.6 zeigt. Die G2s-Transfektanten exprimierten drastisch weniger Protein, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß der davon sezernierte Anteil für einen Nachweis des löslichen G2-Proteins unzureichend war.

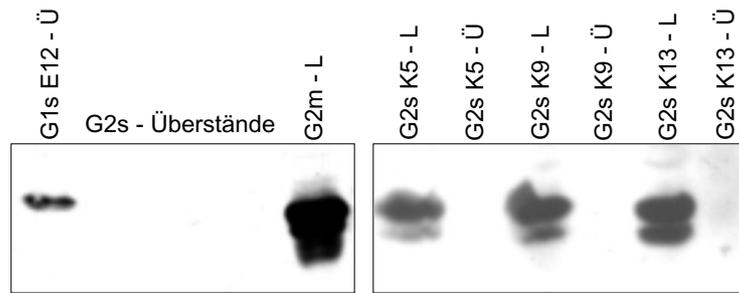


Abb. 5.4.2: Nachweis von G1s im Kulturüberstand und G2s im Zellysat

Je 100 µg Protein (-L) bzw. 28 µl Zellkulturüberstand (-Ü) von G1s-, G2s- und, als Vergleich, einer G2m-Transfektanten wurden auf einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und mit dem Antikörper 4H84 gefärbt.

Des weiteren wurde überprüft, ob 4H84 auch für den Einsatz im FACS geeignet ist (Abb. 5.4.3), erwies sich dort aber als negativ. Nur bei der stärker exprimierenden, sortierten G1m-Transfektante G1m K15f (s. Abb. 5.3.4) könnte man eine sehr schwache Reaktion annehmen.

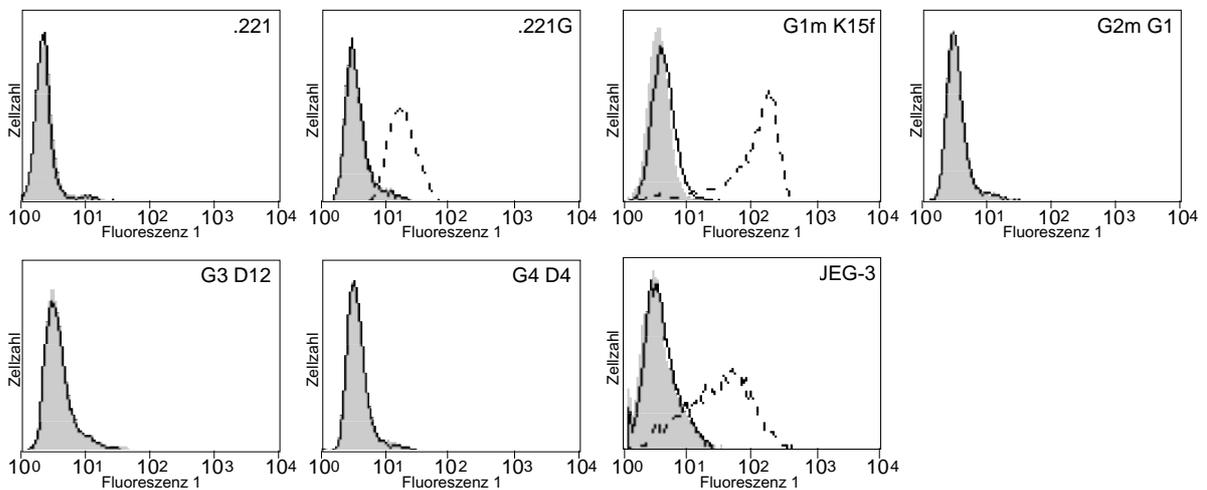


Abb. 5.4.3: FACS-Analyse mit dem Antikörper 4H84

Je 2×10^5 Zellen von .221, .221 G1m, G2m, G3 und G4 und JEG-3 als Positivkontrolle wurden mit dem Ak 4H84 gefärbt (durchgezogene Linie) bzw., als Negativkontrolle, nur mit dem zweiten Antikörper inkubiert (grau schattiert). Als Vergleich ist die Stärke der HLA-G1m-Expression durch Färbung mit dem Ak 87G (gestrichelte Linie) angegeben.

Deshalb wurde der Antikörper für die Immunpräzipitation eingesetzt, um zu überprüfen, ob er überhaupt in der Lage ist, HLA-G- β_2m -Peptidkomplexe zu erkennen. Zu diesem Zweck wurde die G1m-Transfektante K15f für die Präzipitation unter verschiedenen Lysebedingungen verwendet (Abb. 5.4.4 a). Dabei wurden deutlich weniger Zellen eingesetzt (4×10^6) als später für die Präzipitation der Isoformen (1×10^7), da die Expression der G1m-Transfektante K15f erheblich stärker war als die der Isoformen. Bei dieser Präzipitation wurden dann 1×10^7 Zellen einer G1-Transfektante verwendet, die eine den Isoformen vergleichbarere Menge an Protein exprimiert. Die Präzipitation von G1m mit W6/32 nach der üblichen Lyse mit 0,5% NP40 wurde als Kontrolle mitgeführt. Es zeigte sich, daß unter allen verwendeten Lysebedingungen das G1m-Protein von 4H84 präzipitiert werden kann. Nach Lyse mit NP40 bei hoher NaCl-Konzentration war die präzipitierbare Menge an G1m-Protein am geringsten, während Lysebedingungen mit hoher SDS-Konzentration in Kombination mit einem nicht-ionischen Detergens (Digitonin) zur Präzipitation einer mit dem W6/32-Präzipitat vergleichbaren Menge an G1m-Protein führte. 4H84 erkennt HLA-G-Polypeptide normalerweise nur in denaturierter Form im Westernblot, nicht aber den HLA-G- β_2m -Peptidkomplex auf der Zelloberfläche, den er erst nach stark denaturierenden Lysebedingungen erkennen konnte. Das bedeutet aber, nach Vergleich der präzipitierten Mengen unter milderen und stark denaturierenden Bedingungen, daß ein großer Anteil des Proteins noch in einer zugänglicheren Form in der Zelle vorliegt. Für die Präzipitation der Isoformen wurden als Lysebedingungen die stark denaturierende Lyse mit SDS und Digitonin bzw. eine Bedingung mit NP40 und geringerer Menge an SDS gewählt (Abb. 5.4.4 b; entspricht Spur 4 für G1m), die sich für die Isoformen als geeigneter erwies. Alle Isoformen konnten mit 4H84 präzipitiert werden, den für G1m gesehenen Effekt, daß unter stark denaturierenden Bedingungen mehr präzipitiert wird, zeigten sie jedoch nicht, was darauf hinweist, daß sie nicht in einer für den Antikörper unzugänglichen komplexen Form wie G1m vorliegen. In Spur 8 (Lyse mit Harnstoff als denaturierendem Agens) war entweder unter diesen Bedingungen keine Bindung des Ak erfolgt oder das Präzipitat verlorengegangen.

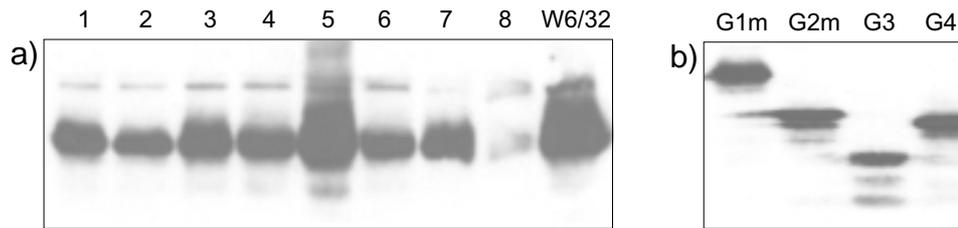


Abb. 5.4.4: Immunpräzipitation von G1m mit 4H84 nach unterschiedlichen Lysebedingungen und Präzipitation der HLA-G-Isoformen

a) Je 4×10^6 Zellen der G1m-Transfektante K15f wurden unterschiedlichen Lysebedingungen unterzogen: 1% NP40 mit 150 mM NaCl (Spur 1), 1% NP40 mit 500 mM NaCl (Spur 2), 1% NP40 ohne NaCl (Spur 3), 1% NP40 mit 150 mM NaCl und 0,1% SDS (Spur 4), 0,1% Digitonin mit 2% SDS und 1% NP40 (Spur 5), 0,5% NP40 mit 150 mM NaCl und EDTA (Spur 6, W6/32 und b), 2% SDS (Spur 7), 8 M Harnstoff als denaturierendes Agens (Spur 8). Die Lysate wurden mit dem mAk 4H84 präzipitiert, die Präzipitate auf einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Übertragung auf Nitrocellulosemembran mit demselben Ak gefärbt.

b) Für die Präzipitation wurden 1×10^7 Zellen von .221 G1m, G2m, G3 und G4 nach Lyse mit 1% NP40, 150 mM NaCl und 0,1% SDS verwendet.

5.4.2 ENDOH-SENSITIVITÄT DER HLA-G-ISOFORMEN

Ein Merkmal reifer Oberflächenproteine ist die Resistenz gegen die Abspaltung unreifer Zucker durch Endonuklease H. Deshalb wurden Lysate der HLA-G-Isoformen sowie das sezernierte G1s-Protein als Kontrolle einer Inkubation mit diesem Enzym unterzogen, um Hinweise darauf zu erhalten, ob diese Proteine überhaupt auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Abb. 5.4.5). Es zeigte sich, daß das G1s-Protein aus dem Kulturüberstand wie erwartet vollständig und das G1m-Protein größtenteils resistent ist. Für die Isoformen konnte kein Anteil an EndoH-resistentem Protein nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit der Zelloberflächenexpression bzw. Sekretion der HLA-G-Moleküle.

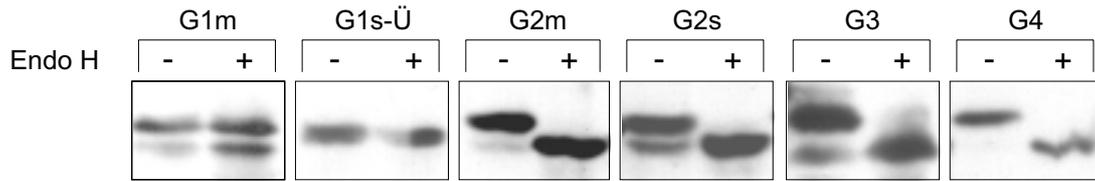


Abb. 5.4.5: EndoH-Verdau von Zellysaten der HLA-G-Transfektanten bzw. von Überstand der G1s-Transfektante

100 µg Zellysat bzw. 25 µl Überstand der G1s-Transfektante wurden entweder mit EndoH behandelt oder, ohne Zugabe von Enzym, als Kontrolle mitgeführt. Nach Auftrennung auf einem 10%igen Polyacrylamidgel und Übertragung auf Nitrocellulosemembran erfolgte die Färbung mit dem Ak 4H84.

5.4.3 CHARAKTERISIERUNG VON mAk IN BEZUG AUF IHRE BINDUNG AN DIE HLA-G-ISOFORMEN

Die FACS-Analyse der HLA-G-Transfektanten mit den Ak 87G und W6/32 hatte nur für G1m ein positives Signal gezeigt (s. 5.3.1). Nachdem nun 4H84 für den Nachweis zur Verfügung stand, wurden auch diese Antikörper, die für die Färbung im Westernblot nicht eingesetzt werden konnten, für die Immunpräzipitation verwendet (Abb. 5.4.6). Es zeigte sich, daß beide gut für die Präzipitation von G1m geeignet sind. Während eine Erkennung der Isoformen durch 87G nicht nachweisbar war, war W6/32 in der Lage, alle HLA-G-Proteine zu erkennen. W6/32 ist beschrieben als Ak, der die Klasse-I-schwere-Kette erkennt, wenn diese mit β_2m assoziiert ist. Das Epitop beinhaltet Positionen in der $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Domäne der schweren Kette und Positionen in β_2m , wobei der Aminoterminus des β_2m eine wichtige Rolle spielt (Tanabe *et al.* 1992; Shields und Ribaldo 1998). Es war deshalb erstaunlich, daß die Isoformen, v.a. G3, das nur die $\alpha 1$ -Domäne enthält, mit diesem Ak präzipitiert werden konnten. Entweder sind die Isoformen tatsächlich mit β_2m assoziiert, was für G2m beschrieben wurde (Rouas-Freiss *et al.* 1997), oder aber sie werden nicht durch W6/32 direkt erkannt, sondern mit einem anderen Molekül kopräzipitiert. Auf diesen Punkt wird in Abschnitt 5.6 nochmals eingegangen. Die Färbung je eines Aliquots des Präzipitats mit TP25.99 wurde als Kontrolle durchgeführt. W6/32 präzipitiert das endogen in .221 vorhandene HLA-E, und dieses wird von TP25.99 erkannt, so daß ein Verlust des Präzipitats hätte ausgeschlossen werden können, falls für eine der G-Isoformen keine Bande zu sehen gewesen wäre.

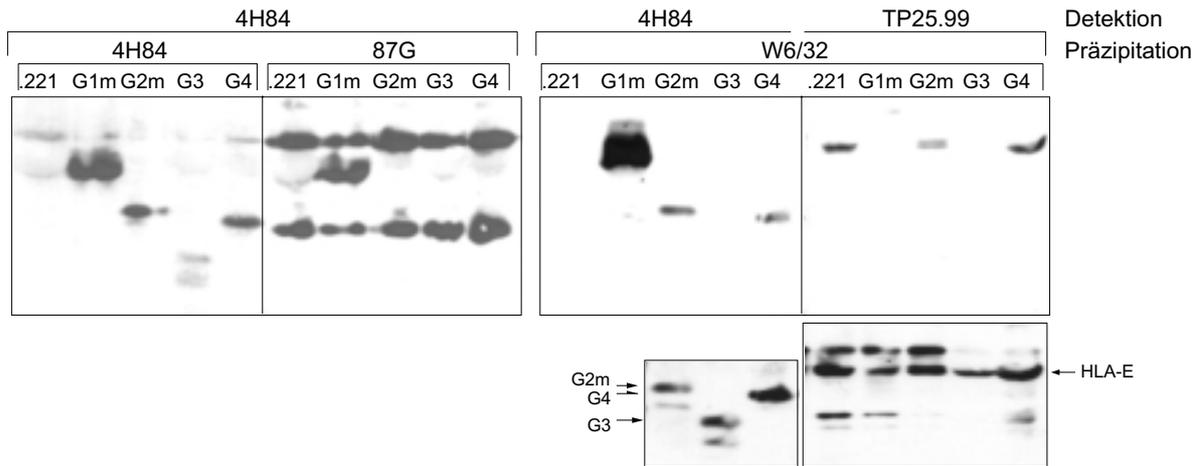


Abb. 5.4.6: Immunpräzipitation der HLA-G-Isoformen mit den Antikörpern 87G und W6/32

Je 2×10^7 Zellen von .221, .221 G1m K24, G2m G1, G3 D12 und G4 D4 wurden nach NP40-Lyse mit den Ak 87G bzw. als Kontrolle mit 4H84 (linke Hälfte) oder mit W6/32 (rechte Hälfte) präzipitiert und nach Auftrennung auf einem 10%igen Polyacrylamidgel und Übertragung auf Nitrocellulosemembran mit 4H84 bzw. TP25.99 gefärbt. Ein Aliquot des Lysats entsprechend 1×10^6 Zellen wurde aufgetragen und mit 4H84 nachgewiesen, um die Proteinmengen abzuschätzen (nicht gezeigt), die für die Isoformen gleich waren und etwa der Stärke für G2m und G3 in Abb. 5.4.5 entsprachen. Die Menge an G1m war etwa doppelt so groß. Nach längerer Exposition kann mit 4H84 auch G3 gesehen werden (unten links) bzw. HLA-E ist in allen Spuren sichtbar (unten rechts).

Außerdem wurde eine Immunpräzipitation mit dem Ak BFL.1 durchgeführt. Von diesem Ak war gezeigt worden, daß er auf JAR- und J26-G-Transfektanten ein positives Signal zeigt und daß er G1m aus diesen Zellen präzipitieren kann (Bensussan et al., 1995). Über seine Reaktion mit den Isoformen war nichts bekannt. BFL.1 war bislang nur auf der G1m-Transfektante in einer FACS-Analyse getestet worden, dort aber negativ gewesen. Nun wurde diese FACS-Analyse mit der sortierten G1m-Transfektante sowie den Transfektanten der Isoformen wiederholt und auch bei 26°C durchgeführt, um eine eventuelle temperaturabhängige Stabilisierung nachweisen zu können (nicht gezeigt). Nachdem die FACS-Analyse negativ war, wurde auch hier eine Immunpräzipitation mit anschließender Färbung mit 4H84 durchgeführt, um zu überprüfen, ob der Ak überhaupt fähig ist, die Isoformen zu erkennen (Abb. 5.4.6). Die Präzipitation zeigt, daß BFL.1 durchaus in der Lage ist, die Isoformen gleichermaßen gut zu präzipitieren. Die schwache Bande von G2s bzw. die fehlende Bande bei G2m können durch die geringere Menge an Protein im Lysat erklärt werden (siehe Lysate in der rechten Hälfte der Abbildung). Die Wiederholung der Präzipitation für diese Isoformen mit Lysaten, in denen mehr Protein enthalten war, ergab dann auch ein positives Signal (nicht gezeigt).

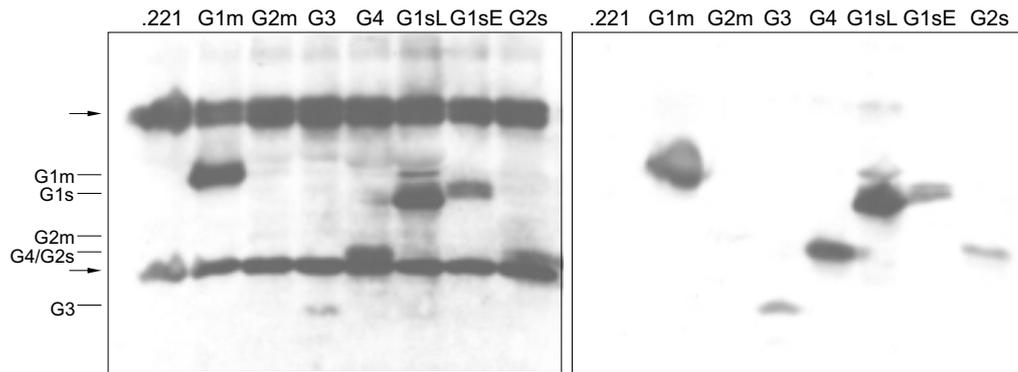


Abb. 5.4.7: Immunpräzipitation der HLA-G-Isoformen mit dem Antikörper BFL.1

Je 1×10^7 Zellen wurden nach NP40-Lyse mit BFL.1 präzipitiert. Nach Auftrennung auf einem 10%igen Polyacrylamidgel und Übertragung auf Nitrocellulosemembran erfolgte die Färbung mit dem Ak 4H84. Pfeile zeigen die Antikörperbanden an. In der rechten Hälfte sind zur Mengenabschätzung Aliquots der Lysate entsprechend 1×10^6 Zellen aufgetragen.

Es konnte gezeigt werden, daß in den Transfektanten der HLA-G-Isoformen die jeweiligen Proteine exprimiert werden. Während G1m auf der Zelloberfläche und G1s im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnten, waren die Isoformen G2m, G2s, G3 und G4 nur im Zellysat nachzuweisen und erwiesen sich als EndoH-sensitiv.

5.5 STABILISIERUNG VON FUNKTIONELLEM HLA-E AUF DER ZELLOBERFLÄCHE DER HLA-G-TRANSFEKTANTEN

5.5.1 STABILISIERUNG VON HLA-E AUF DEN TRANSFEKTANTEN DER HLA-G-ISOFORMEN

In der FACS-Analyse der HLA-G-Isoformen mit den mAk W6/32 und A1.4 (sowie B9.12.1 und TP25.99) war bei einigen Klonen der Isoformen eine leichte Verschiebung des Fluoreszenzsignals aufgefallen (Abb. 5.3.1). Aufgrund der Ergebnisse aus der EndoH-Behandlung mußte aber angenommen werden, daß diese nicht von der Erkennung der Proteine der HLA-G-Isoformen durch die verwendeten mAk verursacht werden kann, zumal diese Zunahme auch von den mAk TP25.99 und A1.4 nachgewiesen wurde, die nicht mit HLA-G reagieren. Zu dieser Zeit wurde die Stabilisierung von HLA-E auf der Zelloberfläche durch Bindung von Peptiden mit bestimmten Sequenzmerkmalen aus den Signalpeptiden von Klasse-I-Molekülen beschrieben (Braud *et al.* 1997). Da das entsprechende Peptid von HLA-G die passenden Sequenzmerkmale für eine Bindung enthält, sollte untersucht werden, ob die festgestellte Verschiebung in der FACS-Analyse auf die Stabilisierung des endogenen HLA-E auf der Zelloberfläche der Transfektanten verursacht wird.

Die Stabilisierung von HLA-E auf der Zelloberfläche ist am effektivsten bei 26°C, deshalb wurden die Zellen zunächst über Nacht bei 37°C und 26°C inkubiert und anschließend mittels FACS-Analyse die Oberflächenexpression von HLA-E untersucht (Borrego *et al.* 1998). Als Kontrolle wurden untransfizierte .221-Zellen ebenfalls bei 37°C inkubiert bzw. zur Induktion der HLA-E-Zelloberflächenexpression bei 26°C mit oder ohne Zugabe eines HLA-E-Peptidliganden. Da die Ergebnisse für die Ak A1.4 und TP25.99 sowie W6/32 und B9.12.1 übereinstimmten, wurde im weiteren nur A1.4 verwendet. Für die .221-Zellen ist eine Verstärkung der HLA-E-Oberflächenexpression durch Inkubation bei 26°C zu erreichen, die bei Zugabe von Peptid (hier von B7₃₋₁₁) noch verstärkt wird. Von den HLA-G-Transfektanten ist jeweils ein Klon gezeigt. Klone der einzelnen Isoformen verhielten sich untereinander, aber auch derselbe Klon in verschiedenen Experimenten in bezug auf die Induktion etwas variabel; allerdings war der im gezeigten Experiment auftretende Effekt reproduzierbar: Die Expression von G1m, G2s und G3 in der Zelllinie .221 stabilisiert HLA-E nur sehr schlecht. In den .221-G2m- und -G4-Transfektanten ist bereits bei 37°C eine Zunahme der HLA-E-Oberflä-

chenexpression zu sehen, und auch die Kultivierung der Transfektanten bei 26°C resultiert in einem deutlichen Anstieg von HLA-E (Abb. 5.5.1).

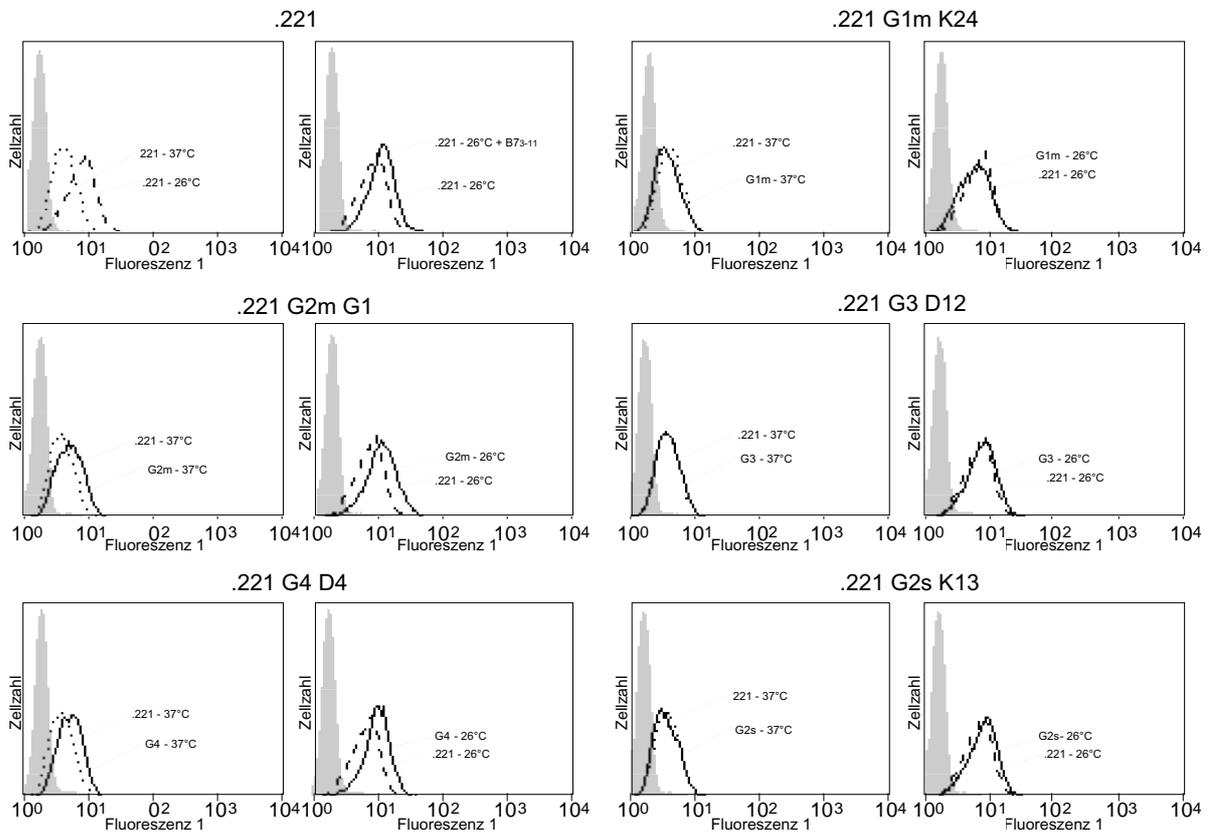


Abb. 5.5.1: FACS-Analyse zum Nachweis von HLA-E auf der Zelloberfläche der HLA-G-Transfektanten

Je 2×10^5 Zellen wurden in HEPES-gepuffertem Medium μ N bei 37°C bzw. bei 26°C inkubiert und anschließend mit A1.4 gefärbt oder als Kontrolle nur mit dem zweiten Ak behandelt (grau schattiert). In der Auswertung wurden die untransfizierten .221-Zellen bei 37°C (gepunktete Linie) bzw. bei 26°C (gestrichelte Linie) mit den Zellen nach Zugabe von B7₃₋₁₁-Peptid bzw. den Transfektanten bei der entsprechenden Temperatur (durchgezogene Linie) verglichen.

5.5.2 FUNKTIONELLES HLA-E AUF DEN HLA-G-TRANSFEKTANTEN INTERAGIERT MIT DEM LÖSLICHEN CD94/NKG2A-REZEPTORTETRAMER

Als nächstes wurde untersucht, ob die HLA-G-Expression in der Zelllinie .221 zu einer funktionellen HLA-E-Zelloberflächenrepräsentation führt. CD94/NKG2A war zunächst als NK-inhibitorischer Rezeptor beschrieben worden, der ein sehr breites Spektrum an Klasse-I-Molekülen erkennen sollte, darunter auch HLA-G (Carretero *et al.* 1997; Perez-Villar *et al.* 1997). Es gab aber auch Hinweise auf die Fähigkeit von HLA-E, Peptide aus der Signalsequenz anderer Klasse-I-Moleküle, darunter auch HLA-G, zu binden, um dadurch auf der Zelloberfläche stabilisiert zu werden. Zunächst mußte deshalb geprüft werden, ob der CD94/NKG2A-Rezeptor HLA-G erkennt oder ob die Reaktion mit diesem Rezeptor auf Bindung an HLA-E zurückzuführen ist, wenn dieses durch Bindung eines Peptidliganden aus HLA-Klasse-I-Molekülen stabilisiert ist.

Dazu wurden Transfektanten in der Mauszelllinie X63 (transfiziert mit $hu\beta_2m$ (X63M), als Negativkontrolle, bzw. $hu\beta_2m$ und den Genen für HLA-B27 (X63MB27), HLA-E (X63ME) oder HLA-G (X63MG) mit Hilfe des tetrameren CD94/NKG2A-Rezeptors nach Inkubation bei 37°C und 26°C mit bzw. ohne Zugabe des Peptids B7₃₋₁₁ aus der Signalsequenz von HLA-B7 mittels FACS-Analyse untersucht. Parallel dazu wurden Aliquots der so inkubierten Zellen mit dem Ak B9.12.1 gefärbt. Die Negativkontrolle X63M war in allen Fällen negativ, die HLA-B27-Transfektante reagierte mit dem Ak, war aber unbeeinflusst von Temperaturänderung oder Peptidzugabe, ebenso wie die HLA-G-Transfektante. Die HLA-E-Transfektante zeigte eine deutliche Verstärkung der Oberflächenexpression bereits nach Inkubation bei 26°C. Zugabe von Peptid führte bei beiden Temperaturen zu einem starken Anstieg der Oberflächenexpression, die bei 37°C drastischer ausfiel als bei 26°C. Die X63ME-Zelllinie trug bei 26°C zu einem geringen Anteil funktionelle HLA-E-Moleküle auf der Oberfläche, die CD94/NKG2A binden konnten. Nach Inkubation mit Peptid war dieser Anteil stark erhöht, und es zeigte sich eine deutliche Bindung des Rezeptortetramers, während HLA-G und HLA-B27 nicht erkannt wurden (Abb. 5.5.2).

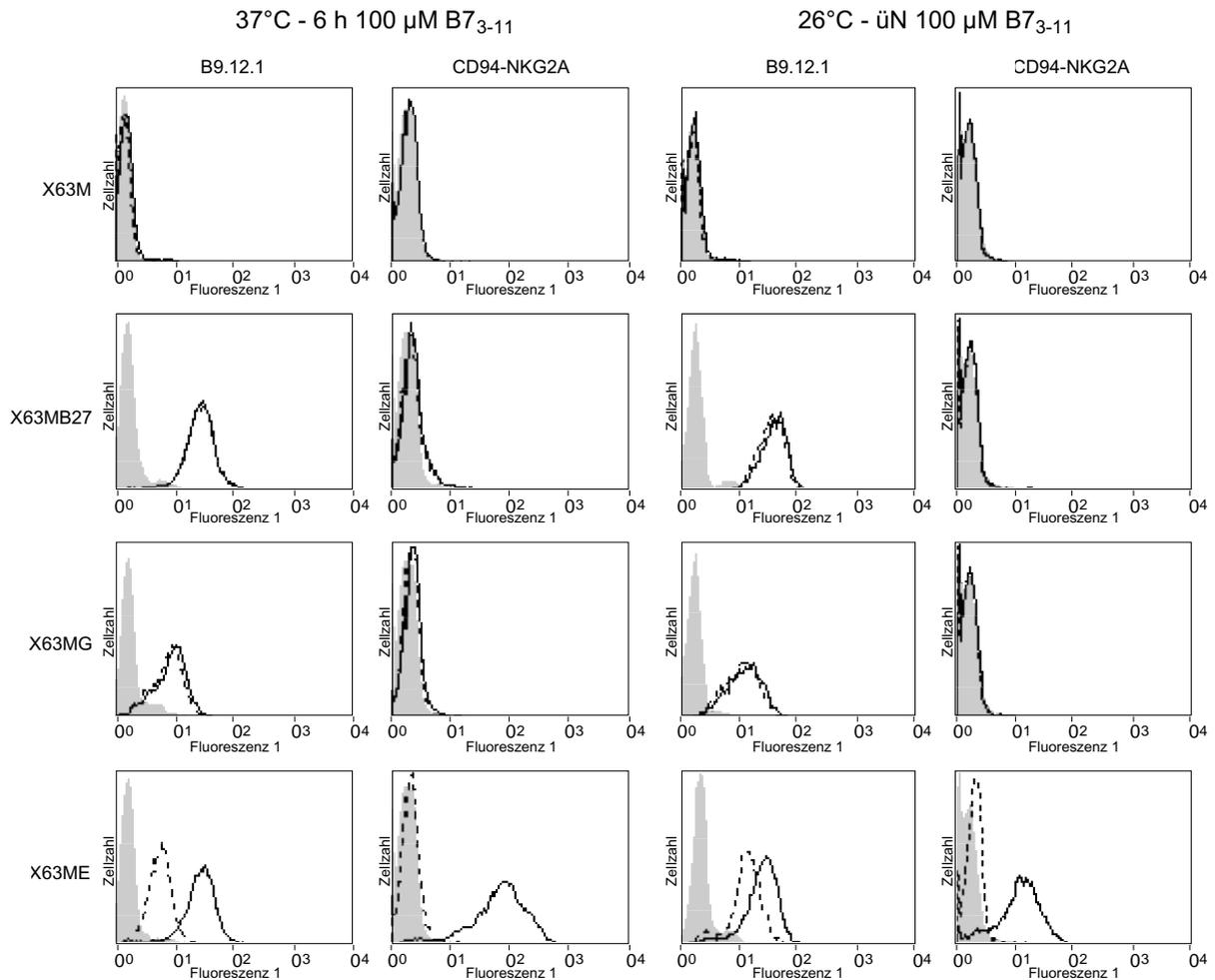


Abb. 5.5.2: Interaktion des löslichen CD94/NKG2A-Rezeptortetramers mit HLA-Klasse-I-Molekülen

Je 2×10^5 Zellen der X63-Transfektanten X63M (transfiziert mit $hu\beta_2m$) sowie X63MB27, X63ME und X63MG (X63M transfiziert mit den Genen für HLA-B27, HLA-E bzw. HLA-G) wurden für 6 h bei 37°C bzw. $\ddot{u}\text{N}$ bei 26°C sowohl ohne Peptid (gestrichelte Linie) als auch mit $100 \mu\text{M}$ B7_{3-11} -Peptid (durchgezogene Linie) inkubiert und anschließend mit B9.12.1 gefärbt. Als Negativkontrolle erfolgte die Inkubation mit einer IgG2b-Isotypkontrolle (grau schattiert). Als Negativkontrolle für die Färbung mit dem CD94/NKG2A-Rezeptor (gestrichelte Linie: Transfektante ohne Peptid; durchgezogene Linie: Transfektante mit Peptid) diente der Vergleich mit der X63M-Transfektante (grau schattiert).

Nachdem nun gezeigt war, daß der CD94/NKG2A-Rezeptor nur HLA-E (komplexiert mit B7_{3-11}), nicht aber HLA-G erkannte, war der nächste Schritt die Überprüfung, ob Zugabe des Peptids G_{3-11} aus der Signalsequenz von HLA-G tatsächlich zu einer Stabilisierung von HLA-E führen kann. Hinweise, daß dies zutrifft, hatten sich bereits aus der Stabilisierung von HLA-E in den Transfektanten der HLA-G-Isoformen ergeben (s. Abb. 5.5.1).

721.221-Zellen wurden mit Peptiden aus den Signalsequenzen von HLA-B7 ($B7_{3-11}$) und HLA-G (G_{3-11}) bei 26°C für 20 h inkubiert bzw. nach 18 h bei 26°C für zwei Stunden bei 37°C gehalten, um die Bedingungen für die später beschriebene zellvermittelte Lyse zu simulieren (s. Abschnitt 5.5.3), und anschließend mit dem Ak A1.4 (erkennt HLA-E, nicht aber HLA-G) bzw. einer Isotypkontrolle gefärbt (Abb. 5.5.3). Untransfizierte .221-Zellen zeigten in der A1.4-Färbung bereits ohne Zugabe von Peptid die Expression von HLA-E an der Oberfläche. Nach Zugabe des Peptids $B7_{3-11}$ war die Oberflächenexpression verstärkt und blieb auch nach der zweistündigen Temperaturerhöhung stabil. Auch die Inkubation mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von G_{3-11} führte in den .221-Zellen zu einer Stabilisierung von HLA-E. Die HLA-E-Menge auf der Zelloberfläche war aber geringer als mit $B7_{3-11}$ und zeigte einen leichten Rückgang durch die Temperaturerhöhung.

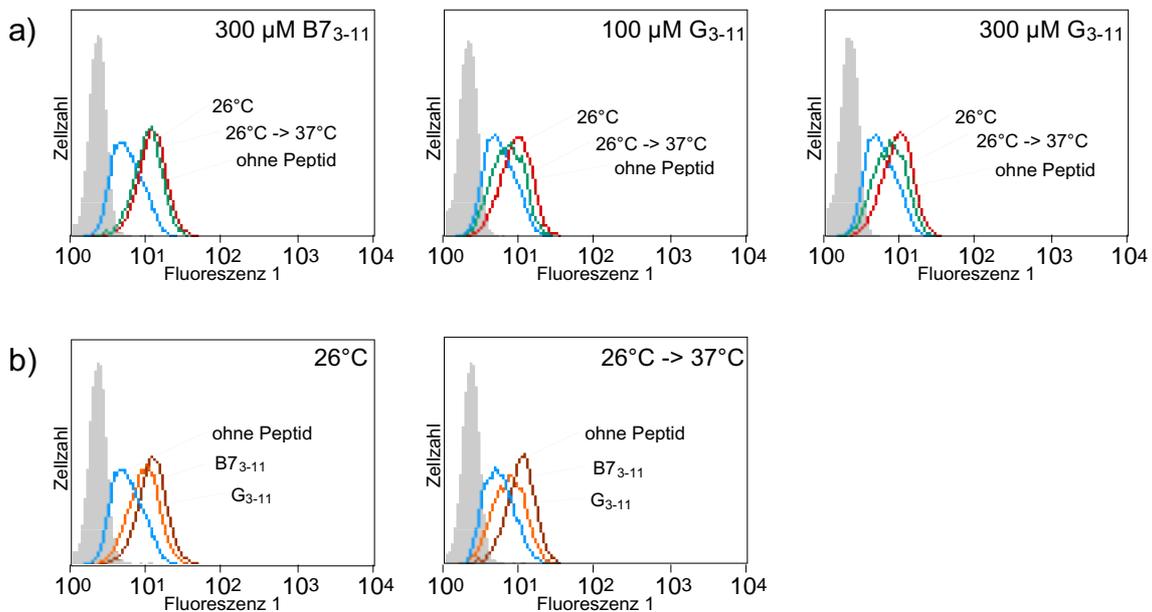


Abb. 5.5.3: Stabilisierung der Oberflächenexpression von HLA-E in .221-Zellen nach Zugabe des HLA-G-Signalpeptids G_{3-11} im Vergleich mit dem aus der $B7$ -Signalsequenz abgeleiteten Peptid $B7_{3-11}$

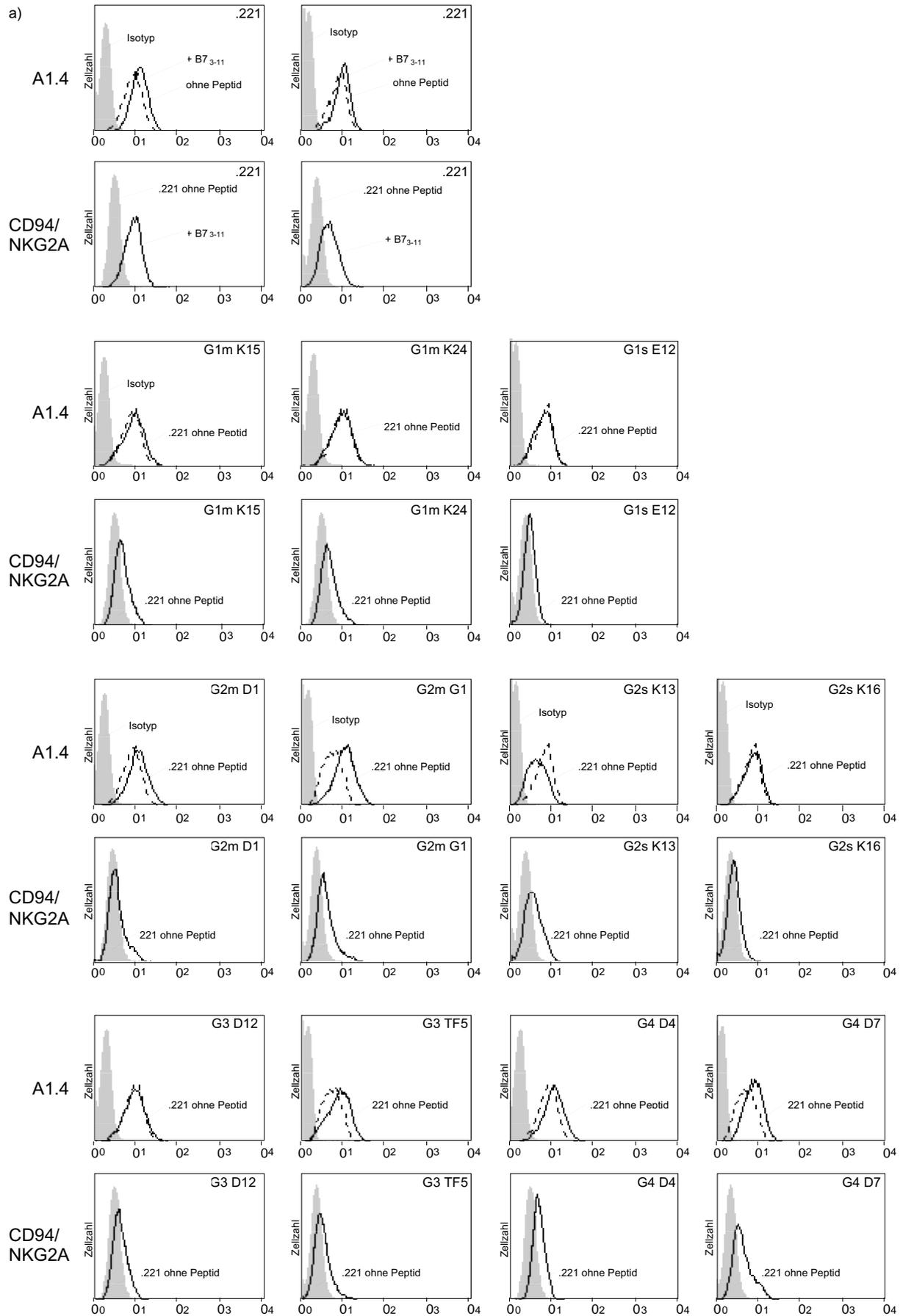
a) Je 1×10^5 Zellen wurden in HEPES-gepuffertem Medium für 20 h bei 26°C ohne Zugabe von Peptid (blaue Linie), mit Zugabe von 100 μM $B7_{3-11}$ - oder 100 bzw. 300 μM G_{3-11} -Peptid (rote Linie) oder 26°C mit Peptid und 2stündiger Rückführung auf 37°C (grüne Linie) inkubiert und anschließend mit dem Ak A1.4 oder mit einer IgG2b-Isotypkontrolle (grau schattiert) gefärbt.

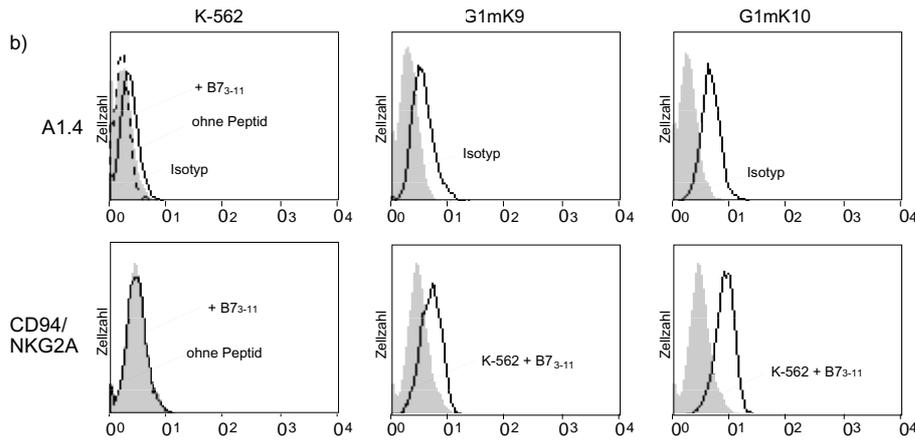
b) Zur Verdeutlichung des unterschiedlichen Effektes der beiden Peptide wurden hier die Kurven für das $B7_{3-11}$ -Peptid (braune Linie) und das G_{3-11} -Peptid (orange Linie) für die beiden durchgeführten Inkubationsbedingungen übereinandergelegt. Zum Vergleich sind auch hier die Isotypkontrolle (grau schattiert) und die Inkubation ohne Peptid (blaue Linie) mit aufgeführt.

Da der CD94/NKG2A-Rezeptor spezifisch HLA-E, komplexiert mit von Signalsequenzen abgeleiteten Peptiden, bindet und HLA-E durch Inkubation mit dem HLA-G-Signalpeptid stabilisiert werden konnte, erfolgte im nächsten Schritt die Untersuchung der verschiedenen HLA-G-Transfektanten nach μ N-Inkubation bei 26°C mit dem CD94/NKG2A-Rezeptortetramer, um zu überprüfen, ob in diesen Zellen HLA-E funktionell auf der Zelloberfläche vorliegt und für eine Erkennung durch den Rezeptor ausreichend ist. Parallel wurde wieder ein Aliquot der Zellen mit dem Ak A1.4 gefärbt, um die Stärke der Stabilisierung zu überprüfen. Gezeigt sind jeweils zwei Klone pro Isoform bzw. .221-Zellen aus zwei verschiedenen Durchführungen, wobei der Nachweis der Zelloberflächenexpression und die Bindung mit dem Rezeptor jeweils parallel durchgeführt wurden. Als Negativkontrolle wurde eine .221B27-Transfektante mitgeführt. Untransfizierte .221- und K-562-Zellen sowie die B27-Transfektante reagierten nicht mit dem Rezeptor. Nach Inkubation mit dem B7₃₋₁₁-Peptid bei 26°C μ N konnten .221-Zellen jedoch erkannt werden, während dies auf K-562-Zellen keinen Einfluß hatte. Die HLA-G-Transfektanten zeigten im Prinzip alle eine wenn auch etwas variable Erkennung durch den löslichen Rezeptor. Besonders schwach war diese mit der G1s-Transfektante, bei der auch keine HLA-E-Stabilisierung auf der Zelloberfläche zu sehen war und von der nur ein Klon zur Verfügung stand, sowie mit jeweils einem der beiden gezeigten Klone von G2m und G2s, die ebenfalls schwächer bzw. nicht stabilisierten, während der jeweils andere Klon, der auch in der Stabilisierung stärker war, gut erkannt wurde. Beide G1m-Transfektanten zeigten kaum eine Stabilisierung, wurden aber beide schwach vom Rezeptor erkannt, ebenso wie beide G3-Transfektanten, von denen aber nur eine eine deutliche Stabilisierung bewirkte. Besonders deutlich war die Reaktion des Rezeptors mit den G4-Transfektanten sowie mit den K-562 G1m-Transfektanten.

Abb. 5.5.4: FACS-Analyse zur Stabilisierung der HLA-E-Oberflächenexpression und Bindung des löslichen CD94/NKG2A-Rezeptors an die Transfektanten der HLA-G-Isoformen

- a) Je 2×10^5 Zellen der .221-HLA-G-Transfektanten bzw. der untransfizierten .221-Zellen (Ergebnis aus zwei verschiedenen Experimenten gezeigt) mit oder ohne Zugabe von 300 μ M B7₃₋₁₁-Peptid wurden μ N bei 26 °C inkubiert und anschließend mit A1.4 (durchgezogene Linie) oder mit einer Isotypkontrolle (grau schattiert) gefärbt. In der Auswertung der .221-Transfektanten wurde jeweils mit der A1.4-Färbung der untransfizierten .221-Zellen ohne Peptid verglichen (gestrichelte Linie). Für die Färbung mit dem CD94/NKG2A-Tetramer wurde mit der Kurve der untransfizierten .221-Zelle ohne Zugabe von Peptid verglichen.
- b) Analog zu a) wurden mit K-562-Zellen sowie zwei K-562 G1m-Transfektanten verfahren. Auf der Abszisse der Diagramme ist jeweils die Stärke der Fluoreszenz 1 angezeigt.





5.5.3 BEEINFLUSSUNG DER NK-AKTIVITÄT DURCH DIE FUNKTIONELLE STABILISIERUNG VON HLA-E IN DEN HLA-G-TRANSFEKTANTEN

Nachdem also gezeigt worden war, daß die HLA-E-Stabilisierung in den HLA-G-Transfektanten für eine Erkennung durch den löslichen CD94/NKG2A-Rezeptor ausreichte, sollte nun in einem zellulären Ansatz getestet werden, ob die HLA-G-Expression auch für die Inhibition der Lyse durch die NK-Zelllinie NKL, die CD94/NKG2A-positiv ist und beide Moleküle gleich stark auf der Zelloberfläche exprimiert (Abb. 5.5.5), ausreichend wäre. Dazu wurden Chromfreisetzungstests mit untransfizierten .221-Zellen als Referenz, den HLA-G-Transfektanten sowie der Kontrolltransfektante .221Cw*0304 durchgeführt, die vor der Lyse durch NKL geschützt ist.

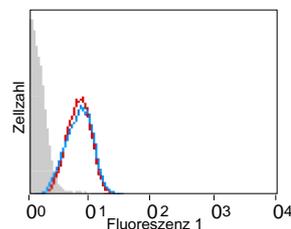


Abb. 5.5.5: Expression von CD94 und NKG2A auf der Killerzelllinie NKL

1x 10⁵ Zellen wurden mit dem CD94-spezifischen Ak HP-3B1 (rote Linie) bzw. dem Ak Z199, der spezifisch den CD94/NKG2A-Komplex erkennt (blaue Linie), gefärbt. Als Negativkontrolle wurde die Inkubation nur mit dem zweiten Ak (grau schattiert) durchgeführt.

In den ersten Experimenten wurden die Zielzellen bei 37°C gehalten und auch die Markierung mit dem Na^{51}Cr und die anschließende 4stündige Inkubation mit den Killerzellen bei 37°C durchgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abbildung 5.5.6 gezeigt. Insgesamt fiel eine gewisse Variabilität der Lysestärke auf, die hier gezeigten Tendenzen der einzelnen Transfektanten waren aber reproduzierbar: Expression von G1m und G3 inhibierten die Lyse, die von G2m und G4 nicht. Parallel zum Chromfreisetzungstest wurde aus einem Aliquot der Zellen RNA isoliert, um mittels Northernblot die RNA-Mengen vergleichen zu können (Abb. 5.5.6 b). In allen Transfektanten wird HLA-G gut transkribiert, in vergleichbarer Menge in der G1m-, G2m- und G4-Transfektante, besonders stark aber in der G3-Transfektante (G3.1).

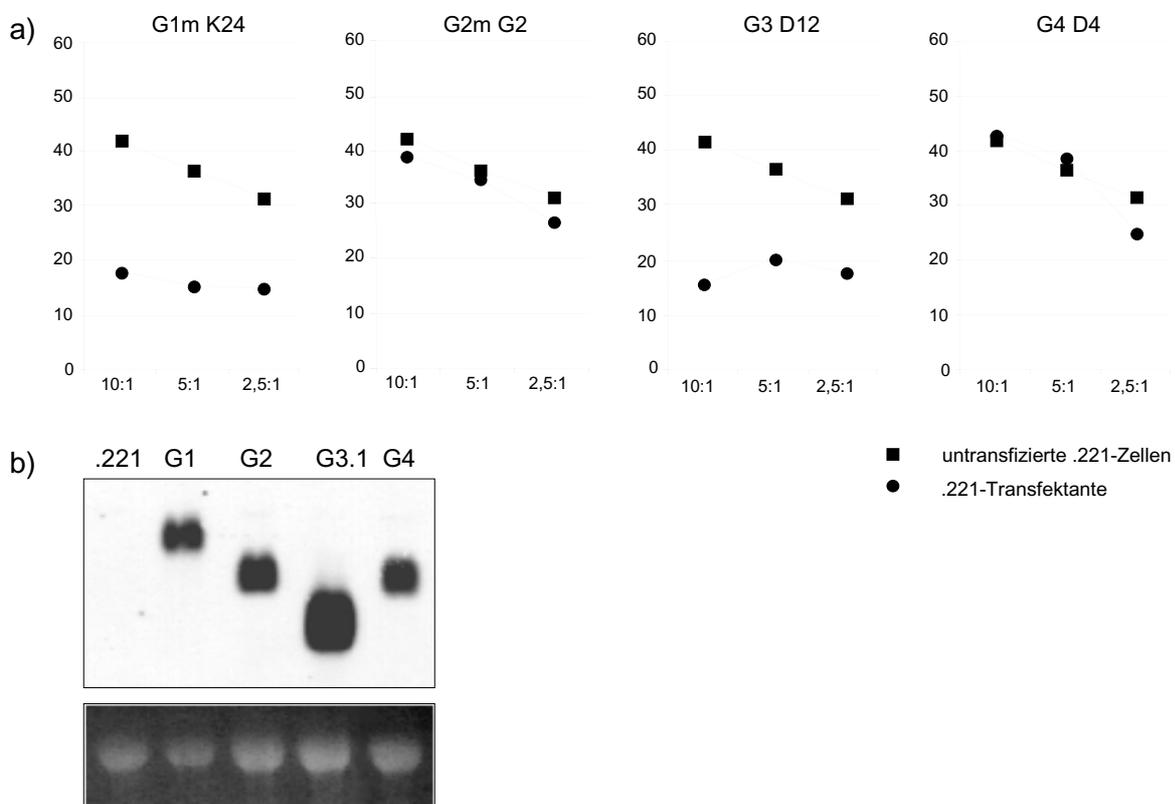


Abb. 5.5.6: Lyse der Transfektanten der HLA-G-Isoformen durch die Killerzelllinie NKL

a) Je 2000 Zielzellen wurden nach Markierung mit Na^{51}Cr mit der Effektorzelllinie NKL im Verhältnis Effektor : Target von 10:1, 5:1 und 2,5:1 für 4 h inkubiert, der Überstand im γ -Counter gemessen und die spezifische Lyse berechnet. Verglichen wurden jeweils die Werte der Zelllinie .221 (■) mit den Werten der Transfektanten (●).

b) Aus einem Teil der Zielzellen wurde parallel zum Chromfreisetzungstest RNA isoliert. Je 5 μg Gesamt-RNA wurden auf einem 1,2%igen Formaldehydgel aufgetrennt, auf Hybond- N^+ -Membran geblottet und mit der Digoxigenin-markierten G4-cDNA als Sonde hybridisiert. Die Menge der aufgetragenen RNA ist durch die Ethidiumbromidfärbung der 28S rRNA (unten) angezeigt.

Da sich für die Stabilisierung von HLA-E auf der Zelloberfläche die Inkubation bei 26°C üN als verstärkend erwiesen hatte, wurde nun getestet, ob dies auch Auswirkungen auf die Lyse haben könnte, zumal die G2m- und G4-Transfektante, die hier die NK-Lyse nicht inhibierten, nach Inkubation bei 26°C eine gute HLA-E-Stabilisierung auf der Oberfläche gezeigt hatten (s. Abb. 5.5.4). Dazu wurden zunächst die untransfizierten .221-Zellen sowie die Kontrolltransfektante .221Cw*0304 und die HLA-G1m-Transfektante nach üN-Inkubation bei 26°C bzw. bei 37°C in den Test eingesetzt. Schon bei den untransfizierten .221-Zellen fiel eine Abnahme der Lyse bei den bei 26°C gehaltenen Zellen im Vergleich mit den bei 37°C gehaltenen Zellen auf, die sich bei beiden untersuchten Transfektanten ebenfalls zeigte, wobei der Effekt bei der Cw*0304-Transfektante am deutlichsten ausfiel (Abb. 5.5.7).

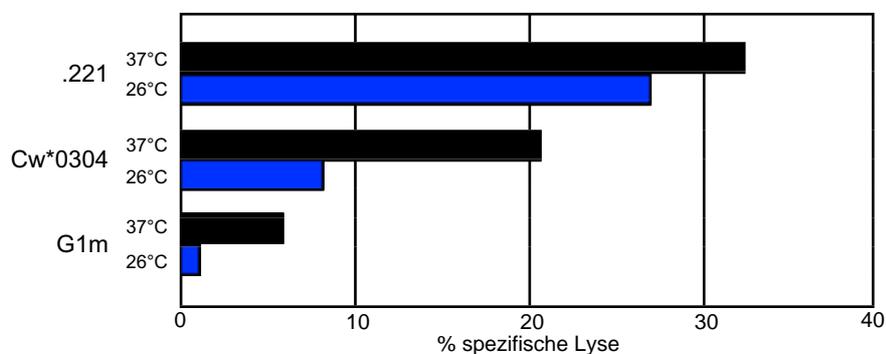


Abb. 5.5.7: Verstärkung der Inhibition durch Inkubation der Zielzellen bei 26°C

Die Zielzellen wurden üN bei 26°C (blauer Balken) bzw. 37°C (schwarzer Balken) gehalten, je 5000 Zellen wurden nach Markierung mit Na^{51}Cr mit der Effektorzelllinie NKL im Verhältnis Effektor : Target von 10:1, 5:1 und 2,5:1 für 2 h inkubiert, der Überstand im γ -Counter gemessen und die spezifische Lyse berechnet. Gezeigt ist hier das Ergebnis für das Effektor : Target-Verhältnis von 5:1.

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die Inkubation der Zielzellen bei 26°C zu einer verstärkten Inhibition führen kann, wurden nun die HLA-G-Transfektanten üN bei 26°C gehalten. Es zeigte sich eine generell geringere Lyse schon für die .221-Zellen, die Kontrolltransfektante Cw*0304 zeigte Inhibition. An den Ergebnissen für die HLA-G-Transfektanten änderte sich aber nichts: Die G1m- und G3-Transfektante waren vor der Lyse durch NKL geschützt, die G2m- und G4-Transfektante nicht, ebenso wie die .221G-Gen-Transfektante (Abb. 5.5.8).

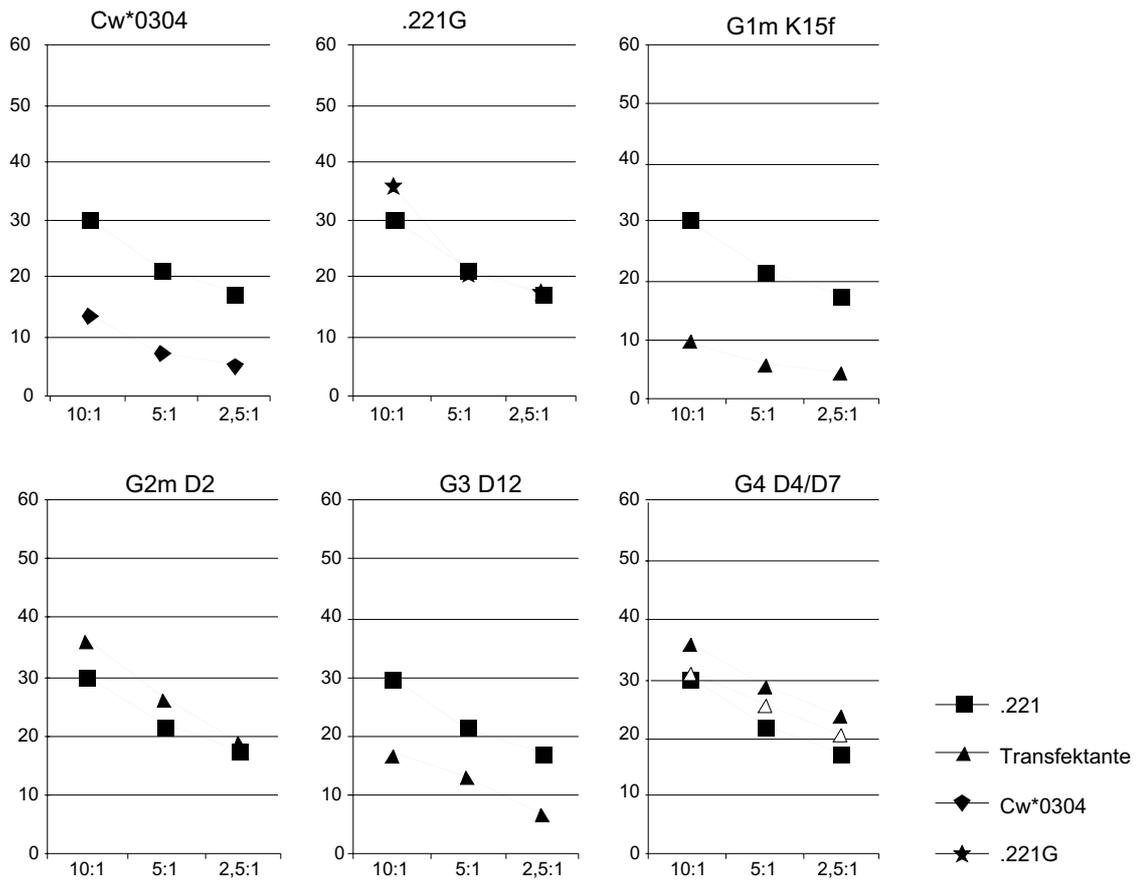


Abb. 5.5.8: Inhibition der Lyse bei 26°C durch Expression der HLA-G-Isoformen in der Zelllinie .221 im Chromfreisetzungstest mit der Killerzelllinie NKL

Die Zielzellen wurden üN bei 26°C gehalten, mit Na⁵¹Cr markiert und je 5000 Zellen mit NKL im Verhältnis Effektor : Target von 10:1, 5:1 und 2,5:1 für 2 h inkubiert. Verglichen wurde die spezifische Lyse der untransfizierten .221-Zellen (■) mit den HLA-G-Transfektanten (▲; bei G4 wurden 2 Klone untersucht ▲ und Δ), der .221G-Gen-Transfektante (★) bzw. der Kontrolltransfektante Cw*0304 (◆).

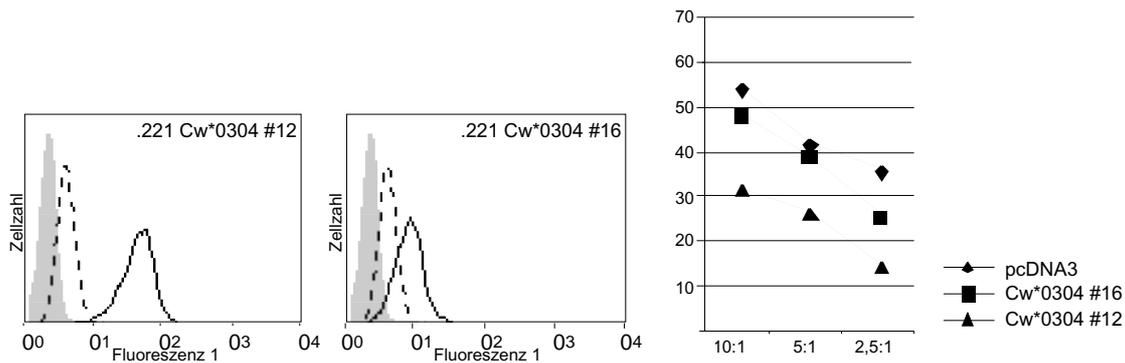


Abb. 5.5.9: Unterschiedliche Expressionsstärke von Cw*0304 korreliert mit der Stärke der Lyseinhibition

Die rechte Hälfte der Abbildung zeigt die Färbung mit W6/32 für zwei .221 Cw*0304-Klone (durchgezogene Linie), verglichen mit der Negativkontrolle (Inkubation ohne 1. Ak; grau schattiert). Rechts ist ein Chromfreisetzungstest mit diesen beiden Transfektanten im Vergleich mit nur mit dem Vektor pcDNA3 transfizierten .221-Zellen gezeigt.

Für die beiden Cw*0304-Transfektanten hatte sich gezeigt, daß eine stark verminderte Oberflächenexpression des den Peptidliganden für HLA-E liefernden Moleküls zu einer drastischen Verschlechterung der Lyseinhibition führte (Abb. 5.5.9). Dies könnte auch erklären, warum die .221G-Gen-Transfektante keine Inhibition zeigte, da ihre Oberflächenexpression von HLA-G deutlich geringer war als in der G1m-Transfektante und die Proteine der Isoformen kaum nachweisbar waren. Um zu überprüfen, ob die fehlende Inhibition durch die G2m- und G4-Transfektante tatsächlich auf zu geringe Proteinexpression zurückzuführen sein könnte, wurde ein weiterer Chromfreisetzungstest durchgeführt, in dem auch eine G1s- und eine G2s-Transfektante eingesetzt wurden. Hierbei sollte untersucht werden, ob durch Inkubation der Transfektanten mit dem Peptid G₃₋₁₁ eine ausreichende Menge an Ligand für HLA-E zur Verfügung steht und damit ein Schutz vor der Lyse durch NKL erreicht werden könnte. Dafür mußten aber zunächst geeignete Bedingungen für die Durchführung des Chromfreisetzungstests mit dem Peptid G₃₋₁₁ gefunden werden. Schon in der FACS-Analyse hatte sich gezeigt, daß die Stabilisierung von HLA-E auf der Zelloberfläche nach Zugabe des Peptids G₃₋₁₁ schwächer ausfällt im Vergleich mit dem Peptid B7₃₋₁₁ und daß die Erhöhung der Temperatur auf 37°C zu einem Rückgang der Stabilisierung führt (s. Abb. 5.5.3). Dies könnte darauf hinweisen, daß die Affinität des HLA-G-Peptids an HLA-E v.a. bei 37°C gering ist. Im Unterschied zu den bisherigen Bedingungen (Inkubation der Zellen bei 26°C üN, entweder alleine oder mit Zugabe von 100 µM G₃₋₁₁-Peptid, Durchführung des Chromfreisetzungstests bei 37°C in Abwesenheit des Peptids, Inkubation der Killerzellen mit den Zielzellen für 4 h erfolgte nun die gesamte Versuchsdurchführung bei 26°C, das Peptid war die ganze Zeit für die Zellen

verfügbar und die Inkubation der Zielzellen mit den Killerzellen erfolgte nur für 2 h (Abb. 5.5.10).

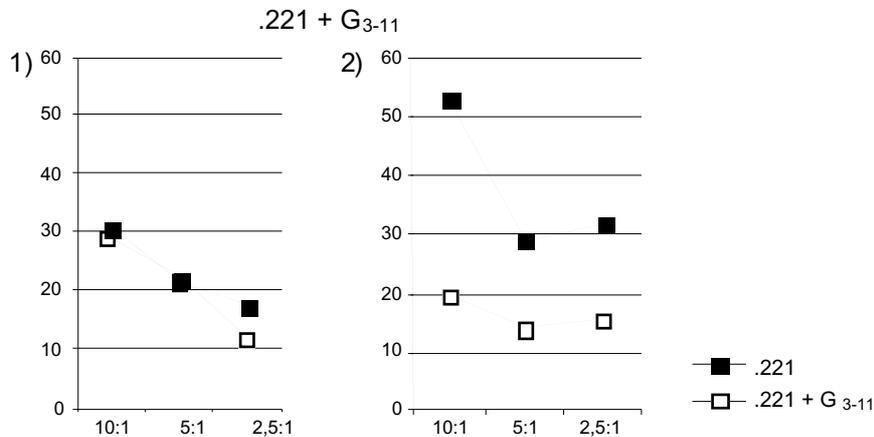
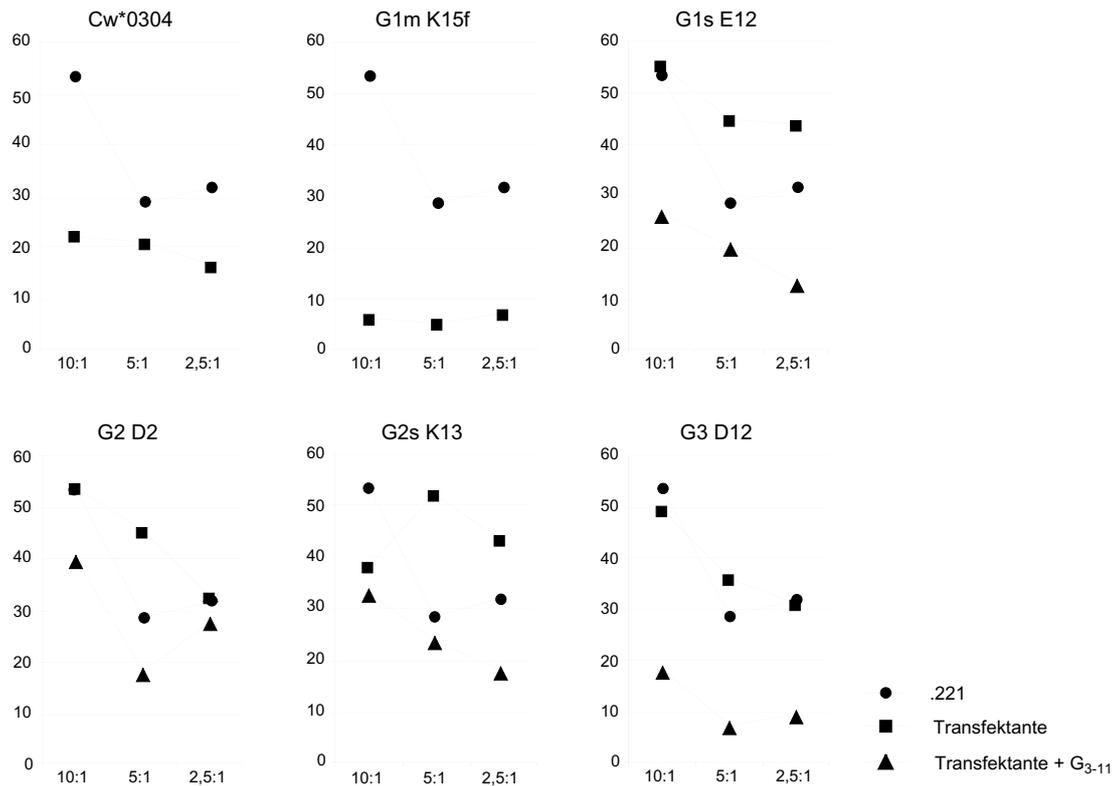


Abb. 5.5.10: Die Anwesenheit des G₃₋₁₁-Peptids während des gesamten Chromfreisetzungstests führt zur Inhibition der Lyse

- 1) Die Zielzellen wurden ohne oder nach Zugabe von 100 µM G₃₋₁₁ üN bei 26°C gehalten, die Markierung mit Na⁵¹Cr sowie der folgende Chromfreisetzungstest erfolgten bei 37°C. Je 5000 Zielzellen wurden mit NKL im Verhältnis Effektor : Target von 10:1, 5:1 und 2,5:1 für 4 h bei 37°C inkubiert, wobei das Peptid nicht anwesend war. Verglichen wurde die spezifische Lyse der .221-Zellen ohne Zugabe von Peptid (■) mit .221 + G₃₋₁₁ (□).
- 2) Die Zielzellen wurden ohne oder nach Zugabe von 100 µM G₃₋₁₁ üN bei 26°C gehalten, mit Na⁵¹Cr ebenfalls bei 26°C markiert und je 5000 Zellen mit NKL im Verhältnis Effektor : Target von 10:1, 5:1 und 2,5:1 für 2 h bei 26°C inkubiert, wobei das Peptid immer anwesend war. Verglichen wurde die spezifische Lyse der untransfizierten .221-Zellen ohne Zugabe von Peptid (■) mit .221 + G₃₋₁₁ (□).

Es zeigte sich, daß das Peptid G₃₋₁₁ nur dann in der Lage war, eine für den Schutz der Zellen vor der Lyse durch die Killerzellen ausreichende Menge an funktionellem HLA-E auf der Oberfläche der .221-Zellen zu stabilisieren, wenn nicht nur eine üN-Inkubation mit dem Peptid bei 26°C durchgeführt wurde, sondern der gesamte Ablauf des Chromfreisetzungstests bei dieser Temperatur erfolgte, die Inkubationszeit der Zielzellen mit den Killerzellen verkürzt wurde und das Peptid während des gesamten Tests zur Verfügung stand. Diese Bedingungen wurden nun für einen Chromfreisetzungstest angewendet, in den die Transfektanten der HLA-G-Isoformen ohne Zugabe von Peptid bzw. nach Inkubation mit G₃₋₁₁ eingesetzt wurden (Abb. 5.5. 11a).



b) G3.1 G3.2



Abb. 5.5.11: Inkubation mit dem G₃₋₁₁-Peptid führt zum Schutz der Transfektanten der HLA-G-Isoformen vor der Lyse durch NKL

a) Die Zielzellen wurden ohne oder nach Zugabe von 100 μM G₃₋₁₁ (außer G1m und Cw*0304) üN bei 26°C gehalten, mit Na⁵¹Cr ebenfalls bei 26°C markiert und je 5000 Zellen mit NKL im Verhältnis Effektor : Target von 10:1, 5:1 und 2,5:1 für 2 h bei 26°C inkubiert, wobei das Peptid immer anwesend war. Verglichen wurde die spezifische Lyse der untransfizierten .221-Zellen (●) mit den HLA-G-Transfektanten ohne Zugabe von Peptid (■) oder nach Zugabe von Peptid (▲).

b) Aus Zellen der Transfektante G3 D12 wurde parallel zum Chromfreisetzungstest RNA isoliert. Je 5 μg dieser Gesamt-RNA (G3.2) wurden zum Vergleich mit der in Abb. 5.5.6b gezeigten RNA dieser Transfektante (G3.1) auf einem 1,2%igen Formaldehydgel aufgetrennt, auf Hybond-N⁺-Membran geblottet und mit der Digoxigenin-markierten G4-cDNA als Sonde hybridisiert. Die Menge der aufgetragenen RNA ist durch die Ethidiumbromidfärbung der 28S rRNA angezeigt.

In diesem Versuch führte die Inkubation von .221-Zellen mit dem Peptid G₃₋₁₁ zu einem Schutz der Transfektanten vor der Lyse durch NKL. Die Transfektanten der HLA-G-Isoform G2m, die in vorhergehenden Versuchen keine Inhibition der Lyse gezeigt hatte, inhibierte nach Inkubation mit dem HLA-G-Peptid ebenso wie die G2s- und G1s-Transfektante, die ohne Zugabe von Peptid ebenfalls nicht vor der Lyse geschützt waren. Die HLA-G3-Transfektante inhibierte in diesem Versuch nicht, Zugabe von G₃₋₁₁ stellt allerdings die Inhibition in einem den vorhergehenden Tests vergleichbaren Umfang wieder her. Der Auftrag von RNA (vgl. Abb. 5.5.6b und 5.5.11b) und auch Lysat (nicht gezeigt) dieser Transfektante zeigte allerdings, daß die Expression an G3-mRNA und -Protein drastisch vermindert war im Vergleich zu den früheren Untersuchungen. Erstaunlich ist aber, daß, obwohl jeweils die gleiche Menge an Peptid zugegeben wurde, es dennoch deutliche Unterschiede zwischen der Inhibitionsstärke der G3-Transfektante und den Transfektanten der übrigen Isoformen gibt, die immer noch deutlich schlechter geschützt waren als die G3-Transfektante + Peptid.

Die Transfektante .221 Cw*0304 war in allen Versuchen schlechter vor der Lyse durch NKL geschützt als die G1m-Transfektante G1m K15f (s. Abb. 5.5.7, 5.5.8 und 5.5.11). Eine Erklärung dafür könnte die schwächere Expression von Cw*0304 im Vergleich mit G1m sein (vgl. .221 Cw*0304 #12 in Abb. 5.5.9 und .221 G1m K15f in Abb. 5.4.3), wie es der Vergleich zweier unterschiedlich stark exprimierender Cw*0304-Transfektanten bereits gezeigt hatte (Abb. 5.5.9). Allerdings war von der in den Chromfreisetzungstests verwendeten Zelllinie NKL bekannt, daß sie neben CD94/NKG2A auch den inhibitorischen NK-Rezeptor ILT2 exprimiert (Colonna *et al.* 1997). Von diesem Rezeptor war gezeigt worden, daß er ein breites Spektrum an HLA-Klasse-I-Molekülen, darunter auch HLA-G, erkennt, daß er aber mit HLA-C-Allelen nicht oder nur äußerst schwach reagiert (Colonna *et al.* 1997; Fanger *et al.* 1998). Inkubation der Zelllinie NKL mit einem CD94-spezifischen Ak konnte die Lyse einer Cw-Transfektante vollständig wiederherstellen, während für die vollständige Revertierung der .221-G1m-Transfektante gleichzeitige Inkubation mit dem CD94-spezifischen und einem ILT2-spezifischen Ak notwendig war. Um dies zu überprüfen, wurden untransfizierte .221-Zellen, sowie die G1m-Transfektante K15f einem Chromfreisetzungstest unterzogen, für den NKL-Zellen vor der Inkubation mit den Zielzellen mit einem CD94-spezifischen Ak, einem Kontrollantikörper oder ohne Antikörper gehalten worden waren (Abb. 5.5.12). Wie von Colonna beschrieben, wurde der Schutz der G1m-Transfektante durch den CD94-Antikörper nur teilweise aufgehoben, d.h. ein Teil der Inhibition der NKL-Lyse durch die G1m-Transfektante ist auf die direkte Interaktion zwischen G1m und dem inhibierenden Rezeptor ILT2 zurückzuführen.

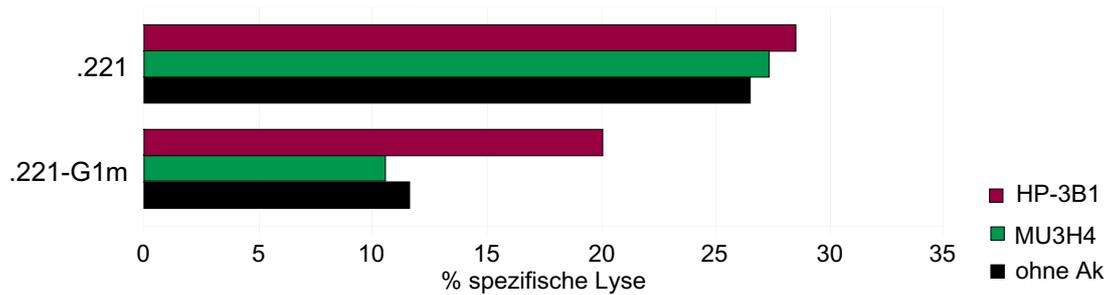


Abb. 5.5.12: Die durch HLA-G1 vermittelte Inhibition der NK-Zellen ist nur teilweise auf die Interaktion zwischen HLA-E und CD94/NKG2A zurückzuführen

Untransfizierte .221-Zellen sowie die HLA-G1m-Transfektante wurden nach der Markierung mit Na⁵¹Cr mit einem CD94-spezifischen mAk (HP-3B1, roter Balken), einem Kontrollantikörper spezifisch für HLA-DR (MU3H4, grüner Balken) bzw. ohne mAk (schwarzer Balken) inkubiert und anschließend einem Chromfreisetzungstest mit der Zelllinie NKL in einem Effektor : Targetverhältnis von 1:5 unterzogen.

Eine Stabilisierung der HLA-E-Oberflächenexpression war vor allem in den G2m- und G4-Transfektanten nachweisbar, die Bindung des löslichen CD94/NKG2A-Rezeptors war mit allen Transfektanten zu sehen, wenn auch z.T. nur sehr schwach. Im funktionellen Test konnte eine Inhibition der Lyse durch die CD94/NKG2A-positive Zelllinie NKL nur für die G1m- und G3-Transfektante gezeigt werden. Nach Zugabe des Peptids G₃₋₁₁ aus der Signalsequenz von HLA-G, das ein Ligand für HLA-E ist, zeigten auch die übrigen Transfektanten eine Inhibition, so daß die Menge an Ligand entscheidend ist für den Schutz vor NK-Lyse. Der Schutz der G1m-Transfektante erfolgt nicht nur indirekt über die Interaktion zwischen HLA-E, komplexiert mit dem Peptid G₃₋₁₁, und dem CD94/NKG2A-Rezeptorkomplex, sondern auch durch direkte Erkennung des inhibitorischen NK-Rezeptors ILT2 durch HLA-G1.

5.6 INTERAKTIONEN DER HLA-G-ISOFORMEN

Die HLA-G-Isoformen G2m, G3 und G4 werden nicht nachweisbar an der Oberfläche exprimiert. Während v.a. G2m und G4 in der Lage sind, die HLA-E-Oberflächenexpression zu stabilisieren, nicht aber die Lyse der Transfektante durch NK-Zellen zu inhibieren, inhibierte die G3-Transfektante gut, stabilisierte jedoch schlechter. Eine Frage, die sich hierauf stellte, war, ob die HLA-G-Isoformen, insbesondere G2m und G4, möglicherweise eine spezielle Funktion in der Zelle ausüben können. Ein Hinweis für diese Annahme ergab sich bereits aus den Ergebnissen der Präzipitation mit W6/32 (s. Abb. 5.4.6). Deshalb wurden nun Immunpräzipitationen mit dem Ak A1.4, der HLA-E, nicht aber HLA-G erkennt durchgeführt, um zu prüfen, ob die Isoformen mit HLA-E kopräzipitiert werden können und mit einem TAP-spezifischen Antikörper, um zu testen, ob die Isoformen im TAP-Komplex enthalten sind.

Mit dem Antikörper A1.4 wurden die HLA-G-Polypeptide im Lysat nicht gesehen (Abb. 5.6.1, linke Seite). In der Immunpräzipitation nach milder Lyse mit Digitonin eingesetzt wurden alle HLA-G-Isoformen von A1.4 kopräzipitiert, wobei G1m und G3 am besten kopräzipitiert wurden, G2m am schwächsten (Abb. 5.6.1, rechts). Um auszuschließen, daß bei Fehlen eines Signals für die Isoformen ein Präzipitat verloren gegangen war, wurde zur Kontrolle eine Hälfte des Präzipitats aufgetrennt und mit dem Ak TP25.99 gefärbt, um das in den .221-Transfektanten enthaltene HLA-E nachzuweisen (Abb. 5.6.1, Mitte).

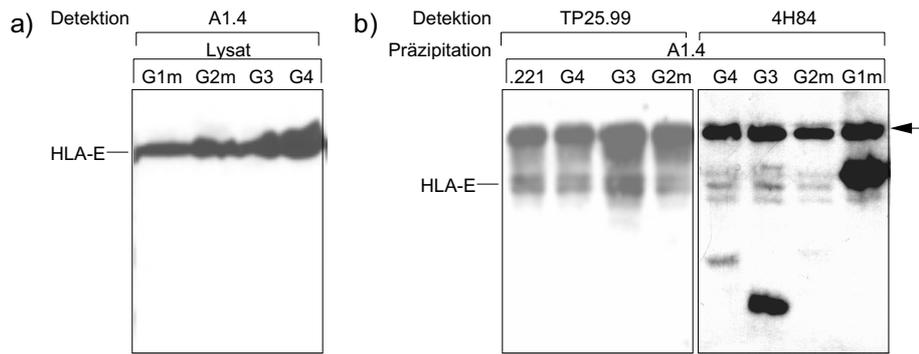


Abb. 5.6.1: Kopräzipitation der HLA-G-Isoformen mit dem Antikörper A1.4

- a) Je 100 µg Protein der HLA-G-Transfektanten wurden auf einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Übertragung auf Nitrocellulosemembran mit dem Ak A1.4 zur Erkennung von HLA-E gefärbt.
- b) Mit je 2×10^7 Zellen wurde nach Digitoninlyse eine Immunpräzipitation mit A1.4 durchgeführt, das Präzipitat in zwei Aliquots auf einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Übertragung auf Nitrocellulosemembran mit dem Ak 4H84 zum Nachweis von HLA-G oder TP25.99 zum Nachweis von HLA-E gefärbt. Für die Färbung von HLA-E mit TP25.99 und A1.4 ist eine kürzere Exposition gezeigt als für die Färbung mit 4H84. Die Ak-Bande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Ein Aliquot der Lysate entsprechend 1×10^6 Zellen wurde zur Abschätzung der Proteinmengen mit dem Ak 4H84 gefärbt (nicht gezeigt). Die Mengen an Protein für G1m bzw. für G2m, G3 und G4 entsprachen der Menge an G1m K15f bzw. G4 D7 in Abb. 5.4.1.

Die Tatsache, daß mit A1.4, der HLA-E präzipitiert, die HLA-G-Proteine selbst aber nicht erkennt, auch HLA-G präzipitiert werden konnte, könnte darauf zurückzuführen sein, daß eine durch die milden Bedingungen der Lyse mit Digitonin erhaltene Assoziation über den TAP-Komplex gegeben ist. Um diese Frage zu klären, wurde eine Immunpräzipitation mit einem TAP-spezifischen Antikörper durchgeführt. Mit dem Ak TP25.99 konnte HLA-E in den Präzipitaten nachgewiesen werden (Abb. 5.6.2, links), allerdings schwach im Vergleich mit G1m. Dies könnte an der geringeren Menge an HLA-E-Protein liegen. Allerdings wurde aus den untransfizierten .221-Zellen mehr präzipitiert als aus den Transfektanten, was auf eine effizientere Prozessierung von HLA-E in den Transfektanten durch Bereitstellung des geeigneten Peptidliganden hinweisen könnte. Die Färbung mit 4H84 zeigte, daß mit dem TAP-spezifischen Antikörper alle HLA-G-Proteine präzipitiert werden konnten (Abb. 5.6.2, Mitte), wobei G1m und G4 sehr gut präzipitiert werden, während G3 erst nach längerer Exposition deutlich zu sehen war, obwohl die Menge an G3-Protein im Lysat der an G4-Protein entsprach (Abb. 5.6.2, rechts). Von G2m war im Lysat deutlich weniger Protein enthalten, allerdings war nach sehr langer Exposition auch hier ein Signal zu sehen.

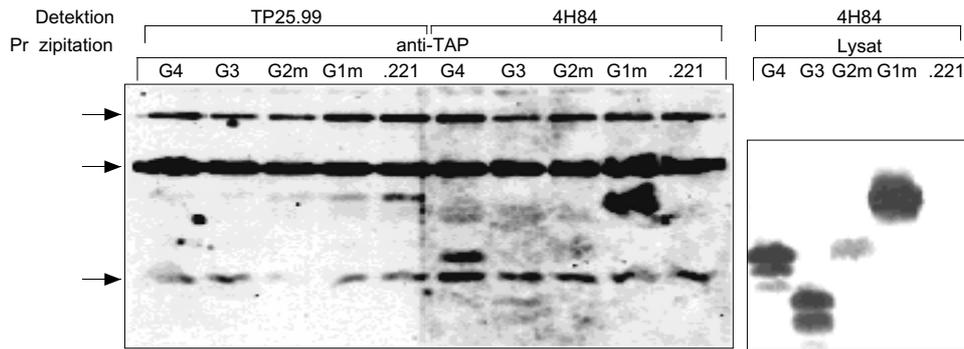


Abb. 5.6.2: Immunpräzipitation der HLA-G-Isoformen mit einem TAP-spezifischen Antikörper

Je 2×10^7 Zellen wurden nach Digitoninlyse mit dem TAP-spezifischen Antikörper 148.3 präzipitiert und in je zwei Aliquots auf einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Übertragung auf Nitrocellulosemembran wurde eine Hälfte der Membran mit dem Ak TP25.99 zum Nachweis von HLA-E inkubiert (links), die andere mit dem HLA-G-spezifischen Ak 4H84 (Mitte). Dicke Pfeile zeigen die Ak-Banden an. Zur Abschätzung der HLA-G-Proteinmenge wurde ein Aliquot des Lysats entsprechend 10^6 Zellen aufgetragen und mit dem Ak 4H84 gefärbt (rechts).

Der TAP-Komplex enthält vier, auch verschiedene, MHC-Klasse-I-Moleküle, so daß die Kopräzipitation von G1m mit A1.4 und dem TAP-spezifischen Antikörper auf das Vorkommen von G1m in diesem Komplex zusammen mit HLA-E zurückzuführen ist. Die Isoformen G2m und G4 werden von beiden Antikörpern etwa gleich gut präzipitiert, so daß auch diese beiden Formen vermutlich im TAP-Komplex enthalten sind. Ob die Assoziation allerdings direkt über TAP, das ebenfalls in diesem Komplex involvierte Tapasin oder sogar HLA-E stattfindet, bleibt noch zu klären. Auffallend ist das Verhalten von G3, das von A1.4 deutlich besser präzipitiert wird als vom TAP-spezifischen Ak. Dies könnte entweder an einer unterschiedlichen Zugänglichkeit der Ak-Epitope liegen, oder aber G3 ist auf eine andere Weise mit dem TAP-Komplex verbunden als die anderen Isoformen.

Alle Isoformen konnten mit A1.4 und einem TAP-spezifischen Antikörper präzipitiert werden. Dies bedeutet, daß auch die verkürzten HLA-G-Moleküle direkt oder indirekt mit dem TAP-Komplex interagieren.

6 DISKUSSION

6.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION VON HLA-G

Im Gegensatz zu den klassischen Klasse-I-Molekülen HLA-A und -B, deren Expression in humanen Trophoblasten eingestellt ist, wird HLA-G vorwiegend während der Schwangerschaft in der Plazenta exprimiert. Außer auf dem extravillösen Cytotrophoblasten, der in die Decidua Basalis eindringt, findet man HLA-G auch auf endothelialen Zellen der fetalen Blutgefäße in den Chorionzotten sowie in Amnionzellen und Amnionflüssigkeit. Aber auch in einer ganzen Reihe anderer Zellen und Gewebe konnte HLA-G inzwischen nachgewiesen werden, wenn auch die Menge im Vergleich mit klassischen Klasse-I-Molekülen um Größenordnungen geringer ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von HLA-G und den verkürzten HLA-G-Isoformen in Hautbiopsien nachgewiesen sowie in Gehirn und Muskel, die ebenfalls wenig Klasse-Ia-Moleküle exprimieren.

Der Nachweis der Transkripte für HLA-G und die verkürzten Isoformen in Hautbiopsien von Patienten mit unterschiedlichen Diagnosen mittels RT-PCR und Isoform-spezifischen Hybridisierungen ergab, daß HLA-G-Transkripte in fast allen Biopsien nachzuweisen waren, wobei G1m die vorherrschende Form war, gefolgt von G4, G2m und G3, während von den Transkripten für die löslichen Isoformen G1s sehr selten und G2s gar nicht zu sehen waren (Abb. 5.1.1). Da für die meisten Diagnosen nur jeweils eine Biopsie zur Verfügung stand, wurde eine Einteilung nach Krankheitsgruppen vorgenommen (Tab. 5.1). Eine Korrelation eines bestimmten Expressionsmusters mit einer bestimmten Gruppe konnte nicht nachgewiesen werden, und auch, wenn mehrere Biopsien für eine Diagnose vorhanden waren, ergab sich kein übereinstimmendes Muster (z.B. Psoriasis). Dies ist möglicherweise auf eine Heterogenität der Zellen in den Biopsien zurückzuführen, da vorläufige Immunhistochemie von Biopsieschnitten mit dem HLA-G-spezifischen Ak 87G zeigte, daß nur vereinzelte Zellen gefärbt werden, die den Makrophagen zuzuordnen sind. Selten sind Keratinozyten positiv, obwohl gezeigt wurde, daß diese HLA-G exprimieren und ihre HLA-G-Expression durch IFN γ stimuliert werden kann (Ulbrecht *et al.* 1994; Kozany 1998). Die Heterogenität des Expressionsmusters ist häufig bei der Untersuchung von HLA-G beschrieben worden, z.B. in T-Lymphozyten. Hier fanden sich HLA-G1m und die verkürzten Transkripte in 11 von 13 Proben und wiesen 6 verschiedene Muster auf (Amiot *et al.* 1996a). Das Volle-Länge-HLA-G-Transkript scheint also unter bestimmten Bedingungen differentiell gespleißt zu werden, vermittelt even-

tuell durch den unterschiedlichen Aktivierungszustand der untersuchten Zellen, wie es z.B. auch für LCA (leukocyte common antigen; Gen für die CD45-Familie), das in hämatopoietischen Zellen exprimiert wird, gezeigt ist: Das Spleißmuster hier beruht auf Zelltyp, Aktivierungsstatus und Entwicklung des Thymus und wird durch An- oder Abwesenheit negativer trans-agierender Spleißfaktoren reguliert. Auffallend in den Hautbiopsien war das Auftreten des G4-Transkripts, das fast so häufig nachzuweisen war wie das Transkript für G1m, da es normalerweise selten auftritt (in Trophoblasten aus dem ersten Trimester etwa 1:200 im Vergleich mit G1m (Kirszenbaum *et al.* 1994)). In der Gruppe der Neoplasien ist die G1m-Expression relativ am höchsten, was ein allgemein beobachtetes Ergebnis ist und z.B. auch in Übereinstimmung steht mit einer Untersuchung an 23 Melanompatienten (Paul *et al.* 1998). Untersuchungen an Biopsien dieser Patienten (gesunde Haut, Primärtumor, Lymphknotenmetastasen und Rezidiven) zeigten zum einen ebenfalls die beobachtete Heterogenität des Spleißmusters, zum andern war G1m aber in jedem Fall das häufigste Transkript, G1s das seltenste und G2/G4 (die hier nicht unterschieden wurden) das zweithäufigste. Allgemein war die Expression von HLA-G, auf mRNA- und Proteinebene, in gesunder Haut wesentlich geringer als in den Tumoren.

Gehirn und Muskel sind ebenfalls Bereiche mit geringer Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen und waren in bezug auf HLA-G-Expression bislang kaum untersucht worden. Deshalb wurde auch hier zunächst mittels RT-PCR die HLA-G-Expression in Material verschiedener Gehirnareale und einiger Muskelbiopsien von Patienten mit inflammatorischen Myopathien überprüft (Abb. 5.1.3 und 5.1.9). Um sicherzustellen, daß die HLA-G-Transkripte tatsächlich im Gehirn bzw. Muskel selbst hergestellt werden und nicht etwa von infiltrierenden Lymphozyten stammen, wurden des weiteren zwei Glioblastomzelllinien und Myoblasten untersucht (s. 6.2). Dabei war die Expression von HLA-G in jeder der untersuchten Proben nachzuweisen, allerdings gab es auch hier kein einheitliches Muster der einzelnen Isoformen (Abb. 5.1.6 und 5.1.9). Im Gegensatz zu den Hautbiopsien war in den Gehirnproben nicht G1m das häufigste Transkript, sondern das Amplifikat für G2/G4, die allerdings nicht unterschieden wurden. Bei den Muskelproben fand sich am häufigsten G3; G2 und G4 traten nie gemeinsam auf (Maier 1999).

Meine Resultate und die publizierten Ergebnisse zeigen, daß HLA-G konstitutiv außerhalb der Plazenta, wenn überhaupt, nur schwach exprimiert wird. Der positive Nachweis in Haut und Muskelbiopsien kann auf die Anwesenheit weniger aktivierter HLA-G-positiver Zellen zurückgeführt werden.

Die Rolle von HLA-G für die Tumorentstehung und/oder das Überleben des Tumors wird sehr kontrovers beschrieben. Der Trophoblast weist einige Eigenschaften neoplastischer Zellen auf, wie z.B. erhöhte mitotische und invasive Fähigkeiten und die Expression von Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Hormonen und Protoonkogenen, weshalb er auch als "pseudo-maligne" bezeichnet wurde (Ohlsson *et al.* 1989; Strickland und Richards 1992). Die physiologische Expression der MAGE-3- und MAGE-4-Gene, die in metastatischen Melanomen exprimiert werden, ist auf Placenta und Testis beschränkt, und Mel-CAM (melanoma cell adhesion molecule) wird in Melanomen und Trophoblasten exprimiert. Deshalb lag die Vermutung nahe, daß HLA-G, das präferentiell im Trophoblasten exprimiert wird und dort eine Rolle beim Schutz des Fetus vor der Erkennung und Abstoßung durch das Immunsystem der Mutter spielen soll, auch in Neoplasien diese Aufgabe erfüllen könnte. Eine Reihe von Gruppen beschreibt erhöhte HLA-G-Expression in den verschiedensten Tumoren und Tumorzelllinien und diskutiert dies im Zusammenhang mit einem Vorteil des Tumors durch Inhibition der Lyse durch NK-Zellen. So können HLA-G-Transkripte (G1m ist das jeweils vorherrschende Transkript) in Proben von akuter Leukämie, chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) und Non-Hodgkins-B-Zell-Lymphom (B-NHL) nachgewiesen werden. Dabei scheint das Expressionsmuster nicht mit einer bestimmten Lymphozyten-Subpopulation oder mit einem bestimmten malignen Proliferationsstatus gekoppelt, sondern ein Marker für reife Lymphozyten zu sein (Amiot *et al.* 1996a; Amiot *et al.* 1996b; Amiot *et al.* 1998). Andere Gruppen finden zwar in den meisten untersuchten Tumoren und Tumorzelllinien ebenfalls HLA-G-Expression auf mRNA-Ebene, bestreiten aber eine Rolle von HLA-G aufgrund der fehlenden Oberflächenexpression (Frumento *et al.* 1999; Real *et al.* 1999a; Real *et al.* 1999b). Sie schließen aber eine mögliche Funktion der Isoformen, die mit den verwendeten Ak nicht nachgewiesen werden können, nicht aus. Eine andere Untersuchung führte zum Nachweis von HLA-G-Antigen in aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen aus 5/18 Tumorbiopsien (Lungenkarzinom), d.h. HLA-G kann in Effektorzellen unter speziellen inflammatorischen Bedingungen exprimiert werden, auch in U-937-Zellen nach Stimulation mit IFN γ (Pangault *et al.* 1999). Makrophagen und Trophoblasten haben einige Gemeinsamkeiten, so die Fähigkeit zur Phagozytose, Synzytienbildung, Invasion und die Expression einer Reihe von Proteinen (Guilbert *et al.* 1993). HLA-G-Expression in akzessorischen Immunzellen, die zu Endozytose, Prozessierung und Präsentation von Antigenen in der Lage sind, läßt vermuten, daß HLA-G eine modulatorische Rolle bei der Immunantwort gegen Tumore spielen könnte. Durch seine Fähigkeit, Antigene zu präsentieren, könnte HLA-G die Lymphozytenaktivität beeinflussen (anti-HLA-G-Antikörper induzieren die Aggregation von .221G-Gen-Transfektanten). Außerdem kann HLA-G direkt oder indirekt über HLA-E NK-vermittelte Lyse oder Aktivierung von T-Zellen verhindern und so die Umgebung zugunsten des Tumors beeinflussen. Die Interaktion von HLA-G mit mononukleären Effektorzellen kann eine Th2-Antwort fördern. Es wurde gezeigt, daß Kokultivierung von PBMC (peripheral blood mononuclear cells) mit HLA-G-exprimierenden

Zellen deren Fähigkeit der Cytokinfreisetzung veränderte: Die Mengen an IL-3 (wichtig für plazentares Wachstum) und IL-1 β (wichtig für Wachstum und Invasion des Trophoblasten) sind erhöht, die Menge an TNF- α (unterdrückt das Wachstum des Trophoblasten und induziert Apoptose in villösen Trophoblasten) verringert (Maejima *et al.* 1997).

Die Expression von HLA-G muß also nicht nur im Zusammenhang mit der Inhibition der Lyse durch NK-Zellen betrachtet werden. HLA-G könnte auch eine modulierende Wirkung auf andere Zellen ausüben, denn Rezeptoren, die HLA-G als Liganden erkennen können, sind nicht nur auf NK-Zellen, sondern auch auf einer Reihe anderer Zellen beschrieben worden, wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen. Die Interaktion von HLA-G mit ILT2 beispielsweise kann auch zu einer Inhibition der transendothelialen Wanderung von NK-Zellen führen, wenn auch nur in einem sehr frühen Stadium der Zellwanderung (Dorling *et al.* 2000). Wenn NK-Zellen nun z.B. eine Rolle bei der Plazentabildung und Trophoblasteninvasion spielen, könnte HLA-G auf diese Weise ihre Anwesenheit an den benötigten Orten verlängern. Einen Überblick über die bislang bekannten HLA-G-erkennenden Rezeptoren gibt Tabelle 6.1.

Rezeptoren für HLA-G	Expression der Rezeptoren	andere Klasse-I-Liganden	Referenz
LIR-1/ILT2	NK-Zellen, T-Zell-Subpopulation, B-Zellen, myelomonozytische Zellen	HLA-A, -B (Bw4, Bw6)	(Colonna <i>et al.</i> 1997; Cosman <i>et al.</i> 1997)
ILT4	Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen	HLA-A, -B	(Colonna <i>et al.</i> 1998)
p49 (KIR2DL4)	alle NK-Zellen, Subpopulation von KIR ⁺ -T-Zellen (α/β - oder γ/δ -TCR ⁺)	HLA-A3, -B7, -B46-Allele	(Cantoni <i>et al.</i> 1998)
BY55	NK-Zellen, Subpopulation zirkulierender CD8 ⁺ T-Zellen, intestinale intra-epitheliale T-Zellen	Klasse Ia, HLA-E	(Agrawal <i>et al.</i> 1999)

Tab. 6.1: Inhibitorische Rezeptoren, die HLA-G als Liganden erkennen

In Tabelle 6.1 sind die bislang beschriebenen inhibitorischen Rezeptoren aufgeführt, für die neben der Erkennung anderer Klasse-I-Moleküle auch eine Erkennung von HLA-G1 gezeigt werden konnte. Angegeben sind außerdem alternative Namen dieser Rezeptoren und ihre Verteilung.

Können diese Rezeptoren auch die verkürzten HLA-G-Isoformen erkennen? Für ILT2 (LIR-1) wurde gezeigt, daß für die Interaktion zwischen Rezeptor und HLA-Klasse-I-Ligand die N-

terminale Domäne (D1) des Rezeptors und die $\alpha 3$ -Domäne des Liganden entscheidend sind und weder Glycosylierung noch gebundenes Peptid eine Rolle spielen (Chapman *et al.* 1999). Auch für die mehr als 1000fach stärkere Bindung von ILT2 an UL18, ein Klasse-I homologes Molekül des humanen Cytomegalovirus, dessen extrazellulärer Anteil zu etwa 25% identisch mit der Aminosäuresequenz der Klasse-I-Moleküle ist, ebenfalls drei Domänen aufweist, mit β_2m und Peptid assoziieren kann, ist die $\alpha 3$ -Domäne entscheidend. Demzufolge käme von den verkürzten HLA-G-Isoformen nur HLA-G2 als möglicher Ligand für ILT2 in Frage, da in HLA-G4 und -G3 diese Domäne nicht enthalten ist. Durch Bindung der am wenigsten polymorphen Domäne der Klasse-I-Moleküle ($\alpha 3$) kann ILT2 ein weites Spektrum an Klasse-I-Molekülen binden (Colonna *et al.* 1997; Lanier 1997; Fanger *et al.* 1998; Navarro *et al.* 1999b). Im Gegensatz dazu sind die KIR in ihrem Ligandenspektrum stärker beschränkt, und für die p58 KIR wurde gezeigt, daß sie ein Epitop innerhalb der polymorphen $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -Region des Klasse-I-Moleküls erkennen (Lanier 1997). Falls dies auch für andere Mitglieder der KIR-Familie zutrifft, wäre HLA-G4, das diese beiden Domänen enthält, ein möglicher Ligand, während HLA-G2 und -G3 die $\alpha 2$ -Domäne fehlt.

6.2 IFN γ ERHÖHT SELEKTIV DIE EXPRESSION VON G1 m IN GLIOBLASTOMZELLEN UND MYOBLASTEN

In den hier untersuchten Glioblastomzellen und Myoblasten zeigte sich bei Stimulation mit IFN γ eine deutliche Erhöhung der HLA-G-Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 5.1.5, 5.1.6 und 5.1.9). Der Proteinnachweis für Muskelbiopsien und isolierte Myoblasten mittels Immunhistochemie und FACS-Analyse wurde im Labor von Dr. Hohfeld durchgeführt (Wiendl *et al.* 2000). Färbung von Schnitten normaler Muskeln, Muskeln von Patienten mit Polymyositis (PM), Dermatomyositis (DM) oder Inclusion Body Myositis (IBM) mit den HLA-G-spezifischen Antikörpern 87G und 4H84 ergab ein Verteilungsmuster ähnlich den Klasse-Ia-Molekülen (kein Nachweis in normalem Muskel, aber in 5/6 PM, 5/6 DM, 5/5 IBM), wenn auch in geringerer Menge. Kultivierte Myoblasten verschiedener Donoren zeigten keine konstitutive Oberflächenexpression von HLA-G, Behandlung mit IFN γ induzierte diese aber. Auch in den Glioblastomzellen konnten Protein- und Oberflächenexpression untersucht werden, die ebenfalls nach Behandlung mit IFN γ deutlich zunahm (Abb. 5.1.7 und 5.1.8). Die von einigen Gruppen beobachtete Diskrepanz zwischen mRNA-Menge und Proteinexpression, die auf eine Regulation auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene hinweist, war hier nicht zu beobachten (Amiot *et al.* 1998; Pangault *et al.* 1999; Real *et al.* 1999a). Eine signifikante Stimulierbarkeit

ergab sich dabei allerdings nur für das Transkript bzw. Protein G1m, die Isoformen wurden nicht beeinflusst. Die Ergebnisse zeigen, daß bei Entzündungsreaktionen in vielen Zellen HLA-G auf der Oberfläche induziert werden kann. Dies bewirkt möglicherweise eine Abschwächung der inflammatorischen Reaktionen.

Die Analyse des HLA-G-Genpromotors zeigt, daß der Großteil der regulatorischen Sequenzen, die eine zentrale Rolle für die HLA-Klasse-I-Hochregulation spielen, wie Enhancer A, interferon responsive element (IRE, Interferon Consensus Sequenz (ICS)) und site α (wichtig für den IFN γ -Transaktivierungsweg über CIITA), in der HLA-G-Sequenz mutiert sind. Das HLA-G-Gen weist eine 16-bp-Deletion in der Enhancer A/IFN-Consensus-Sequenz-Region auf, die dazu führt, daß 5 bp am 3'-Ende des 13-bp-Palindroms der Sequenz A (Erkennung durch DNA-bindende Proteine der KBF/NF-kB/c-rel-Familie) sowie weitere 12 bp 3' fehlen (Geraghty *et al.* 1987; Koller *et al.* 1989). Außerdem zeigt ein Vergleich der 11-bp-Sequenz B bei HLA-G zwei Basenpaaraustausche im Vergleich mit der invarianten Sequenz bei HLA-A, -B, -C (Geraghty *et al.* 1987). Ebenso fehlt das negativ regulatorische Element des HLA-A2-Gens (Chiang und Main 1994). *In-vivo*-Studien mit transgenen Mäusen haben gezeigt, daß ein 244-bp-*Hind* III-*Eco*R I-Fragment 1,2 kb 5' des Gens die plazentaspezifische hohe Expression kontrolliert (Schmidt und Orr 1995). Im 5'-Teil dieses Fragments binden viele Kernfaktoren zur Regulation der HLA-G-Transkription; für die Stimulierbarkeit mit IFN γ scheint dieses Fragment aber keinerlei Bedeutung zu haben (Hölscher 1998; Lefebvre *et al.* 1999).

Es war lange davon ausgegangen worden, daß IFN γ keinen Effekt auf die HLA-G-Expression haben sollte. Aber schon 1990 zeigte Rinke de Wit, daß Stimulation mit IFN γ in der Teratokarzinomzelllinie Tera-2 zu einem starken Anstieg von G1m-mRNA führt, während in der Chorionkarzinomzelllinie Jeg-3 bereits im unstimulierten Zustand viel G1m-mRNA nachweisbar ist und IFN γ zu keiner weiteren Erhöhung führt (Rinke de Wit *et al.* 1990). Die Induktion der HLA-G-Oberflächenexpression in peripheren Blutmonozyten korrelierte nicht mit einer Zunahme der HLA-G-Transkripte. Dies kann auf post-transkriptionelle Mechanismen zurückgeführt werden (Lefebvre *et al.* 1999), z.B. durch Induktion von TAP-Proteinen, wie es für die Hochregulation von klassischem Klasse I nach IFN γ -Behandlung in villösen Trophoblasten aus terminaler Plazenta beschrieben wurde (Rodriguez *et al.* 1997).

Für die Makrophagenzelllinie U-937, die als Positivkontrolle verwendet wurde, und Monozyten war gezeigt worden, daß HLA-G auf mRNA-Ebene und in der Oberflächenexpression mit IFN γ stimulierbar ist (in U937-Zellen waren G1m und G1s erhöht). Eine Zunahme der mRNA-Menge entsprach dabei der Zunahme der Zelloberflächenexpression. In der Immunocytochemie und der FACS-Analyse ergaben sich keine Hinweise für eine intrazelluläre Retention von HLA-G (Yang *et al.* 1996). IFN γ führt in HLA-G-transfizierten Mausfibroblasten zu einer Zunahme von mRNA- und Oberflächenexpression. Dazu könnte ein putatives GAS-(γ -Interferon activated

site)-Element (-732 bis -740) führen (Chu *et al.* 1999). Das Element, das für die Stimulierbarkeit mit IFN γ verantwortlich ist, muß im Bereich des 6-kb-*Hind* III-Fragments von HLA-G liegen, es muß aber andere "IFN γ -responsive elements" außerhalb der 1,4 kb-Promoterregion von HLA-G geben, wie sie z.B. in der Region 3' der Transkriptionsinitiationsstelle in Klasse-I-Genen der Maus beschrieben sind (Korber *et al.* 1987; Chu *et al.* 1999; Lefebvre *et al.* 1999). Oder aber, wie z.B. Yang annimmt, kommt es durch die IFN γ -Behandlung nicht zu einer erhöhten Transkriptionsrate, sondern eher zu einer Stabilisierung der mRNA (Yang *et al.* 1996). Allerdings zeigten Untersuchungen nach Behandlung mit Actinomycin D oder Cycloheximid, daß IFN γ keinen Einfluß auf die Abbaurate der HLA-G-mRNA hat (Hölscher 1998; Chu *et al.* 1999).

IFN γ kann also unter inflammatorischen Bedingungen zu einer Hochregulation von HLA-G führen. Die IFN γ -Effekte auf die HLA-G-Antigenexpression sind allerdings zellinienspezifisch. IFN γ wird auch in Trophoblastenzellen synthetisiert, mit einem Höhepunkt in Plazenten der frühen Schwangerschaft, zu einem Zeitpunkt, wo die HLA-G mRNA in villösen Stromazellen ebenfalls vorherrscht (Yang *et al.* 1996).

Neben der möglichen Interaktion von HLA-G mit inhibitorischen Rezeptoren und den daraus resultierenden inhibierenden oder immunmodulatorischen Wirkungen (s. 6.1) sind weitere mögliche Aufgaben für HLA-G denkbar.

In Fällen von PM und sporadischer IBM wandern CD8⁺ T-Zellen und Makrophagen in anfangs nicht-nekrotische Muskelfasern ein. Eine solche Ansammlung inflammatorischer Zellen führt u.a. zur Ausschüttung von IFN γ , das die Expression von Klasse-I-Molekülen induziert. Daraus wird auf eine Klasse-I-restringierte CTL-vermittelte Antwort gegen Antigene geschlossen, die von diesen Muskelfasern exprimiert werden. HLA-G kann wie die Klasse-Ia-Moleküle mit β_2m und dem TAP-Transporter assoziieren, des weiteren ist es in der Lage, Peptide und CD8 zu binden. Also könnten einige der autoaggressiven T-Zellen ihr Antigen auch im Kontext von HLA-G erkennen bzw. könnten bakterielle oder virale Antigene mit diesem Molekül präsentiert werden. Für HLA-G wird in der Plazenta außerdem eine Rolle in der Angiogenese vermutet (Blaschitz *et al.* 1997). Glioblastome sind sehr aggressive Astrozytome, die sich durch starke Angiogenese und ein sehr rasches infiltrierendes Wachstum auszeichnen, was auch ein Kennzeichen von Trophoblasten ist. HLA-G kann in endothelialen Zellen embryonaler Blutgefäße nachgewiesen werden, in denen Angiogenese stattfindet, und die Entwicklung terminaler Chorionzotten hängt vom Kapillarwachstum ab. Außerdem konnte gezeigt werden, daß bei Präeklampsie, einer Störung der Schwangerschaft, die mit einer Fehlfunktion der endothelialen Zellen einhergeht, die zu einer Vasokonstriktion in der fetoplazentaren Zirkulation und schließlich zu Hypoxie führt, HLA-G-Expression auf den extravillösen Cytotrophoblasten nicht

mehr nachweisbar ist (Hara *et al.* 1996; Taylor 1997). Ob HLA-G selbst ein gefäßbildender Stimulus für die Migration und/oder Proliferation fetaler endothelialer Zellen ist, muß allerdings noch geklärt werden. Eine andere Möglichkeit wäre die Beeinflussung der Cytokinfreisetzung und/oder -Wirkung. HLA-G exprimierende Trophoblasten in direktem Kontakt mit maternalen Lymphozyten und Makrophagen modulieren deren Freisetzung von Cytokinen wie IL-3, TNF α und IL-1 β (Maejima *et al.* 1997). IL-2, das in präklimptischen Plazenten, nicht aber bei normalen Schwangerschaften exprimiert wird, inhibiert das Zellwachstum HLA-G-negativer Trophoblasten-Zelllinien, hat aber keinen Einfluß auf HLA-G-positive Zelllinien (Hara *et al.* 1996; Goldman-Wohl *et al.* 2000). Diese von HLA-G vermittelte Beeinflussung der Cytokinwirkung ist aber nicht auf Trophoblasten beschränkt, IL-2 hat z.B. auch einen wachstumsfördernden Effekt auf B-Zelllinien, der nach Transfektion von HLA-G völlig verlorenggeht (Hamai *et al.* 1999).

6.3 WO WERDEN DIE HLA-G-ISOFORMEN IN DER ZELLE EXPRIMIERT?

Um den Anteil der einzelnen Isoformen an der Funktion von HLA-G zu untersuchen, wurden Transfektanten für die einzelnen Isoformen hergestellt. Außer G1m und G1s konnte in keiner der Transfektanten der Isoformen ein Anteil an EndoH-resistentem Protein nachgewiesen werden (Abb. 5.4.5), was gegen eine Expression der Isoformen auf der Oberfläche bzw. von löslichem G2 im Überstand spricht. Daß dieser Befund nicht transfektantenspezifisch ist, zeigte die Untersuchung von HLA-G aus Jeg-3-Zellen, Cytotrophoblasten und HLA-G4 in K-562 (Valeska Hofmeister, persönliche Mitteilung). Auch hier waren außer G1m die Isoformen, soweit nachweisbar, EndoH-sensitiv. Eine in Kooperation mit Dr. Heinz Hutter (Graz) hergestellte G2m-Transfektante in K-562, bei der das Protein mit einem carboxyterminalen FLAG-Epitop versehen ist, konnte auf Cytospins nach Färbung mit einem FLAG-Antikörper ebenfalls nur im Cytosol, nicht aber auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Mittlerweile wurden diese Befunde auch von anderen Gruppen bestätigt. So wurde kürzlich gezeigt, daß von den Fusionsproteinen der Isoformen mit EGFP in Transfektanten der L929+h β_2 m-Mauszelllinie oder der humanen JAR-Zelllinie nur G1m auf der Oberfläche zu sehen ist, während die verkürzten Isoformen im ER zurückgehalten werden (Le Bouteiller 2000). Der Zelloberflächenexpression von Klasse-I-Molekülen gehen verschiedene im ER stattfindende Schritte voraus, so z.B. die Assoziation von Calretikulिन mit dem Dimer aus schwerer Kette (HC) und β_2 m (Sadasivan *et al.* 1996). Dies erfordert die Interaktion mit Glycanresten in der α 1-Domäne, die in allen HLA-G-Isoformen enthalten ist, aber auch mit der As 277 in der α 3-Domäne (Harris *et al.* 1998). Die

Assoziation von HLA-G mit Calretikulin konnte in JEG-3-Zellen gezeigt werden (Wainwright *et al.* 1998). Das Fehlen der $\alpha 3$ -Domäne in HLA-G3 und -G4 sollte eine solche Assoziation verhindern. Der folgende Schritt ist die Interaktion des HC/ β_2 m/Calretikulin-Komplexes mit dem TAP-Transporter, was zu einer Freisetzung von der ER-Membranoberfläche führt. In β_2 m-defizienten Zellen findet dies nicht statt, was darauf hindeutet, daß TAP nicht mit freien schweren Ketten interagieren kann (Carreno *et al.* 1995). Die Expression von HLA-G ist TAP-abhängig, denn in TAP-defizienten Zellen ist die HLA-G-Expression stark reduziert (Lee *et al.* 1995). Da sowohl die $\alpha 2$ - als auch die $\alpha 3$ -Domäne für diese Interaktion mit TAP wichtig ist, kann das Fehlen einer dieser Domänen die TAP-Assoziation der verkürzten HLA-G-Isoformen mit TAP verhindern (Suh *et al.* 1999). Der letzte essentielle Schritt schließlich ist die Bindung eines geeigneten Peptids an den HC/ β_2 m/Calretikulin/TAP-Komplex. In Zellen mit defekter Peptidbeladung werden die meisten neusynthetisierten Klasse-I-Moleküle rasch wieder abgebaut (Brodsky *et al.* 1996). Die Unfähigkeit der HLA-G-schweren-Kette mit β_2 m, von HC/ β_2 m mit Calretikulin und von HC/ β_2 m/Calretikulin mit TAP zu assoziieren, führt folglich zu einer äußerst mangelhaften Peptidbeladung und damit Zelloberflächenexpression. Abgesehen davon ist für HLA-G3 und -G2 eine mögliche Peptidbeladung eher unwahrscheinlich, da die Peptidbindungsgrube von der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne gebildet wird und die $\alpha 2$ -Domäne diesen beiden Isoformen fehlt.

Es gibt also bislang keine Indizien für eine extrazelluläre Expression der HLA-G-Isoformen. Das Argument, daß das Auftreten dieser vielfältigen Spleißvarianten, wie es für HLA-G der Fall ist, ein Zeichen für Gene ist, die nicht länger funktionell sind, ist allerdings nicht länger haltbar. Analoge MHC-Gene mit starker Expression in der Plazenta und ähnlichen Spleißvarianten wurden z.B. bei Rhesusaffe (Mamu-AG) und Pavian gefunden (Boyson *et al.* 1997; Slukvin *et al.* 1998). Die verkürzten HLA-G-Isoformen sind also zumindest in anderen Primaten konserviert.

ERKENNUNG VON HLA-G UND DEN HLA-G-ISOFORMEN DURCH DEN AK W6/32 UND MÖGLICHE INTERAKTION MIT β_2 m

In der FACS-Analyse konnte G1m auf der Zelloberfläche der Transfektanten mit W6/32 gefärbt (Abb. 5.3.1), lösliches G1 im ELISA über Bindung an W6/32 nachgewiesen und die Isoformen mit W6/32 präzipitiert werden (Abb. 5.4.6).

W6/32 erkennt ein Konformationsepitop, das von der Klasse-I-schweren-Kette, nicht-kovalent assoziiert mit β_2 m, gebildet wird. Die Aminosäurepositionen 89 und 44 in β_2 m sind die Schlüs-

selaminosäuren für die W6/32-Epitopbildung (Jefferies und MacPherson 1987), des weiteren ist der korrekte N-Terminus essentiell (Shields und Ribaldo 1998). Auf seiten der Klasse-I-schweren-Kette sind die $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Domäne beteiligt, wobei besonders Aminosäureposition 121 eine wichtige Rolle spielt (K in allen Klasse-I-Molekülen) (Maziarz *et al.* 1986; Jefferies und MacPherson 1987; Tanabe *et al.* 1992). An der Assoziation von β_2m und Klasse-I-schwerer-Kette sind Aminosäurepositionen in allen drei Domänen der schweren Kette beteiligt, besonders aber die $\alpha 3$ -Domäne, die auch zwischen allen Klasse-I-Molekülen die konservierteste ist, spielt hierbei eine wichtige Rolle (Saper *et al.* 1991). Ob die verkürzten HLA-G-Polypeptide in der Lage sind, mit β_2m zu assoziieren, ist bislang nicht untersucht. Besonders für G3 ($\Delta\alpha 2$, $\Delta\alpha 3$) ist schwer vorstellbar, wie es mit W6/32 und/oder β_2m reagieren sollte. Für G2m ($\Delta\alpha 2$) allerdings ist die Präzipitation nach Biotinylierung der Zelloberflächenmoleküle mittels W6/32 beschrieben worden (Rouas-Freiss *et al.* 1997). Dies ist erstaunlich, denn erstens spricht u.a. die EndoH-Sensitivität von G2m gegen eine Expression auf der Zelloberfläche und zweitens wurde in FACS-Analysen und mittels Immunpräzipitation gezeigt, daß nach Biotinylierung von Klasse-I-Molekülen (auch HLA-G) das W6/32-Epitop zerstört ist (Malik *et al.* 1999). Inzwischen hat Frau Rouas-Freis die Behauptung, daß HLA-G2 mit β_2m assoziiert auf der Zelloberfläche ihrer Transfektanten exprimiert wird, allerdings zurückgezogen.

Kürzlich wurde gezeigt, daß HLA-B27, das ein zusätzliches Cystein in der $\alpha 1$ -Domäne (Pos. 67) besitzt, dadurch in Abwesenheit von β_2m , schwere-Kette-Homodimere bildet, die immer noch eine Reihe von Peptiden binden können und die von W6/32 erkannt werden (Allen *et al.* 1999). HLA-G enthält ebenfalls ein zusätzliches Cystein in der $\alpha 1$ -Domäne (Pos. 42) und ein weiteres in der $\alpha 2$ -Domäne. Es wäre also durchaus denkbar, daß auch die HLA-G-Isoformen dimerisieren können und dadurch auch ohne β_2m das W6/32-Epitop gebildet werden könnte. So ist im Augenblick nicht zu entscheiden, ob die Präzipitierbarkeit der HLA-G-Isoformen auf direkte oder indirekte Erkennung durch diesen Ak zurückzuführen ist.

Die ersten beiden Domänen ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) bilden die Peptidbindungsgrube und die Kontaktstellen für die Erkennung durch den T-Zellrezeptor, während die $\alpha 3$ -Domäne mit dem T-Zell-Korezeptor CD8 assoziiert. Die proteolytische Entfernung der $\alpha 3$ -Domäne von einem Klasse-I-Molekül (Aw68) zeigte keine bedeutenden morphologischen Veränderungen im Vergleich mit dem intakten Protein und nur einen geringen Unterschied in der Lage des β_2m und hat offensichtlich auch keinen Einfluß auf die Peptidbindung (Collins *et al.* 1995). Für HLA-G4 ($\Delta\alpha 3$) wäre eine solche Struktur also vorstellbar.

6.4 HLA-G UND DIE ÜBER HLA-E VERMITTELTE INDIREKTE INTERAKTION MIT CD94/NKG2A

Zunächst wurde HLA-G-Interaktion mit p58.1 (NKAT1; Cw2, 4, 5, 6), p58.2 (NKAT2; Cw1, 3, 7, 8) (Pazmany *et al.* 1996) und mit NKAT3 (Bw4) beschrieben (Münz *et al.* 1997). Dabei waren die benötigten HLA-G-Mengen aber erheblich höher als für den eigentlichen Liganden (Pazmany *et al.* 1996; Pazmany *et al.* 1999). Später wurde von anderen Gruppen gezeigt, daß HLA-G keine Interaktion mit diesen KIR zeigt, sondern daß HLA-G wie auch eine ganze Reihe von HLA-Klasse-Ia-Molekülen durch CD94 erkannt werden (Phillips *et al.* 1996; Pende *et al.* 1997; Perez-Villar *et al.* 1997; Söderström *et al.* 1997). Dies wurde aus der effektiven Inhibition der NK-Lyse durch die entsprechenden Transfektanten in HLA-A-, -B-, -C-negativen .221-Zellen gezeigt. Es sollten deshalb die Transfektanten der HLA-G-Isoformen eingesetzt werden, um eine mögliche Interaktion dieser verkürzten HLA-G-Formen mit CD94/NKG2A zu untersuchen.

6.4.1 DAS PEPTID G₃₋₁₁ AUS DER SIGNALSEQUENZ VON HLA-G IST EIN LIGAND FÜR HLA-E UND KANN DESSEN OBERFLÄCHENEXPRESSION STABILISIEREN

In der Zwischenzeit ergab sich allerdings ein ganz anderes Bild, in dem HLA-E plötzlich die entscheidende Rolle bei der Erkennung durch CD94/NKG2A übernahm. V. Braud und Kollegen konnten zeigen, daß die hauptsächlichen Liganden, die in einer TAP- und Tapasin-abhängigen Weise von HLA-E gebunden werden, Nonamere (As 3-11) aus der Signalsequenz bestimmter Klasse-I-Moleküle sind, wie es auch für das HLA-E-homologe Qa-1-Molekül der Maus beschrieben ist (Braud *et al.* 1997a; Braud *et al.* 1997b). Dabei ist ein Methionin (M) an Pos. 2 des Liganden, wie es in einem Großteil der Signalpeptide an Pos. 4 vorkommt, entscheidend für die Bindung. Klasse-I-Moleküle mit Threonin (T) an dieser Stelle, wie es in den meisten B-Allelen der Fall ist (z.B. in B27), zeigen keine Bindung und führen nicht zu einer Erkennung durch den CD94/NKG2A-Rezeptorkomplex. Weitere Ankerpositionen sind Pos. 9 und in geringerem Maß Pos. 7. Ein Vergleich der Signalsequenzen (Abb. 6.1) zeigt, daß auch das Peptid G₃₋₁₁ von HLA-G die für die Bindung an HLA-E notwendigen Merkmale aufweist und ebenfalls einen Liganden für HLA-E liefern kann. HLA-E selbst und HLA-F liefern kein geeignetes Peptid (Braud *et al.* 1997a; Braud *et al.* 1997b).

also unreife, die im ER zurückgehalten wird (Braud *et al.* 1997b). Nach Transfektion bestimmter Klasse-I-Allele oder HLA-G in diese Zelllinie steht aber ein Ligand für HLA-E zur Verfügung, durch den die Zelloberflächenexpression induziert wird. Dies wurde durch Färbung mit dem Ak DT9 (erkennt HLA-E und HLA-C) und das Auftreten reifer Formen von HLA-E nachgewiesen (Braud *et al.* 1997b). Diese Befunde erklärten die anfangs etwas irritierende Feststellung, daß in HLA-G-Transfektanten in der FACS-Analyse nach Färbung mit Ak wie A1.4, die HLA-G nicht erkennen, bei 37°C eine Zunahme im Vergleich mit der untransfizierten Kontrolle zu sehen war (Abb. 5.3.1).

Da gezeigt worden war, daß HLA-E bei 37°C auch mit Peptid keine signifikante Erhöhung der Oberflächenexpression zeigt, sondern erst bei 26°C (Ulbrecht *et al.* 1992; Borrego *et al.* 1998), wurden die Transfektanten ebenfalls bei 26°C und im Vergleich noch einmal bei 37°C \bar{u} n inkubiert und anschließend mit dem Ak A1.4 gefärbt (Abb. 5.5.1). Kürzere Inkubationszeiten, wie sie für X63-Transfektanten beschrieben wurden (Ulbrecht *et al.* 1992), zeigten bei .221 Zellen keinen Effekt, da diese das HLA-E^R-Allel besitzen. Die Inkubation der untransfizierten .221-Zellen führt bereits wie beschrieben zu einer deutlichen Verstärkung der Oberflächenexpression, die durch Zugabe von geeignetem Peptid (hier B7₃₋₁₁) noch weiter verstärkt wird. Für die HLA-G-Transfektanten sieht man bei 26°C nur bei der G2m und G4-Transfektante, die schon bei 37°C positiver sind, eine Zunahme, die der nach Zugabe von B7₃₋₁₁ zu .221 entspricht, während in der G1m-, G3- und G2s-Transfektante keine Zunahme der HLA-E-Oberflächenexpression festzustellen ist. Dieses Ergebnis kann bislang nicht erklärt werden, denn das Signalpeptid ist in jeder der Transfektanten identisch, und ein quantitativer Grund kann, wie unten noch gezeigt wird, ausgeschlossen werden.

6.4.2 DAS PEPTID B7₃₋₁₁ STABILISIERT NACH EXOGENER ZUGABE ZU .221-ZELLEN BESSER IM VERGLEICH MIT DEM PEPTID G₃₋₁₁

Die Beladung von HLA-E mit exogen zugegebenem Liganden erfolgt von außen, da dies in TAP-2-defizienten Mauszellen RMA-S funktioniert, während die Bereitstellung von endogenem Liganden in TAP-defizienten Transfektanten defekt ist (Braud *et al.* 1997b; Borrego *et al.* 1998). Die Stabilisierung von HLA-E auf der Zelloberfläche durch Inkubation mit dem Peptid B7₃₋₁₁ bei 26°C ist stärker als nach Zugabe von G₃₋₁₁ (Abb. 5.5.3). Dies stimmt mit dem Ergebnis von Braud *et al.* überein, daß die Konzentration von G₃₋₁₁ für eine 50%ige Bindung an HLA-E 0,3 μ M betragen muß, während von B7₃₋₁₁ 0,06 μ M ausreichen (A*0201 0,06 μ M, Cw*0304 0,3 μ M) (Braud *et al.* 1998). Zugabe von 100 μ M und 300 μ M G₃₋₁₁ zeigte allerdings nicht mehr HLA-E auf der Oberfläche. Während eine zweistündige Inkubation bei 37°C vor der

FACS-Färbung bei Inkubation mit dem Peptid B7₃₋₁₁ keinen Effekt hat, zeigt sich mit G₃₋₁₁ eine leichte Abnahme in der Expression von HLA-E (Abb. 5.5.3). Es wird eine Interaktion zwischen As 147 (Serin) und 152 (Glutaminsäure) von HLA-E mit Pos. 8 des Liganden angenommen (Braud *et al.* 1997a). Hier findet sich bei HLA-G ein Phenylalanin (F) an P8, während alle anderen Klasse-I-Moleküle ein Leucin (L) enthalten. Beide As sind hydrophob mit apolarer Seitenkette, F mit aromatischer, L mit aliphatischer. Für Pos. 8 ist nur gezeigt, daß eine hydrophobe As wichtig ist, sonst soll sie eigentlich kaum Einfluß haben auf die Bindung (Braud *et al.* 1997a; Braud *et al.* 1997b; O'Callaghan *et al.* 1998). Dieses F an Pos. 8 bei HLA-G führt zu geringerer HLA-E-Expression, soll aber keinen Einfluß auf die Interaktion mit CD94/NKG2A haben (Brooks *et al.* 1999). Durch die Inkubation mit dem geeigneten Peptid stabilisiert sich also ein funktioneller Komplex aus HLA-E/ β_2m /Peptid auf der Zelloberfläche, der von CD94/NKG2A erkannt werden kann. Die Koexpression von HLA-G-Polypeptiden reicht nicht unbedingt aus, um HLA-E auf der Zelloberfläche stabil zu exprimieren.

6.4.3 CD94/NKG2A ERKENNT HLA-E KOMPLEXIERT MIT EINEM GEEIGNETEN LIGANDEN AUF X63-TRANSFEKTANTEN, INTERAGIERT ABER NICHT DIREKT MIT HLA-G ODER HLA-B27

Um auszuschließen, daß CD94/NKG2A direkt mit HLA-G interagiert, wurden zunächst Transfektanten von HLA-E, HLA-G und HLA-B27 in der Mauszelllinie X63 mit einem löslichen CD94/NKG2A/PE-Rezeptorkomplex untersucht (Abb. 5.5.2). Die Färbung mit dem Ak B9.12.1, der Klasse-I-Moleküle komplexiert mit β_2m erkennt, zeigte die Expression von HLA-G, HLA-B27 sowie von HLA-E auch ohne Zugabe von Peptid schon bei 37°C. Die deutliche Oberflächenexpression von HLA-E rührt daher, daß zum einen in dieser Transfektante das E^G-Allel exprimiert ist und zum anderen entsprechende Peptide aus den Signalsequenzen der H-2D^d- und H-2L^d-Moleküle Liganden für HLA-E sind (Abb. 6.4.1) (Braud *et al.* 1997a). Diese HLA-E/ β_2m /Peptidkomplexe werden allerdings nicht von CD94/NKG2A erkannt, ebensowenig wie die HLA-G- und die HLA-B27-Transfektante. Erst nach Inkubation mit dem Peptid B7₃₋₁₁ aus der Signalsequenz des humanen B*0702-Allels, die zu einer deutlichen Verstärkung der Oberflächenexpression von HLA-E führt, zeigt sich eine starke Bindung von CD94/NKG2A. Obwohl also HLA-E auf der Oberfläche der X63-Transfektante im Komplex mit Peptiden exprimiert wird, erfolgt keine Interaktion mit dem Rezeptor. Das weist darauf hin, daß Stabilisierung von HLA-E nicht unbedingt auch Erkennung durch CD94/NKG2A bedeutet, wie dies auch für andere HLA-E-Liganden gezeigt wurde. Dies wiederum spricht für eine Peptidspezifität der Erkennung (Borrego *et al.* 1998; Brooks *et al.* 1999). Die Inkubation der Transfektanten bei

26°C führt für HLA-E bereits ohne Peptidzugabe zu einer deutlichen Zunahme der Oberflächenexpression im Vergleich mit 37°C, allerdings findet aus obengenannten Gründen auch hier keine Erkennung durch CD94/NKG2A statt. Nach Inkubation mit dem Peptid B7₃₋₁₁ bei 26°C wird der HLA-E/ β_2m /Peptidkomplex durch den löslichen CD94/NKG2A/PE-Rezeptorkomplex erkannt, allerdings deutlich schwächer als auf Zellen, die mit Peptid bei 37°C gehalten wurden. Dies kann folgendermaßen erklärt werden: Die in der X63-Zelle vorhandenen HLA-E-Liganden sind zwar geeignet für eine Stabilisierung von HLA-E, nicht aber für die peptidspezifische Erkennung durch CD94/NKG2A. Nach Zugabe des geeigneten Liganden (hier B7₃₋₁₁) bei 37°C werden die ungeeigneten Liganden ersetzt und die Erkennung kann stattfinden. Bei 26°C ist die Bindung der ungeeigneten Peptide stabiler, der Austausch gegen B7₃₋₁₁ ist nicht so effizient wie bei 37°C und der Anteil an HLA-E mit geeignetem Peptid für die Erkennung durch CD94/NKG2A folglich geringer. Eine Inkubation bei 26°C hat auf die HLA-G- und HLA-B27-Transfektanten keine Wirkung in bezug auf Oberflächenexpression und Bindung von CD94/NKG2A, und auch die Zugabe von B7₃₋₁₁ hat erwartungsgemäß keinen Einfluß, obwohl die Oberflächenexpression der Expression von HLA-E vergleichbar ist, d.h. an zu geringer Menge an HLA-G oder -B27 liegt die mangelnde Erkennung nicht.

Dies bedeutet, daß HLA-E komplexiert mit einem Peptid aus der Signalsequenz von Klasse-I-Molekülen von CD94/NKG2A erkannt wird. Nachdem aber die Erkennung durch CD94/NKG2A offensichtlich auch peptidspezifisch ist, kann aus dem hier gezeigten Ergebnis aber nicht ausgeschlossen werden, daß die fehlende Erkennung von HLA-B27 oder HLA-G möglicherweise am Mangel an geeigneten Liganden liegt, die in der Mauszelle eventuell fehlen könnten. Aber auch eine HLA-B27-Transfektante in humanen .221-Zellen wird nicht erkannt (Abb. 5.5.4.a), und nach Bereitstellung geeigneter Liganden für z.B. HLA-B27 oder HLA-A2 in Transfektanten in der Mauszelllinie RMA-S erfolgt ebenfalls keine Bindung von CD94/NKG2A. Auch die direkte Erkennung von HLA-G kann mittlerweile völlig ausgeschlossen werden, da gezeigt wurde, daß eine Mutation von Methionin an Pos. 2 nach Threonin in G₃₋₁₁ dazu führt, daß kein HLA-E auf der Oberfläche stabilisiert wird und keine Inhibition der Lyse durch CD94⁺ILT2⁻-Zellen erfolgt, während nach Zugabe des korrekten G₃₋₁₁-Peptids zu diesen Zellen die Inhibition wieder hergestellt ist (Navarro *et al.* 1999a). Dagegen wurde gezeigt, daß der Austausch der Signalsequenz von B*5801, dessen Expression in .221-Zellen keine Inhibition der Lyse vermittelt, da es keinen Liganden für HLA-E liefern kann, durch die Signalsequenz von HLA-G zu einer Inhibition der Lyse durch CD94/NKG2A⁺-Killerzellen führt (Braud *et al.* 1998). Es steht also außer Frage, daß die ursprünglich HLA-G (und anderen Klasse-I-Molekülen) zugeschriebene Inhibition der Lyse über CD94/NKG2A nur indirekt über das Signalpeptid P₃₋₁₁ gebunden an HLA-E erfolgt.

G₃₋₁₁ zeigt bei Versuchsbedingungen, bei denen es während der Durchführung nicht anwesend ist, keinen inhibitorischen Effekt. Wird es aber auch während des Chromfreisetzungstests zur Verfügung gestellt, zeigt sich eine deutliche Inhibition der Lyse (Abb 5.5.10). Manche Peptide müssen während der Testdurchführung anwesend sein, dies gilt aber in erster Linie offensichtlich für die Peptide mit T an P2, die als Nicht-Liganden für HLA-E beschrieben wurden, aber unter anderen Versuchsbedingungen doch einen Effekt zeigen (Brooks *et al.* 1999).

In parallel zum Chromfreisetzungstest durchgeführten FACS-Analysen zeigte sich, daß nach 4N-Inkubation in Anwesenheit von G₃₋₁₁ eine Stabilisierung von HLA-E auf der Oberfläche erfolgt. Wird vor der Färbung eine zweistündige Temperaturerhöhung auf 37°C eingeschoben, zeigt sich ein leichter Rückgang in der HLA-E-Oberflächenexpression, so daß anzunehmen ist, daß bei Durchführung des Chromfreisetzungstests bei 37°C ohne Anwesenheit des Peptids dieses möglicherweise verlorengelht und der korrekte HLA-E/ β_2m /Peptidkomplex für die Erkennung durch CD94/NKG2A nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung steht.

Für G₃₋₁₁ wurde eine hohe Affinität an HLA-E wegen einer niedrigeren Dissoziationsrate beschrieben (Vales-Gomez *et al.* 1999). Diese Ergebnisse wurde allerdings *in vitro* mit löslichem HLA-E/Peptid-Komplex und löslichem CD94/NKG2A-Rezeptor erhalten.

Die Ergebnisse deuten also an, daß das Peptid G₃₋₁₁ keinen guten Liganden für membranständiges HLA-E darstellt.

6.4.4 .221-G1m- UND K-562-G1m-TRANSFEKTANTEN UNTERSCHIEDEN SICH IN BEZUG AUF DIE STÄRKE DER HLA-E-STABILISIERUNG

Der Befund, daß HLA-G-Expression in den K-562-Transfektanten die Oberflächenexpression von HLA-E induziert, war überraschend, da K-562-Zellen HLA-E nur äußerst schwach transkribieren, also praktisch HLA-E negativ sind. Dies wird bestätigt durch die Ergebnisse, daß in K-562-Zellen durch Zugabe des Peptids B7₃₋₁₁ keine HLA-E-Oberflächenexpression induziert werden kann und keine Erkennung durch CD94 erfolgt. In den K-562-G1m-Transfektanten zeigt sich allerdings in der Färbung mit A1.4 eine deutliche Expression von HLA-E, und auch die Bindung von CD94 fällt sehr deutlich aus, stärker als in den .221G1m-Transfektanten, obwohl diese mehr an G1m-Protein enthalten und mehr HLA-E-Moleküle auf der Oberfläche zu finden sind (Abb. 5.5.4.b). Allerdings ist nicht sicher, ob alle Klasse-I-Moleküle, die im untransfizierten Zustand auf der Zelloberfläche von .221-Zellen nachzuweisen sind bzw. die durch Inkubation bei 26°C stabilisiert werden, wirklich HLA-E sind, da .221-Zellen auch HLA-F

exprimieren, das möglicherweise ebenfalls bei 26°C stabilisiert wird (Shimizu *et al.* 1988) und da die verwendeten Ak nicht HLA-E spezifisch sind. In den K-562-Transfektantenklonen muß die endogene HLA-E-Expression verstärkt sein. In untransfizierten K-562-Zellen wird im Gegensatz zu untransfizierten .221-Zellen kein HLA-E auf der Oberfläche exprimiert und kann deshalb durch B7₃₋₁₁ nicht stabilisiert werden. In den K-562-G1m-Transfektanten haben alle HLA-E-Moleküle, die an die Oberfläche kommen, das G₃₋₁₁-Peptid gebunden, und diese Menge, obwohl insgesamt gesehen niedriger als auf .221-Transfektanten, aber alle mit dem geeigneten Liganden komplexiert, reicht aus für eine stärkere Erkennung durch CD94/NKG2A. Außerdem exprimieren .221-Zellen das HLA-E^R-Allel, K-562-Zellen das HLA-E^G-Allel (E^G mit Gly an Pos. 107, E^R mit Arg an Pos. 107). X63-Transfektanten, die entweder das E^G- oder das E^R-Allel exprimieren, zeigen deutliche Unterschiede in der Stabilisierung der Oberflächenexpression nach Peptidzugabe mit z.B. B7₃₋₁₁ (Ulbrecht *et al.* 1999). Dies zeigt sich auch in Transfektanten der beiden Allele in K-562-Zellen, und dieser Unterschied findet sich auch in bezug auf die Inhibition der Lyse durch die Zelllinie NKL. Transfektanten der Allele in K-562-Zellen zeigen ebenfalls deutliche Unterschiede in der Bindung von Peptiden und in der Stabilisierung von HLA-E und daraus resultierend in der Inhibition der Lyse unter anderem mit G₃₋₁₁, wobei das Peptid stabiler an E^G bindet und im Kontext mit E^G die Lyse durch NKL effizienter inhibiert als mit E^R (Maier *et al.* 2000).

6.4.5 DIE TRANSFEKTANTEN DER HLA-G-ISOFORMEN UNTERSCHIEDEN SICH IN BEZUG AUF IHRE FÄHIGKEIT, HLA-E AUF DER ZELLOBERFLÄCHE ZU STABILISIEREN UND DIE LYSE ÜBER CD94/NKG2A ZU INHIBIEREN

Obwohl die G2m- und G4-Transfektanten eine deutlich bessere Stabilisierung der HLA-E-Oberflächenexpression zeigen als die G3-Transfektante, inhibieren sie die Lyse nicht, während HLA-G3 eine deutliche Inhibition der Lyse zeigt (Abb. 5.5.1, 5.5.4.a, 5.5.6, 5.5.8, 5.5.11). Der Nachweis eines funktionellen HLA-E-Moleküls über Bindung des löslichen CD94/NKG2A-Rezeptors zeigt in manchen Fällen, daß eine stärkere Stabilisierung von HLA-E auf der Zelloberfläche auch zu einer verstärkten Erkennung durch den Rezeptor führt, wie dies z.B. für G2mD1 und G2mG1 in Abb. 5.5.4.a zu sehen ist. Allerdings geht eine stärkere Stabilisierung von HLA-E auf der Oberfläche nicht zwangsläufig mit einer besseren Erkennung einher, wie z.B. der Vergleich von G3D12 und G3TF5 in Abb. 5.5.4.a zeigt.

Ist die Bereitstellung des Liganden für HLA-E ein Mengenproblem? Ein Vergleich zweier Cw-Transfektanten (5.5.9) bzw. der Transfektanten .221G-Gen mit .221G1m (Abb. 5.3.1) zeigt,

daß die Transfektanten mit niedrigerer Expression von HLA-C- bzw. -G-schwerer Kette deutlich schlechter (HLA-Cw) bzw. gar nicht (Transfektante mit dem HLA-G-Gen) inhibieren (Abb. 5.5.8 und 5.5.9). Merkwürdig ist, daß die .221G-Gen-Transfektante von NKL lysiert wird, da G1m in dieser Transfektante auch über ILT2, das ebenfalls auf NKL exprimiert wird, eine Lyse verhindern sollte (Colonna *et al.* 1997), während die Inhibition der Zellyse durch Cw*0304 nur über HLA-E und CD94/NKG2A vermittelt wird. Dies zeigt sich auch dadurch, daß nach Inkubation mit einem CD94-Ak die Inhibition durch G1m nur unvollständig revertiert wird (Abb. 5.5.12). Offenbar wird auch in der .221G-Gen-Transfektante die kritische Menge an HLA-G-Polypeptid nicht erreicht. Die G3-Transfektante (G3D12) exprimiert deutlich mehr RNA als die G2m- und G4-Transfektante (Abb. 5.5.6b), so daß vermutlich die Bereitstellung des Liganden für HLA-E nur in dieser Transfektante die für die Inhibition kritische Schwelle übersteigt. Darauf weist auch hin, daß die exogene Zugabe von G₃₋₁₁ zu den nicht-inhibierenden Transfektanten zu einer Inhibition der Lyse führt (Abb. 5.5.11). Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß die schwere Kette von HLA-G nur bei starker Biosynthese in der Lage ist, NK-Zellen über HLA-E bzw. CD94/NKG2A zu blockieren. Eine mögliche Erklärung ist, daß der G₃₋₁₁-Signalpeptidligand im Vergleich zu B7₃₋₁₁ und Cw*0304₃₋₁₁ das HLA-E-Molekül weniger gut stabilisiert. Möglicherweise hängt die reduzierte Effizienz auch mit einer weniger effektiven Prozessierung der Signalsequenz von HLA-G im Vergleich mit anderen Klasse-I-Signalsequenzen zusammen. Dies könnte auch bei den verkürzten HLA-G-Polypeptiden eine Rolle spielen. Nach ihrem Eintritt ins ER inserieren Signalsequenzen durch Schleifenbildung in die Membran und können von der Signalpeptidase auf der ER-Seite der Membran geschnitten werden. Das abgeschnittene N-terminale Stück der Signalsequenz gelangt zurück ins Cytosol, wo es von einer, bei Eukaryonten bislang noch nicht beschriebenen, Signalpeptidpeptidase weiter prozessiert wird. Die potentielle Schnittstelle liegt dabei in einer Umgebung hydrophober As (Martoglio und Dobberstein 1998), die, wie Abb. 6.4.2. zeigt, aus fünf hydrophoben As vor und vier nach der Schnittstelle bestehen. Die dritte der vier hinteren As ist bei allen Klasse-I-Molekülen ein Alanin (A), nur bei HLA-G findet sich statt dessen ein Threonin (T). Es könnte möglich sein, daß dieser für HLA-G spezifische Austausch die effiziente Prozessierung der HLA-G-Signalsequenz durch die Signalpeptidpeptidase verhindert und deshalb bei gleichen Mengen an Protein von HLA-G und z.B. Cw*0304 die für HLA-E zur Verfügung stehende Menge an Ligand sich derart unterscheidet, daß sie in den hier verwendeten HLA-G-Transfektanten nur bei G1m und G3 für eine Inhibition der Lyse ausreichend ist.

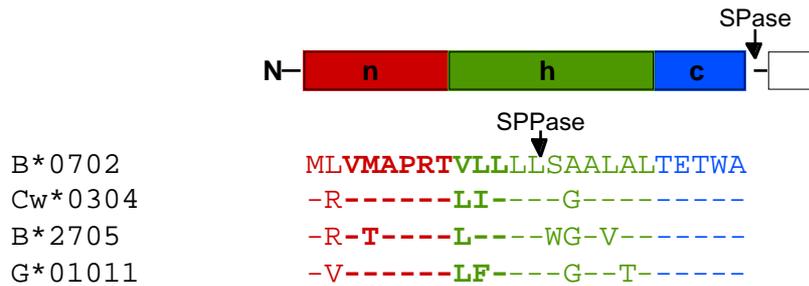


Abb. 6.4.2: Darstellung der in bezug auf die Prozessierung dreiteiligen Struktur der Signalsequenzen für ausgewählte HLA-Klasse-I-Moleküle

Markiert ist rot die hydrophile N-Region (**n-Region**), grün die hydrophobe Kern-Region (**h-Region**), blau die C-terminale flankierende Region (**c-Region**), die Pfeile markieren die Schnittstelle der Signalpeptidase (SPase) und die potentielle Schnittstelle der Signalpeptidase (SPPase) (nach Martoglio und Dobberstein 1998). Die Sequenz des Liganden für HLA-E ist fettgedruckt (As 1-9 des Peptids P₃₋₁₁), HLA-G-spezifische Aminosäuren sind unterstrichen.

Verwendet wurde das Programm SignalP-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>).

Eine direkte Interaktion der verkürzten HLA-G-Polypeptide mit inhibitorischen oder auch aktivierenden Rezeptoren ist demnach aufgrund der fehlenden Oberflächenexpression unwahrscheinlich, und auch die indirekte Interaktion mit solchen Rezeptoren durch Bindung von G₃₋₁₁ an HLA-E ist wenig effektiv. Die Funktion der HLA-G-Isoformen muß also weiter ungeklärt bleiben. Für Volle-Länge-HLA-G1m zeichnet sich ein anderes Bild ab. Es inhibiert nicht nur indirekt die Lyse durch NK-Zellen über CD94/NKG2A durch die Bereitstellung des Liganden für HLA-E, sondern auch direkt durch Interaktion mit dem ILT2-Rezeptor. Des weiteren kann es mit anderen Rezeptoren wie ILT4 oder p49 (KIR2DL4) interagieren, die nicht nur auf NK-Zellen, sondern auch auf einer ganzen Reihe anderer lymphoider Zellen exprimiert werden (Antigen-präsentierenden Zellen, APC, cytotoxischen T-Zellen, CTL und B-Zellen, BL). So kann es nicht nur den Schutz vor der Lyse durch NK-Zellen vermitteln, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Modulation der Immunantwort spielen, v.a. in inflammatorischen Prozessen, worauf die Hochregulation durch IFN γ und IL10 hinweist. Ein schematischer Überblick über diese vielfältigen Aufgaben von HLA-G1m ist in Abb. 6.4.3 gezeigt.

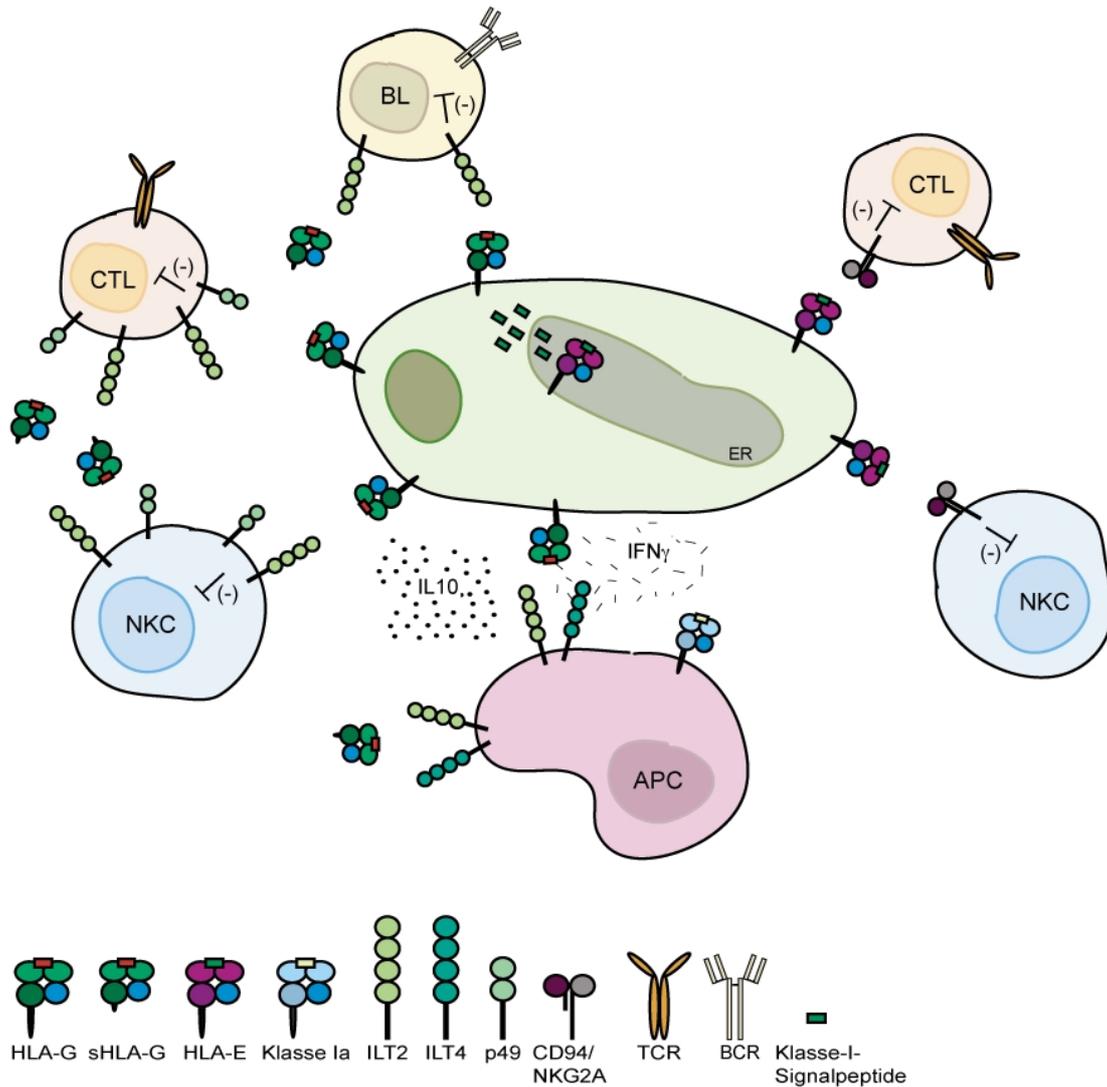


Abb. 6.4.3: Schematische Darstellung der mutmaßlichen immunregulatorischen Aufgaben von HLA-G

HLA-G1m kann auf indirektem Weg über HLA-E oder direkt seine immunregulatorischen Aufgaben erfüllen. Die Oberflächenexpression von HLA-E ist abhängig von der Verfügbarkeit des Peptidliganden, dem Nonamer P₃₋₁₁ aus der Signalsequenz von Klasse-Ia-Molekülen oder HLA-G. Funktionelles HLA-E auf der Zelloberfläche kann dann mit dem konstitutiv auf NK-Zellen exprimierten Rezeptorkomplex CD94/NKG2A interagieren und so Zellen vor der NK-Lyse schützen. Möglicherweise kann HLA-G nach Bindung von Peptiden auch direkt mit dem T-Zellrezeptor interagieren. Der direkte Weg beinhaltet die Bindung von HLA-G1m an Rezeptoren auf NK-Zellen (NKC: ILT2, p49), einer Subpopulation von cytotoxischen T-Zellen (CTL: ILT2, p49), B-Lymphozyten (BL: ILT2) und antigenpräsentierenden Zellen (APC: ILT2, ILT4). IL10 und IFN γ führen zur Induktion bzw. Hochregulation der HLA-G1m-Oberflächenexpression. Ob lösliches G1 (sHLA-G) diese Funktionen ebenfalls erfüllen kann, ist bislang nicht geklärt.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Im Unterschied zu den HLA-Klasse-Ia-Molekülen ist das nicht-polymorphe Klasse-Ib-Molekül HLA-G v.a. in der Plazenta exprimiert. Es wird postuliert, daß HLA-G die Immuntoleranz des mütterlichen Immunsystems gegen den „semiallogenen“ Fetus mitreguliert. In allen anderen Zellen und Geweben, in denen es gefunden wurde, ist die Menge im Vergleich zu klassischen Klasse-I-Molekülen um Größenordnungen geringer. Auch in der Genexpression unterscheidet sich HLA-G drastisch von allen übrigen Klasse-I-Molekülen. Am auffallendsten ist dabei das Auftreten verschiedener alternativer Spleißformen. Neben dem Volle-Länge-Transkript G1m gibt es eine Reihe verkürzter Isoformen: G2 (G2m, $\Delta\alpha 2$ -Domäne), G3 ($\Delta\alpha 2/\Delta\alpha 3$ -Domäne), G4 ($\Delta\alpha 3$ -Domäne) sowie zwei Formen, die für lösliche Proteine kodieren, da die nicht-entfernte Intron-4-Sequenz zu einem vorzeitigen Translationsstopp führt, G5 (G1s), G6 (G2s, $\Delta\alpha 2$ -Domäne, + In4).

Die schwache Expression von HLA-G bestätigte sich auch für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Haut- und Muskelbiopsien sowie Gehirnproben. Transkripte für HLA-G und die verkürzten Isoformen waren in fast allen Proben nachweisbar, wobei das Volle-Länge-Transkript die dominante Form war. Bei den nach Krankheitsgruppen eingeteilten Hautbiopsien und den Muskelbiopsien mit definierten Diagnosen konnte keine Korrelation eines bestimmten Expressionsmusters mit einer bestimmten Krankheitsgruppe bzw. Diagnose festgestellt werden. Diese Heterogenität des Expressionsmusters sowie die selektive Hochregulation der Volle-Länge-Isoform G1m auf Transkriptions- und Proteinebene in Glioblastomzelllinien und Myoblasten, die nur eine äußerst schwache konstitutive Expression von HLA-G aufweisen, nach Behandlung mit $\text{IFN}\gamma$ deutet auf eine differentielle Regulation hin.

Um die einzelnen Isoformen getrennt voneinander untersuchen zu können, wurden Transfektanten für jede Form in der Klasse-I-negativen B-Zelllinie 721.221 etabliert. Nur die Volle-Länge-Isoform G1m sowie deren lösliche Variante G1s konnten auf der Zelloberfläche bzw. im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Von den übrigen Isoformen konnten nur EndoH-sensitive Polypeptide gefunden werden, und auch Immunofluoreszenzfärbung mit einer Reihe von Klasse-I-Ak zeigte keine Zelloberflächenexpression. Es muß daraus geschlossen werden, daß die verkürzten Isoformen in der Zelle zurückgehalten werden.

HLA-G kann auf zwei Wegen die Aktivität von Immuneffektorzellen regulieren: direkt über ILT2 und indirekt über HLA-E. Das MHC-Klasse-I-Molekül HLA-E wird durch Bindung eines Nonamers (P_{3-11}) aus dem Signalpeptid verschiedener Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche von Zellen stabilisiert. Aus der Interaktion dieses funktionellen HLA-E/Peptid-Komplexes mit dem inhibitorischen Rezeptorkomplex CD94/NKG2A auf NK-Zellen resultiert ein Schutz dieser Zellen vor der NK-Lyse. Auch das entsprechende Peptid aus der Signalsequenz von HLA-G ist

ein Ligand für HLA-E. Allerdings wurde gezeigt, daß die Stabilisierung von HLA-E auf der Zelloberfläche durch das Peptid G₃₋₁₁ schwächer als mit anderen Klasse-I-Peptiden und auch weniger stabil ist. Effektive Inhibition der Lyse der NK-Zelllinie NKL über diese Interaktion von HLA-E mit CD94/NKG2A findet man nur bei HLA-G1m-Transfektanten. Diese werden auch durch die direkte Interaktion von HLA-G1m mit einem weiteren inhibitorischen Rezeptor auf NKL - ILT2 - geschützt. In den 721.221-Transfektanten der verkürzten HLA-G-Isoformen war eine unphysiologisch hohe Konzentrationen an HLA-G-Polypeptid notwendig, um die kritische Menge an HLA-E-Ligand für den Schutz dieser Zellen vor der Lyse durch NK-Zellen liefern zu können. Das war nur für eine äußerst stark exprimierende G3-Transfektante der Fall. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in einer ineffizienteren Prozessierung des Signalpeptids von HLA-G und einer im Vergleich mit anderen HLA-E-Liganden geringeren Bindungsaffinität des Peptids G₃₋₁₁ für HLA-E.

Eine Funktion der verkürzten HLA-G-Isoformen durch die direkte Interaktion mit Rezeptoren auf NK-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden und ist wegen ihrer intrazellulären Expression auch unwahrscheinlich. Vielmehr deuten erste Daten, die zeigen, daß die Isoformen, direkt oder indirekt, mit dem TAP-Komplex assoziiert sind, auf eine mögliche Funktion im Rahmen der Antigenpräsentation hin. Worin diese besteht, müssen weiterführende Untersuchungen zeigen. Daher ist anzunehmen, daß HLA-G *in vivo* hauptsächlich über HLA-G-bindende KIR immunregulatorische Funktionen wahrnimmt und durch indirekte Wirkung über HLA-E-CD94/NKG2A modulierend eingreift.

8 LITERATUR

- Agrawal, S., J. Marquet, G.J. Freeman, A. Tawab, P.L. Bouteiller, P. Roth, W. Bolton, G. Ogg, L. Boumsell, and A. Bensussan. 1999. 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., N. Tanahashi, K. Akiyama, H. Hisamatsu, C. Noda, K. Tanaka, C.H. Chung, N. Shibmara, P.J. Willy, J.D. Mott, and et al. 1995. Primary structures of two homologous subunits of PA28, a γ -interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Lett* **366**: 37-42.
- Alizadeh, M., C. Legras, G. Semana, P. Le Bouteiller, B. Genetet, and R. Fauchet. 1993. Evidence for a polymorphism of HLA-G gene. *Hum Immunol* **38**: 206-212.
- Allen, R.L., C.A. O'Callaghan, A.J. McMichael, and P. Bowness. 1999. Cutting edge: HLA-B27 can form a novel β 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J Immunol* **162**: 5045-5048.
- Amiot, L., M. Onno, B. Drenou, B. le Marchand, T. Lamy, G. Semana, and R. Fauchet. 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., M. Onno, I. Renard, B. Drenou, T. Guillaudeux, P. Le Bouteiller, and R. Fauchet. 1996. HLA-G transcription studies during the different stages of normal and malignant hematopoiesis. *Tissue Antigens* **48**: 609-614.
- Amiot, L., M. Onno, B. Drenou, C. Monvoisin, and R. Fauchet. 1998. HLA-G class I gene expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Hum Immunol* **59**: 524-528.
- Androlewicz, M.J., K.S. Anderson, and P. Cresswell. 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., B. Ortmann, P.M. van Endert, T. Spies, and P. Cresswell. 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.
- Androlewicz, M.J., and P. Cresswell. 1994. Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity* **1**: 7-14.
- Anegon, I., M.C. Cuturi, G. Trinchieri, and B. Perussia. 1988. Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J Exp Med* **167**: 452-472.
- Anumanthan, A., A. Bensussan, L. Boumsell, A.D. Christ, R.S. Blumberg, S.D. Voss, A.T. Patel, M.J. Robertson, L.M. Nadler, and G.J. Freeman. 1998. Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* **161**: 2780-2790.
- Aramburu, J., M.A. Balboa, M. Izquierdo, and M. Lopez-Botet. 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.
- Belich, M.P., R.J. Glynn, G. Senger, D. Sheer, and J. Trowsdale. 1994. Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr Biol* **4**: 769-776.
- Bensussan, A., I.G. Mansur, V. Mallet, A.M. Rodriguez, M. Girr, E.H. Weiss, G. Brem, L. Boumsell, E. Gluckman, J. Dausset, and 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., M. Flaco, A. Cambiaggi, P. Costa, S. Verdiani, D. Pende, R. Conte, C. Di Donato, P. Parham, and L. Moretto. 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., C. Cantoni, M. Falco, S. Verdiani, C. Bottino, M. Vitale, R. Conte, A. Poggi, A. Moretta, and L. Moretta. 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.

- Binstadt, B.A., K.M. Brumbaugh, C.J. Dick, A.M. Scharenberg, B.L. Williams, M. Colonna, L.L. Lanier, J.P. Kinet, R.T. Abraham, and P.J. Leibson. 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.
- Blaschitz, A., F. Lenfant, V. Mallet, M. Hartmann, A. Bensussan, D.E. Geraghty, P. Le Bouteiller, and G. Dohr. 1997. Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. *Eur J Immunol* **27**: 3380-3388.
- Bodmer, J.G., S.G. Marsh, E.D. Albert, W.F. Bodmer, R.E. Bontrop, B. Dupont, H.A. Erlich, J.A. Hansen, B. Mach, W.R. Mayr, P. Parham, E.W. Petersdorf, T. Sasazuki, G.M. Schreuder, J.L. Strominger, A. Svejgaard, and P.I. Terasaki. 1999. Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. *Tissue Antigens* **53**: 407-446.
- Borges, L., M.L. Hsu, N. Fanger, M. Kubin, and D. Cosman. 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., M. Ulbrecht, E.H. Weiss, J.E. Coligan, and A.G. Brooks. 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.
- Boyson, J.E., K.K. Iwanaga, T.G. Golos, and D.I. Watkins. 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.
- 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., E.Y. Jones, and A. McMichael. 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., D.S. Allan, D. Wilson, and A.J. McMichael. 1997. TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol* **8**: 1-10.
- Braud, V.M., D.S. Allan, C.A. O'Callaghan, K. Söderström, A. D'Andrea, G.S. Ogg, S. Lazetic, N.T. Young, J.I. Bell, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and A.J. McMichael. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **391**: 795-799.
- Brodsky, F.M., L. Lem, and P.A. Bresnahan. 1996. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens* **47**: 464-471.
- Brooks, A.G., P.E. Posch, C.J. Scorzelli, F. Borrego, and J.E. Coligan. 1997. NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. *J Exp Med* **185**: 795-800.
- Brooks, A.G., F. Borrego, P.E. Posch, A. Patamawenu, C.J. Scorzelli, M. Ulbrecht, E.H. Weiss, and J.E. Coligan. 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.
- Burt, D., D. Johnston, T. Rinke de Wit, P. Van den Elsen, and P.L. Stern. 1991. Cellular immune recognition of HLA-G-expressing choriocarcinoma cell line Jeg-3. *Int J Cancer Suppl* **6**: 117-122.
- Bushkin, Y., D.N. Posnett, B. Pernis, and C.Y. Wang. 1986. A new HLA-linked T cell membrane molecule, related to the beta chain of the clonotypic receptor, is associated with T3. *J Exp Med* **164**: 458-473.
- Cambiaggi, A., E. Vivier, and L. Olcese. 1997. Inhibitory and activatory receptors for MHC class I molecules. *Res Immunol* **148**: 172-179.
- Cantoni, C., R. Biassoni, D. Pende, S. Sivori, L. Accame, L. Pareti, G. Semenzato, L. Moretta, A. Moretta, and C. Bottino. 1998. 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.
- Cantoni, C., S. Verdiani, M. Falco, A. Pessino, M. Cilli, R. Conte, D. Pende, M. Ponte, M.S. Mikaelsson, L. Moretta, and R. Biassoni. 1998. p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur J Immunol* **28**: 1980-1990.
- Carreno, B.M., K.L. Schreiber, D.J. McKean, I. Stroynowski, and T.H. Hansen. 1995. Aglycosylated and phosphatidylinositol-anchored MHC class I molecule are associated with calnexin. *J Immunol* **154**: 5173-5180.
- Carretero, M., C. Cantoni, T. Bellon, C. Bottino, R. Biassoni, A. Rodriguez, J.J. Perez-Villar, L. Moretta, A. Moretta, and M. Lopez-Botet. 1997. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol* **27**: 563-567.

- Carson, W.E., T.A. Fehninger, and M.A. Caligiuri. 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., T. Gil, F. Rodriguez, J. Molina, F. Samaniego, F. Vergara, and A.J. Herruzo. 1993. Lack of expression of HLA antigens on immature germ cells from ejaculates with antisperm antibodies. *Am J Reprod Immunol* **30**: 9-14.
- Cella, M., A. Longo, G.B. Ferrara, J.L. Strominger, and M. Colonna. 1994. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucin 80. *J Exp Med* **180**: 1235-1242.
- Cella, M., C. Döhning, J. Samaridis, M. Dessing, M. Brockhaus, A. Lanzavecchia, and M. Colonna. 1997. A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *J Exp Med* **185**: 1743-1751.
- Chamberlain, J.W., H.A. Vasavada, S. Ganguly, and S.M. Weissman. 1991. Identification of cis sequences controlling efficient position-independent tissue-specific expression of human major histocompatibility complex class I genes in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **11**: 3564-3572.
- Chapman, T.L., A.P. Heikeman, and P.J. Bjorkman. 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.
- Chiang, M.H., and E.K. Main. 1994. Nuclear regulation of HLA class I genes in human trophoblasts. *Am J Reprod Immunol* **32**: 167-172.
- Chiang, M.H., N. Steuerwald, H. Lambert, E.K. Main, and A. Steinleitner. 1994. Detection of human leukocyte antigen class I messenger ribonucleic acid transcripts in human spermatozoa via reverse transcription-polymerase chain reaction. *Fertility and Sterility* **61**: 270-280.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 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., J. Gao, W.J. Murphy, and J.S. Hunt. 1999. A candidate interferon- γ activated site (GAS element) in the HLA-G promoter does not bind nuclear proteins. *Hum Immunol* **60**: 1113-1118.
- Chu, W., Y. Yang, D.E. Geraghty, and J.S. Hunt. 1999. Interferons enhance HLA-G mRNA and protein in transfected mouse fibroblasts. *J Reprod Immunol* **42**: 1-15.
- Chumbley, G., A. King, K. Robertson, N. Holmes, and Y.W. Loke. 1994. Resistance of HLA-G and HLA-A2 transfectants to lysis by decidual NK cells. *Cell Immunol* **155**: 312-322.
- Colbern, G.T., M.H. Chiang, and E.K. Main. 1994. Expression of the nonclassical histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta. *Am J Obstet Gynecol* **170**: 1244-1250.
- Collins, E.J., D.N. Garboczi, M.N. Karpusas, and D.C. Wiley. 1995. The three-dimensional structure of a class I major histocompatibility complex molecule missing the $\alpha 3$ domain of the heavy chain. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1218-1221.
- Colonna, M., E.G. Brooks, M. Falco, G.B. Ferrara, and J.L. Strominger. 1993. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science* **260**: 1121-1124.
- Colonna, M., and J. Samaridis. 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. Immunoglobulin superfamily inhibitory receptors: from natural killer cells to antigen-presenting cells. *Res Immunol* **148**: 169-171.
- Colonna, M., F. Navarro, T. Bellon, M. Llano, P. Garcia, J. Samaridis, L. Angman, M. Cella, and M. López-Bolet. 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. 1998. Unmasking the killer's accomplice. *Nature* **391**: 642-643.
- Colonna, M., J. Samaridis, M. Cella, L. Angman, R.L. Allen, C.A. O'Callaghan, R. Dunbar, G.S. Ogg, V. Cerundolo, and A. Rolink. 1998. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol* **160**: 3096-3100.
- Cosman, D., N. Fanger, L. Borges, M. Kubin, W. Chin, L. Peterson, and M.L. Hsu. 1997. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* **7**: 273-282.

- Crisa, L., M.T. McMaster, J.K. Ishii, S.J. Fisher, and D.R. Salomon. 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.
- Cuturi, M.C., I. Anegon, F. Sherman, R. Loudon, S.C. Clark, B. Perussia, and G. Trinchieri. 1989. Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J Exp Med* **169**: 569-583.
- D'Andrea, A., C. Chang, K. Franz-Bacon, T. McClanahan, J.H. Phillips, and L.L. Lanier. 1995. Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes. *J Immunol* **155**: 2306-2310.
- D'Andrea, A., C. Chang, J.H. Phillips, and L.L. Lanier. 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.
- Daniel, S., S. Caillat-Zucman, J. Hammer, J.F. Bach, and P.M. van Endert. 1997. Absence of functional relevance of human transporter associated with antigen processing polymorphism for peptide selection. *J Immunol* **159**: 2350-2357.
- Davis, D.M., H.T. Reyburn, L. Pazmany, I. Chiu, O. Mandelboim, and J.L. Strominger. 1997. Impaired spontaneous endocytosis of HLA-G. *Eur J Immunol* **27**: 2714-2719.
- DeMars, R., C.C. Chang, and R.A. Rudersdorf. 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.
- DeMars, R., C.C. Chang, S. Shaw, P.J. Reitnauer, and P.M. Sondel. 1984. Homozygous deletions that simultaneously eliminate expressions of class I and class II antigens of EBV-transformed B-lymphoblastoid cells. I. Reduced proliferative responses of autologous and allogeneic T cells to mutant cells that have decreased expression of class II antigens. *Hum Immunol* **11**: 77-97.
- Deniz, G., S.E. Christmas, R. Brew, and P.M. Johnson. 1994. Phenotypic and functional cellular differences between human CD3-decidual and peripheral blood leukocytes. *J Immunol* **152**: 4255-4261.
- Diehl, M., C. Münz, W. Keilholz, S. Stevanovic, N. Holmes, Y.W. Loke, and H.G. Rammensee. 1996. Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters. *Curr Biol* **6**: 305-314.
- Döhring, C., D. Scheidegger, J. Samaridis, M. Cella, and M. Colonna. 1996. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol* **156**: 3098-3101.
- Dorling, A., N.J. Monk, and R.I. Lechler. 2000. HLA-G inhibits the transendothelial migration of human NK cells. *Eur J Immunol* **30**: 586-593.
- Ellis, S.A., M.S. Palmer, and A.J. McMichael. 1990. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. *J Immunol* **144**: 731-735.
- Emslie-Smith, A.M., K. Arahata, and A.G. Engel. 1989. Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies. *Hum Pathol* **20**: 224-231.
- Engler-Blum, G., M. Meier, J. Frank, and G.A. Muller. 1993. Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal Biochem* **210**: 235-244.
- Epstein, H., R. Hardy, J.S. May, M.H. Johnson, and N. Holmes. 1989. Expression and function of HLA-A2.1 in transgenic mice. *Eur J Immunol* **19**: 1575-1583.
- Fanger, N.A., D. Cosman, L. Peterson, S.C. Braddy, C.R. Maliszewski, and L. Borges. 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.
- Farabaugh, P.J. 1978. Sequence of the lacl gene. *Nature* **274**: 765-769.
- Frumento, G., S. Franchello, E. Geraghty, and G.B. Ferrara. 1999. Analysis of HLA-G expression in tumor cell lines. *Transplant Proc* **31**: 1847-1848.
- Fry, A.M., L.L. Lanier, and A. Weiss. 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., A. Ishitani, and D.E. Geraghty. 1994. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol* **153**: 5516-5524.
- Geraghty, D.E., B.H. Koller, and H.T. Orr. 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., M. Stockschleider, A. Ishitani, and J.A. Hansen. 1992. Polymorphism at the HLA-E locus predates most HLA-A and -B polymorphism. *Hum Immunol* **33**: 174-184.
- Goldman-Wohl, D.S., I. Ariel, C. Greenfield, D. Hochner-Celnikier, J. Cross, S. Fisher, and S. Yagel. 2000. Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* **6**: 88-95.
- Gottesman, S., E. Halpern, and P. Trisler. 1981. Role of sulA and sulB in filamentation by lon mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **148**: 265-273.
- Guilbert, L., S.A. Robertson, and T.G. Wegmann. 1993. The trophoblast as an integral component of a macrophage-cytokine network. *Immunol Cell Biol* **71**: 49-57.
- Gumperz, J.E., N.M. Valiante, P. Parham, L.L. Lanier, and D. Tyan. 1996. Heterogenous 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.
- Gur, H., F. el-Zaatar, T.D. Geppert, M.C. Wacholtz, J.D. Taurog, and P.E. Lipsky. 1990. Analysis of T cell signaling by class I MHC molecules: the cytoplasmic domain is not required for signal transduction. *J Exp Med* **172**: 1267-1270.
- Hamai, Y., T. Fujii, T. Yamashita, A. Miki, H. Hyodo, S. Kozuma, D.E. Geraghty, and Y. Taketani. 1999. The expression of human leukocyte antigen-G on trophoblasts abolishes the growth-suppressing effect of interleukin-2 towards them. *Am J Reprod Immunol* **41**: 153-158.
- Hara, N., T. Fujii, T. Yamashita, S. Kozuma, T. Okai, and Y. Taketani. 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.
- Harris, M.R., Y.Y. Yu, C.S. Kindle, T.H. Hansen, and J.C. Solheim. 1998. Calreticulin and calnexin interact with different protein and glycan determinants during the assembly of MHC class I. *J Immunol* **160**: 5404-5409.
- Hashimoto, K., C. Azuma, M. Koyama, T. Nobunaga, T. Kimura, K. Shimoya, Y. Kubota, F. Saji, and Y. Murata. 1997. Biparental alleles of HLA-G are co-dominantly expressed in the placenta. *Jpn J Hum Genet* **42**: 181-186.
- Hercend, T., J.D. Griffin, A. Bensussan, R.E. Schmidt, M.A. Edson, A. Brennan, C. Murray, J.F. Daley, S.F. Schlossman, and J. Ritz. 1985. Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J Clin Invest* **75**: 932-943.
- Hohlfeld, R., and A.G. Engel. 1994. The immunobiology of muscle. *Immunol Today* **15**: 269-274.
- Hölscher, G. 1998. Regulation der HLA-G-Expression durch IFN γ in der humanen Zelllinie U-937. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie am Institut für Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Horwitz, D.A., J.D. Gray, K. Ohtsuka, M. Hirokawa, and T. Takahashi. 1997. The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF- β and implications for autoimmunity. *Immunol Today* **18**: 538-542.
- Houchins, J.P., L.L. Lanier, E.C. Niemi, J.H. Phillips, and J.C. Ryan. 1997. Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J Immunol* **158**: 3603-3609.
- Houlihan, J.M., P.A. Biro, A. Fergar-Payne, K.L. Simpson, and C.H. Holmes. 1992. Evidence for the expression of non-HLA-A,-B,-C class I genes in the human fetal liver. *J Immunol* **149**: 668-675.
- Hughes, E.A., and P. Cresswell. 1998. The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr Biol* **8**: 709-712.
- Hunt, J.S. 1992. Immunobiology of pregnancy. *Curr Op Immunol* **4**: 591-596.
- Hunt, J.S., and H.T. Orr. 1992. HLA and maternal-fetal recognition. *Faseb J* **6**: 2344-2348.
- Hviid, T.V., C. Möller, S. Sorensen, and N. Morling. 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.
- Ishitani, A., and D.E. Geraghty. 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.
- Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport, and J.D. Capra. 1998. Immunology. Churchill Livingstone.

- Jefferies, W.A., and G.G. MacPherson. 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.
- Karpati, G., Y. Pouliot, and S. Carpenter. 1988. Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. *Ann Neurol* **23**: 64-72.
- King, A., N. Balendran, P. Wooding, N.P. Carter, and Y.W. Loke. 1991. CD3⁻ leukocytes present in the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization of the CD56⁺⁺ population. *Dev Immunol* **1**: 169-190.
- King, A., and Y.W. Loke. 1991. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol Today* **12**: 432-435.
- King, A., T. Burrows, and Y.W. Loke. 1996. Human uterine natural killer cells. *Nat Immun* **15**: 41-52.
- Kirszenbaum, M., P. Moreau, E. Gluckman, J. Dausset, and E. Carosella. 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.
- Koller, B.H., D.E. Geraghty, R. DeMars, L. Duvick, S.S. Rich, and H.T. Orr. 1989. Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family. *J Exp Med* **169**: 469-480.
- Korber, B., L. Hood, and I. Stroynowski. 1987. Regulation of murine class I genes by interferons is controlled by regions located both 5' and 3' to the transcription initiation site. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 3380-3384.
- Kovats, S., E.K. Main, C. Librach, M. Stubblebine, S.J. Fisher, and R. DeMars. 1990. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* **248**: 220-223.
- Kozany, C. 1998. Regulation der Expression von HLA-G in Keratinozyten und Synthese einer löslichen HLA-G G3-Isoform. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie am Institut für Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Kuby, J. 1997. Immunology. Third Edition ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lampson, L.A. 1995. Interpreting MHC class I expression and class I/class II reciprocity in the CNS: reconciling divergent findings. *Microscopy Research and Technique* **32**: 267-285.
- Lanier, L.L., A.M. Le, C.I. Civin, M.R. Loken, and J.H. Phillips. 1986. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* **136**: 4480-4486.
- Lanier, L.L. 1997. Natural killer cell receptors and MHC class I interactions. *Current opinion in immunology* **9**: 126-131.
- Lanier, L.L., B. Corliss, J. Wu, and J.H. Phillips. 1998. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* **8**: 693-701.
- Lanier, L.L., B.C. Corliss, J. Wu, C. Leong, and J.H. Phillips. 1998. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* **391**: 703-707.
- Lanier, L.L., J.H. Phillips, J. Hackett, Jr., M. Tutt, and V. Kumar. 1986. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* **137**: 2735-2739.
- Lanier, L.L., J.J. Ruitenbergh, and J.H. Phillips. 1988. Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J Immunol* **141**: 3478-3485.
- Lazetic, S., C. Chang, J.P. Houchins, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 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., L.D. Bogarad, M.R. Roberts, J.A. Barbosa, and F.H. Ruddle. 1990. Binding of nuclear factors to the 5'-interferon consensus sequence of the HLA-A2 class I gene. *Exp Cell Res* **186**: 203-209.
- Le Bouteiller, P., T. Guillaudeux, M. Girr, C. Demeur, and A.-M. Rodriguez. 1993. Molecular regulatory mechanisms that repress classical HLA class I gene expression in human placenta. In *Immunobiology of Reproduction*. J.S. Hunt, editor. Serono Symposia, USA, Norwell, Massachusetts.
- Le Bouteiller, P., and F. Lenfant. 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 Bouteiller, P., and V. Mallet. 1997. HLA-G and Pregnancy. *Rev Reprod* **2**: 7-13.

- Le Bouteiller, P. 1994. HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol* **14**: 89-129.
- Le Bouteiller, P. 2000. HLA-G in the human placenta: expression and potential functions. *Biochem Soc Trans* **28**: 208-212.
- Lee, N., A.R. Malacko, A. Ishitani, M.C. Chen, J. Bajorath, H. Marquardt, and D.E. Geraghty. 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., D.R. Goodlett, A. Ishitani, H. Marquardt, and D.E. Geraghty. 1998. HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J Immunol* **160**: 4951-4960.
- Lee, N., M. Llano, M. Carretero, A. Ishitani, F. Navarro, M. López-Botet, and D.E. Geraghty. 1998. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5199-5204.
- Lefebvre, S., P. Moreau, V. Guiard, E.C. Ibrahim, F. Adrian-Cabestre, C. Menier, J. Dausset, E.D. Carosella, and P. Paul. 1999. Molecular mechanisms controlling constitutive and IFN- γ -inducible HLA-G expression in various cell types. *J Reprod Immunol* **43**: 213-224.
- Leibson, P.J. 1997. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* **6**: 655-661.
- Litwin, V., J. Gumperz, P. Parham, J.H. Phillips, and L.L. Lanier. 1994. NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med* **180**: 537-543.
- Ljunggren, H.G., and K. Kärre. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* **11**: 237-244.
- Loke, Y.W., and A. King. 1991. Recent developments in the human maternal-fetal immune reaction. *Curr Opin Immunol* **3**: 762-766.
- Long, E.O. 1998. Signal sequences stop killer cells. *Nature* **391**: 740-743.
- Maejima, M., T. Fujii, S. Kozuma, T. Okai, Y. Shibata, and Y. Taketani. 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., D.E. Geraghty, E.H. Weiss. 1999. "Expression and regulation of HLA-G in human glioma cell lines." *Transplant Proc* **31**: 1849-53.
- Maier, S., M. Grzeschik, E.H. Weiss, and M. Ulbrecht. 2000. Implications of HLA-E allele expression and different HLA-E ligand diversity for the regulation of NK cells. *Hum Immunol* im Druck.
- Malik, P., E. Baba, and J.L. Strominger. 1999. Biotinylation of class I MHC molecules abrogates recognition by W6/32 antibody. *Tissue Antigens* **53**: 576-579.
- Malnati, M.S., M. Peruzzi, K.C. Parker, W.E. Biddison, E. Ciccone, A. Moretta, and E.O. Long. 1995. Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science* **267**: 1016-1018.
- Mandelboim, O., S.B. Wilson, M. Valés-Goméz, H.T. Reyburn, and J.L. Strominger. 1997. Self and viral peptides can initiate lysis by autologous natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4604-4609.
- Martoglio, B., and B. Dobberstein. 1998. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* **8**: 410-415.
- Massa, P.T. 1993. Specific suppression of major histocompatibility complex class I and class II genes in astrocytes by brain-enriched gangliosides. *J Exp Med* **178**: 1357-1363.
- Maziarz, R.T., J. Fraser, J.L. Strominger, and S.J. Burakoff. 1986. The human HLA-specific monoclonal antibody W6/32 recognizes a discontinuous epitope within the $\alpha 2$ domain of murine H-2Db. *Immunogenetics* **24**: 206-208.
- McMaster, M.T., C.L. Librach, Y. Zhou, K.H. Lim, M.J. Janatpour, R. DeMars, S. Kovats, C. Damsky, and S.J. Fisher. 1995. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol* **154**: 3771-3778.
- McMaster, M., Y. Zhou, S. Shorter, K. Kapasi, D. Geraghty, K.H. Lim, and S. Fisher. 1998. HLA-G isoforms produced by placental cytotrophoblasts and found in amniotic fluid are due to unusual glycosylation. *J Immunol* **160**: 5922-5928.

- Meyer, T.H., P.M. van Endert, S. Uebel, B. Ehring, and R. Tampe. 1994. Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells. *FEBS Lett* **351**: 443-447.
- Mingari, M.C., C. Vitale, A. Cambiaggi, F. Schiavetti, G. Melioli, S. Ferrini, and A. Poggi. 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., M. Ponte, C. Vitale, F. Schiavetti, R. Bellomo, S. Bertone, and L. Nanni. 1997. HLA class-I-specific inhibitory receptor in human T lymphocytes: interference with T-cell functions. *Res Immunol* **148**: 150-155.
- Mingari, M.C., M. Ponte, S. Bertone, F. Schiavetti, C. Vitale, R. Bellomo, A. Moretta, and L. Moretta. 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.
- Moreau, P., E. Carosella, M. Teyssier, S. Prost, E. Gluckman, J. Dausset, and M. Kirszenbaum. 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., P. Paul, L. Gourand, S. Prost, J. Dausset, E. Carosella, and M. Kirszenbaum. 1997. HLA-G gene transcriptional regulation in trophoblasts and blood cells: differential binding of nuclear factors to a regulatory element located 1.1 kb from exon 1. *Hum Immunol* **52**: 41-46.
- Moreau, P., P. Paul, N. Rouas-Freiss, M. Kirszenbaum, J. Dausset, and E.D. Carosella. 1998. Molecular and immunologic aspects of the nonclassical HLA class I antigen HLA-G: evidence for an important role in the maternal tolerance of the fetal allograft. *Am J Reprod Immunol* **40**: 136-144.
- Moretta, A., M. Vitale, C. Bottino, A.M. Orengo, L. Morelli, R. Augugliaro, M. Barbaresi, E. Ciccone, and L. Moretta. 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., S. Sivori, M. Vitale, D. Pende, L. Morelli, R. Augugliaro, C. Bottino, and L. Moretta. 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.
- Moretta, A., S. Parolini, R. Castriconi, C. Bottino, M. Vitale, S. Sivori, and R. Millo. 1997. Function and specificity of human natural killer cell receptors. *Eur J Immunogenet* **24**: 455-468.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* **24**: 17-27.
- Münz, C., N. Holmes, A. King, Y.W. Loke, M. Colonna, H. Schild, and H.G. Rammensee. 1997. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells. *J Exp Med* **185**: 385-391.
- Nagler, A., L.L. Lanier, S. Cwirla, and J.H. Phillips. 1989. Comparative studies of human FcR111-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* **143**: 3183-3191.
- Nakajima, H., J. Samaridis, L. Angman, and M. Colonna. 1999. Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor γ -chain. *J Immunol* **162**: 5-8.
- Nandi, D., H. Jiang, and J.J. Monaco. 1996. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN- γ -inducible proteasome subunit. *J Immunol* **156**: 2361-2364.
- Navarro, F., M. Llano, T. Bellon, M. Colonna, D.E. Geraghty, and M. Lopez-Botet. 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.
- Navarro, F., M. Llano, P. Garcia, and M. Lopez-Botet. 1999. NK cell mediated recognition of HLA class Ib molecules: role of CD94/NKG2 receptors. *J Reprod Immunol* **43**: 167-173.
- Neefjes, J.J., F. Momburg, and G.J. Hammerling. 1993. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC- encoded transporter. *Science* **261**: 769-771.
- Neefjes, J., E. Gottfried, J. Roelse, M. Grommé, R. Obst, G.J. Hämmerling, and F. Momburg. 1995. Analysis of the fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters. *Eur J Immunol* **25**: 1133-1136.

- Niedermann, G., S. Butz, H.G. Ihlenfeldt, R. Grimm, M. Lucchiari, H. Hoschutzky, G. Jung, B. Maier, and K. Eichmann. 1995. Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity* **2**: 289-299.
- Ober, C., B. Rosinsky, C. Grimsley, K. van der Ven, A. Robertson, and A. Runge. 1996. Population genetic studies of HLA-G: allele frequencies and linkage disequilibrium with HLA-A1. *J Reprod Immunol* **32**: 111-123.
- Ohashi, K., F. Saji, M. Kato, A. Wakimoto, and O. Tanizawa. 1990. HLA expression on human ejaculated sperm. *Am J Reprod Immunol* **23**: 29-32.
- Ohlsson, R., E. Larsson, O. Nilsson, T. Wahlstrom, and P. Sundstrom. 1989. Blastocyst implantation precedes induction of insulin-like growth factor II gene expression in human trophoblasts. *Development* **106**: 555-559.
- Onno, M., T. Guillaudeux, L. Amiot, I. Renard, B. Drenou, B. Hirel, M. Girr, G. Semana, P. Le Bouteiller, and R. Fauchet. 1994. The HLA-G gene is expressed at a low mRNA level in different human cells and tissues. *Hum Immunol* **41**: 79-86.
- O'Callaghan, C.A., J. Tormo, B.E. Willcox, V.M. Braud, B.K. Jakobsen, D.I. Stuart, A.J. McMichael, J.I. Bell, and E.Y. Jones. 1998. Structural features impose tight peptide binding specificity in the nonclassical MHC molecule HLA-E. *Molecular Cell* **1**: 531-541.
- Pangault, C., L. Amiot, S. Caulet-Maugendre, F. Brasseur, F. Burtin, V. Guilloux, B. Drenou, R. Fauchet, and M. Onno. 1999. HLA-G protein expression is not induced during malignant transformation. *Tissue Antigens* **53**: 335-346.
- Parham, P., C.E. Lomen, D.A. Lawlor, J.P. Ways, N. Holmes, H.L. Coppin, R.D. Salter, A.M. Wan, and P.D. Ennis. 1988. Nature of polymorphism in HLA-A, -B, and -C molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 4005-4009.
- Paul, P., N. Rouas-Freiss, I. Khalil-Daher, P. Moreau, B. Riteau, F.A. Le Gal, M.F. Avril, J. Dausset, J.G. Guillet, and E.D. Carosella. 1998. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4510-4515.
- Paya, C.V., N. Kenmotsu, R.A. Schoon, and P.J. Leibson. 1988. Tumor necrosis factor and lymphotoxin secretion by human natural killer cells leads to antiviral cytotoxicity. *J Immunol* **141**: 1989-1995.
- Pazmany, L., O. Mandelboim, M. Vales-Gomez, D.M. Davis, T.C. Becker, H.T. Reyburn, J.D. Seebach, J.A. Hill, and J.L. Strominger. 1999. Human leucocyte antigen-G and its recognition by natural killer cells. *J Reprod Immunol* **43**: 127-137.
- Pazmany, L., O. Mandelboim, M. Vales-Gomez, D.M. Davis, H.T. Reyburn, and J.L. Strominger. 1996. Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. *Science* **274**: 792-795.
- Pende, D., R. Biassoni, C. Cantoni, S. Verdiani, M. Falco, C. di Donato, L. Accame, C. Bottino, A. Moretta, and L. Moretta. 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., S. Sivori, L. Accame, L. Pareti, M. Falco, D. Geraghty, P. Le Bouteiller, L. Moretta, and A. Moretta. 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., L. Accame, L. Pareti, A. Mazzocchi, A. Moretta, G. Parmiani, and L. Moretta. 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.
- Perarnau, B.M., A.C. Gillet, R. Hakem, M. Barad, and F.A. Lemonnier. 1988. Human β 2-microglobulin specifically enhances cell-surface expression of HLA class I molecules in transfected murine cells. *J Immunol* **141**: 1383-1389.
- Perez-Villar, J.J., I. Melero, F. Navarro, M. Carretero, T. Bellon, M. Llano, M. Colonna, D.E. Geraghty, and M. López-Botet. 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., N. Wagtmann, and E.O. Long. 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.
- Phillips, J.H., C. Chang, J. Mattson, J.E. Gumperz, P. Parham, and L.L. Lanier. 1996. CD94 and a novel associated protein (94AP) form a NK cell receptor involved in the recognition of HLA-A, HLA-B, and HLA-C allotypes. *Immunity* **5**: 163-172.

- Pook, M.A., V. Woodcock, M. Tassabehji, R.D. Campbell, C.W. Summers, M. Taylor, and T. Strachan. 1991. Characterization of an expressible nonclassical class I HLA gene. *Hum Immunol* **32**: 102-109.
- Rajagopalan, S., and E.O. Long. 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.
- Real, L.M., T. Cabrera, J. Canton, R. Oliva, F. Ruiz-Cabello, and F. Garrido. 1999. Looking for HLA-G expression in human tumours. *J Reprod Immunol* **43**: 263-273.
- Real, L.M., T. Cabrera, A. Collado, P. Jimenez, A. Garcia, F. Ruiz-Cabello, and F. Garrido. 1999. Expression of HLA G in human tumors is not a frequent event. *Int J Cancer* **81**: 512-518.
- Rinke de Wit, T.F., S. Vloemans, P.J. Van der Elsen, A. Haworth, and P.L. Stern. 1990. Differential expression of the HLA class I multigene family by human embryonal carcinoma and choriocarcinoma cell lines. *J Immunol* **444**: 1080-1087.
- Roberts, J.M., C.T. Taylor, G.C. Melling, C.R. Kingsland, and P.M. Johnson. 1992. Expression of the CD46 antigen, and absence of class I MHC antigen, on the human oocyte and preimplantation blastocyst. *Immunology* **75**: 202-205.
- Robertson, M.J., K.J. Cochran, C. Cameron, J.M. Le, R. Tantravahi, and J. Ritz. 1996. Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol* **24**: 406-415.
- Rock, K.L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A.L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**: 761-771.
- Rodriguez, A.M., V. Mallet, F. Lenfant, J. Arnaud, M. Girr, S. Urlinger, A. Bensussan, and P. Le Bouteiller. 1997. Interferon- γ rescues HLA class Ia cell surface expression in term villous trophoblast cells by inducing synthesis of TAP proteins. *Eur J Immunol* **27**: 45-54.
- Rouas-Freiss, N., R.E. Marchal, M. Kirszenbaum, J. Dausset, and E.D. Carosella. 1997. The α 1 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.
- Sadasivan, B., P.J. Lehner, B. Ortmann, T. Spies, and P. Cresswell. 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., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Samaridis, J., and M. Colonna. 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.
- Sanchez, M.J., M.O. Muench, M.G. Roncarolo, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 1994. Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med* **180**: 569-576.
- Sanders, S.K., P.A. Gibling, and P. Kavathas. 1991. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and human histocompatibility leukocyte antigen G, a nonclassical major histocompatibility complex class 1 molecule on cytotrophoblasts. *J Exp Med* **174**: 737-740.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Saper, M.A., P.J. Bjorkman, and D.C. Wiley. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* **219**: 277-319.
- Schagger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368-379.
- Schmidt, C.M., R.G. Ehlenfeldt, M.C. Athanasiou, L.A. Duvick, H. Heinrichs, C.S. David, and H.T. Orr. 1993. Extraembryonic expression of the human MHC class I gene HLA-G in transgenic mice. Evidence for a positive regulatory region located 1 kilobase 5' to the start site of transcription. *J Immunol* **151**: 2633-2645.
- Schmidt, C.M., and H.T. Orr. 1995. HLA-G transgenic mice: a model for studying expression and function at the maternal/fetal interface. *Immunol Rev* **147**: 53-65.
- Schumacher, T.N., D.V. Kantesaria, D.V. Serreze, D.C. Roopenian, and H.L. Ploegh. 1994. Transporters from H-2b, H-2d, H-2s, H-2k, and H-2g7 (NOD/Lt) haplotype translocate similar sets of peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 13004-13008.

- Shepherd, J.C., T.N. Schumacher, P.G. Ashton-Rickardt, S. Imaeda, H.L. Ploegh, C.A. Janeway, Jr., and S. Tonegawa. 1993. TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell* **74**: 577-584.
- Shields, M.J., and R.K. Ribaldo. 1998. Mapping of the monoclonal antibody W6/32: sensitivity to the amino terminus of beta2-microglobulin. *Tissue Antigens* **51**: 567-570.
- Shimizu, Y., D.E. Geraghty, B.H. Koller, H.T. Orr, and R. DeMars. 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., and R. DeMars. 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., A. Swaroop, R. Srivastava, and S.M. Weissman. 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., and J.E. Maguire. 1990. Regulation of the expression of class I MHC genes. *Crit Rev Immunol* **10**: 235-257.
- Sivori, S., M. Vitale, C. Bottino, E. Marcenaro, L. Sanseverino, S. Parolini, L. Moretta, and A. Moretta. 1996. CD94 functions as a natural killer cell inhibitory receptor for different HLA class I alleles: identification of the inhibitory form of CD94 by the use of novel monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* **26**: 2487-2492.
- Sivori, S., M. Vitale, L. Sanseverino, S. Parolini, M. Barbaresi, C. Bottino, and A. Moretta. 1996. Inhibitory CD94 molecules identified by the Z199 monoclonal antibody recognize different HLA-class I molecules. *Transplant Proc* **28**: 3199-3203.
- Slukvin, I., J.E. Boyson, D.I. Watkins, and T.G. Golos. 1998. The rhesus monkey analogue of human lymphocyte antigen-G is expressed primarily in villous syncytiotrophoblasts. *Biol Reprod* **58**: 728-738.
- Söderström, K., B. Corliss, L.L. Lanier, and J.H. Phillips. 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., M.R. Harris, C.S. Kindle, and T.H. Hansen. 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.
- Strickland, S., and W.G. Richards. 1992. Invasion of the trophoblasts. *Cell* **71**: 355-357.
- Suh, W.K., M.F. Cohen-Doyle, K. Fruh, K. Wang, P.A. Peterson, and D.B. Williams. 1994. Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science* **264**: 1322-1326.
- Suh, W.K., M.A. Derby, M.F. Cohen-Doyle, G.J. Schoenhals, K. Fruh, J.A. Berzofsky, and D.B. Williams. 1999. Interaction of murine MHC class I molecules with tapasin and TAP enhances peptide loading and involves the heavy chain alpha3 domain. *J Immunol* **162**: 1530-1540.
- Suh, W.K., E.K. Mitchell, Y. Yang, P.A. Peterson, G.L. Waneck, and D.B. Williams. 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.
- Tanabe, M., M. Sekimata, S. Ferrone, and M. Takiguchi. 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.
- Tang, X., Y. Nakata, H.O. Li, M. Zhang, H. Gao, A. Fujita, O. Sakatsume, T. Ohta, and K. Yokoyama. 1994. The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Res* **22**: 2857-2858.
- Taylor, R.N. 1997. Immunobiology of preeclampsia. *American J. of Reprod. Immunol.* **37**: 79-86.
- Temponi, M., U.M. Kekish, Z. Wang, and S. Ferrone. 1991. Reactivity of monoclonal antibody TP25.99 with a determinant shared by β 2-microglobulin (β 2m)-associated HLA-A, -B, and -C heavy chains and β 2m-free HLA-B and -C heavy chains. In HLA. Sasazuki et al, editor. Oxford University Press.
- Torkar, M., Z. Norgate, M. Colonna, J. Trowsdale, and M.J. Wilson. 1998. Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. *Eur J Immunol* **28**: 3959-3967.
- Tysoe-Calnon, V.A., J.E. Grundy, and S.J. Perkins. 1991. Molecular comparisons of the beta 2-microglobulin-binding site in class I major-histocompatibility-complex α -chains and proteins of related sequences. *Biochem J* **277**: 359-369.

- Übel, S., W. Kraas, S. Kienle, K.H. Wiesmüller, G. Jung, and R. Tampé. 1997. Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 8976-8981.
- Ulbrecht, M., J. Kellermann, J.P. Johnson, and E.H. Weiss. 1992. Impaired intracellular transport and cell surface expression of nonpolymorphic HLA-E: evidence for inefficient peptide binding. *J Exp Med* **176**: 1083-1090.
- Ulbrecht, M., T. Honka, S. Person, J.P. Johnson, and E.H. Weiss. 1992. The HLA-E gene encodes two differentially regulated transcripts and a cell surface protein. *J Immunol* **149**: 2945-2953.
- Ulbrecht, M., B. Rehberger, I. Strobel, G. Messer, P. Kind, K. Degitz, T. Bieber, and E.H. Weiss. 1994. HLA-G: expression in human keratinocytes in vitro and in human skin in vivo. *Eur J Immunol* **24**: 176-180.
- Ulbrecht, M., S. Modrow, R. Srivastava, P.A. Peterson, and E.H. Weiss. 1998. Interaction of HLA-E with peptides and the peptide transporter in vitro: implications for its function in antigen presentation. *J Immunol* **160**: 4375-4385.
- Ulbrecht, M., A. Couturier, S. Martinozzi, M. Pla, R. Srivastava, P.A. Peterson, and E.H. Weiss. 1999. Cell surface expression of HLA-E: interaction with human β 2-microglobulin and allelic differences. *Eur J Immunol* **29**: 537-547.
- Ulbrecht, M., S. Martinozzi, M. Grzeschik, H. Hengel, J.W. Ellwart, M. Pla, and E.H. Weiss. 2000. Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J Immunol* **164**: 5019-5022.
- Vales-Gomez, M., H.T. Reyburn, R.A. Erskine, M. Lopez-Botet, and J.L. Strominger. 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., M. Uhrberg, H.G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, K.L. Arnett, A. D'Andrea, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and P. Parham. 1997. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* **7**: 739-751.
- Verma, S., A. King, and Y.W. Loke. 1997. Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. *Eur J Immunol* **27**: 979-983.
- Villarejo, M.R., and I. Zabin. 1974. β -galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J Bacteriol* **120**: 466-474.
- Vitale, M., R. Castriconi, S. Parolini, D. Pende, M.-L. Hsu, L. Moretta, D. Cosman, and A. Moretta. 1999. The leukocyte Ig-like receptor (LIR)¹ for the cyromegalovirus UL18 protein displays a broad specificity for different HLA class I alleles: analysis of LIR-1⁺ NK cell clones. *Intern Immunol* **11**: 29-35.
- Vivier, E., J.M. Sorrell, M. Ackerly, M.J. Robertson, R.A. Rasmussen, H. Levine, and P. Anderson. 1993. Developmental regulation of a mucinlike glycoprotein selectively expressed on natural killer cells. *J Exp Med* **178**: 2023-2033.
- Wagtmann, N., R. Biassoni, C. Cantoni, S. Verdiani, M.S. Malnati, M. Vitale, C. Bottino, L. Moretta, A. Moretta, and E.O. Long. 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., S. Rojo, E. Eichler, H. Mohrenweiser, and E.O. Long. 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., K.L. Simpson, and C.H. Holmes. 1998. Calreticulin associates with non-HLA-A, -B class I proteins in the human choriocarcinoma cell lines JEG-3 and BeWo. *Immunology* **93**: 437-445.
- Wallace, R.B., J. Shaffer, R.F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose, K. Itakura, 1979. "Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to $\pi\chi$ 174 DNA: the effect of single base pair mismatch." *Nucleic Acids Res* **6**: 3543-3557.
- Warren, H.S., B.F. Kinnear, J.H. Phillips, and L.L. Lanier. 1995. Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *J Immunol* **154**: 5144-5152.
- Wei, X.H., and H.T. Orr. 1990. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum Immunol* **29**: 131-142.
- Wiendl, H., L. Behrens, S. Maier, M.A. Johnson, E.H. Weiss, and R. Hohlfeld. 2000. Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the nonclassical major histocompatibility antigen HLA-G. *Ann Neurol* **48**: 679-684.

- Yang, B., Y.S. Hahn, C.S. Hahn, and T.J. Braciale. 1996. The requirement for proteasome activity class I major histocompatibility complex antigen presentation is dictated by the length of preprocessed antigen. *J Exp Med* **183**: 1545-1552.
- Yang, Y., W. Chu, D.E. Geraghty, and J.S. Hunt. 1996. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN γ . *J Immunol* **156**: 4224-4231.
- Yelavarthi, K.K., J.L. Fishback, and J.S. Hunt. 1991. Analysis of HLA-G mRNA in human placental and extraplacental membrane cells by in situ hybridization. *J Immunol* **146**: 2847-2854.
- Zappacosta, F., F. Borrego, A.G. Brooks, K.C. Parker, and J.E. Coligan. 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.

PUBLIKATIONEN

Maier, S., Geraghty D.E., Weiss, E.H. (1999). "Expression and regulation of HLA-G in human glioma cell lines." *Transplant Proc* **31**: 1849-53.

Rebmann, V., Pfeiffer, K., Passler, M., Ferrone, S., Maier, S., Weiss, E.H., Grosse-Wilde, H. (1999). "Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid." *Tissue Antigens* **53**: 14-22.

Wiendl, H., Behrens, L., Maier, S., Johnson, M. A., Weiss, E.H., Hohlfeld, R. (2000). "Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the nonclassical major histocompatibility antigen HLA-G." *Ann Neurol* **48**: 679-84.

Maier, S., Grzeschik, M., Weiss, E.H., Ulbrecht, M. (2000). "Implications of HLA-E allele expression and different HLA-E ligand diversity for the regulation of NK cells." *Hum Immunol* **60**: in print.

ABSTRACTS

Maier, S., Ulbrecht, M., Messer, G., Kaudewitz, P., Weiss, E.H. (1996) „Expression of HLA-G isoforms in the skin.“ 27th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie. 26.-28.09.1996, Hamburg. *Immunobiol* 196:73

Maier, S., Weiss, E.H. (1998) „Expression of HLA-G in the human brain“ 29th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie. 23.-26.09.1998, Freiburg. *Immunobiol* 199:410

Hofmeister, V., Maier, S., Ulbrecht, M., McMaster, M., Weiss, E.H (1999) „A role for the truncated HLA-G isoforms in immune regulation?“ 30th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie. 29.09.-02.10.1999, Hannover. *Immunobiol* 200:328

LEBENS LAUF

Name Sabine Maier

Geburtsdatum 14.1.1968

Geburtsort Altötting

SCHUL AUSBILDUNG

Grundschule 1974-1978 Volksschule Nord, Altötting

Gymnasium 1978-1987 Neusprachliches Gymnasium der Englischen Fräulein, Altötting

STUDIUM

Universität 1987-1994 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Diplomprüfung WS 1993 Hauptfach: Humangenetik
Nebenfächer: Genetik, Immunologie, Pharmakologie/Toxikologie

Diplomarbeit 1994 „Charakterisierung des B144-Genproduktes“
bei Frau Prof. Dr. Weiß am Institut für Anthropologie und Humangenetik

PROMOTION 01/1995-12/1999 „Das komplexe Expressionsmuster von HLA-G und die Bedeutung seiner Genprodukte für die Funktion antigenunspezifischer Immuneffektorzellen“
bei Frau Prof. Dr. Weiß am Institut für Anthropologie und Humangenetik

2/2000-jetzt wissenschaftliche Mitarbeiterin am DFG-Projekt UL183-1
"Funktionelle Charakterisierung des humanen Leukozytenantigens F (HLA-F)", bei Dr. Matthias Ulbrecht, Institut für Anthropologie und Humangenetik

DANKE

An Frau Prof. Weiß für die Überlassung dieses spannenden Themas und ihre anregende Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit..

Frau Dr. Johnson für die Isotypbestimmung des mAK 2G12.

Herrn Dr. Dornmair für seine Unterstützung bei der Reinigung des rekombinanten α 1-Polypeptids.

Herrn Dr. Linke für die Bereitstellung der Tiere und die Durchführung der Immunisierungen, sowie für diverse wertvolle Ratschläge u.a. zur Proteinreinigung.

Ein herzliches Dankeschön allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen für das angenehme Arbeitsklima und die freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Vielen Dank meiner fleißigen „Korrekturschnecke“.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Matthias Ulbrecht für seine diversen Rettungsaktionen in der Zellkultur, am Computer etc. und Dr. Astrid Cannich, die sich mit mir zusammen durch diese lange Zeit gekämpft hat und der diese Arbeit ihre Fertigstellung verdankt.