

# **DER EINFLUSS DES POLYMORPHISMUS AUF DIE AUSBILDUNG VON HLA-DQ-PEPTIDREZEPTOREN**

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
**Daniel Schaefer**  
aus Mayen

**Bonn 2010**

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.

Die vorliegende Arbeit wurde am  
**Institut für Genetik, Abteilung Immunbiologie**  
unter Leitung von  
**Prof. Dr. Norbert Koch**  
an der  
**Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn**  
angefertigt.

1. Gutachter: **Prof. Dr. N. Koch**
2. Gutachter: **Prof. Dr. W. Witke**

Tag des Promotionskolloquiums: 22.03.2011  
Erscheinungsjahr: 2011

*„Die Kraft, große Dinge zu bewerkstelligen, kommt aus der ununterbrochenen Beobachtung der kleinen Dinge.“*

Gerd Bucerius (1906-95)

**Inhalt**

Abbildungsverzeichnis ..... IV

Tabellenverzeichnis ..... V

Abkürzungsverzeichnis ..... VI

**1. ZUSAMMENFASSUNG ..... 1**

**2. EINLEITUNG ..... 2**

2.1 DAS IMMUNSYSTEM ..... 2

2.2 HUMAN-LEUKOCYTE-ANTIGEN (HLA) ..... 3

    2.2.1 *Übersicht zum menschlichen HLA-System* ..... 3

    2.2.1 *Aufbau und Struktur von HLA-Klasse-II-Molekülen* ..... 4

    2.2.2 *Nomenklatur von HLA-Klasse-II-Molekülen* ..... 6

    2.2.3 *Vererbung von HLA-Genen und Kopplungsungleichgewicht* ..... 7

2.3 ANTIGENPROZESSIERUNG DURCH MHC-KLASSE-II-MOLEKÜLE ..... 10

    2.3.1 *Zusammenbau der MHC-Klasse-II-Moleküle im Endoplasmatischen Retikulum* ..... 11

    2.3.1 *Intrazelluläre Transportrouten von HLA-Klasse-II-Dimeren* ..... 13

    2.3.2 *Antigenpräsentation: der Klasse-II-Prozessierungsweg* ..... 15

2.4 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN HLA-GENEN UND ERKRANKUNGEN ..... 17

    2.4.1 *Krankheitsassoziierter HLA-Polymorphismus* ..... 17

    2.4.2 *HLA-DQ-Moleküle und Autoimmunerkrankungen* ..... 19

2.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT ..... 22

**3. MATERIAL UND METHODEN ..... 23**

3.1 GERÄTE ..... 23

3.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN ..... 24

    3.2.1 *Einwegmaterial* ..... 24

    3.2.2 *Chemikalien, Reagenzien* ..... 25

    3.2.3 *Allgemeine Lösungen* ..... 27

    3.2.4 *Enzyme* ..... 29

    3.2.5 *Reaktionskits* ..... 29

    3.2.6 *Verwendete Bakterienstämme* ..... 29

    3.2.7 *Zelllinien* ..... 29

    3.2.8 *Primär-Antikörper* ..... 30

    3.2.9 *Sekundär-Antikörper* ..... 30

    3.2.10 *Oligonukleotide / Primer* ..... 31

    3.2.11 *Verwendete Plasmide* ..... 32

3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN ..... 33

    3.3.1 *Gewinnung von cDNS aus menschlichen Tumorzellen* ..... 33

    3.3.2 *PolymeraseKettenreaktion (PCR)* ..... 34

    3.3.3 *Overlap-Extension-PCR* ..... 35

    3.3.4 *DNS-Ligation* ..... 37

    3.3.5 *Kultivierung von Bakterien* ..... 37

3.3.6	<i>Hitzeschock- Transformation von Bakterien</i> .....	38
3.3.7	<i>Präparation von Plasmid-DNS aus Bakterien</i> .....	38
3.3.8	<i>Restriktionsanalyse von Plasmid-DNS</i> .....	39
3.3.9	<i>Agarosegelelektrophorese</i> .....	40
3.3.10	<i>Elution von DNS aus Agarosegelen</i> .....	41
3.3.11	<i>Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration</i> .....	41
3.4	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	42
3.4.1	<i>Allgemeine Zellkultivierung</i> .....	42
3.4.2	<i>Ernte, Zählen und Lyse von Zellen</i> .....	43
3.4.3	<i>Transiente Expression von MHC-II-Proteinen in IMR90S-Zellen</i> .....	44
3.4.4	<i>Durchflusszytometrie/ Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)</i> .....	44
3.5	BIOCHEMISCHE METHODEN.....	47
3.5.1	<i>Immunpräzipitation</i> .....	47
3.5.2	<i>Abbau von N-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden</i> .....	48
3.5.3	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> .....	50
3.5.4	<i>Western Blot</i> .....	51
3.6	ANGEWANDTE PC-SOFTWARE .....	52
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>53</b>
4.1	ISOLIERUNG VON KLASSE-II-MOLEKÜLEN AUS EUKARYOTISCHEN ZELLINIEN.....	53
4.2	ERHÖHUNG DER OBERFLÄCHENEXPRESSION VON KLASSE-II-MOLEKÜLEN NACH EXPRESSION DER INVARIANTEN KETTE .....	54
4.2.1	<i>Untersuchung der N-Glykanreifung von HLA-DR und -DP in Abhängigkeit der Invarianten Kette</i> .....	54
4.2.2	<i>Kohlenhydratreifung von HLA-DQ in An- und Abwesenheit der Ii</i> .....	56
4.2.3	<i>Einfluss der Ii auf die Oberflächenexpression von HLA-DR und -DP</i> .....	58
4.2.4	<i>Einfluss der Ii auf den Zelloberflächentransport von DQ-Molekülen</i> .....	61
4.2.5	<i>Kohlenhydratmodifikation von Zelloberflächen-assoziierten HLA-DQ-Molekülen</i> .....	63
4.2.6	<i>Untersuchung des Einflusses von HLA-II-Grube-bindenden Sequenzen der Invarianten Kette</i> .....	65
4.3	SICHERSTELLUNG DER ERFOLGREICHEN PEPTIDPRÄSENTATION VERSCHIEDENER DQ-ALLOTYPEN .....	68
4.3.1	<i>Transportkompetenz von DQ-Heterodimeren in Abhängigkeit der Kombination von <math>\alpha</math>- und <math>\beta</math>-Untereinheiten</i> .....	68
4.3.2	<i>Kompetition zweier DQ<math>\beta</math>-Ketten um die Bindung an eine DQ<math>\alpha</math>- Kette</i> .....	72
4.3.3	<i>Berechnung des Kopplungsungleichgewichts von HLA-DQ<math>\alpha</math> und -DQ<math>\beta</math></i> .....	74
4.4	ANALYSEN DER DR- UND DQ-STRUKTUR.....	79
4.4.1	<i>Herstellung eines HLA-DQ-Moleküls mit HLA-DR-Strukturmerkmalen</i> .....	79
4.4.2	<i>Überprüfung der Kohlenhydratreifung einer mutierten DQ<math>\beta</math>-Kette</i> .....	80
4.4.3	<i>Die HLA-Isotypen DR und DQ dienen als Vorbild zur Herstellung von chimären Klasse-II-Molekülen</i> .	82
4.4.4	<i>Überprüfung der chimären DQ/DR-Rezeptoren</i> .....	83
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>90</b>
5.1	BEDEUTUNG DES AUFTRETENS NICHT FUNKTIONELLER DQ-PEPTIDREZEPTOREN .....	90
5.1.1	<i>Einschränkung der Kombinationsvielfalt von DQ-Allelkombinationen</i> .....	90
5.1.2	<i>Modell eines qualitätskontrollierten Zusammenbaus von DQ-Rezeptoren</i> .....	94
5.1.3	<i>Klinische Relevanz und Selektion bestimmter DQ-Allelkombinationen</i> .....	97
5.1.4	<i>Zusammenhang zwischen Partnerwahl und HLA-DQ-Allelkombinationen</i> .....	102

5.2	KLASSE-II-ABHÄNGIGKEIT VON DEM CHAPERON INVARIANTE KETTE.....	104
5.2.1	<i>Die Invariante Kette als Chaperon für HLA-DR, -DP und -DQ .....</i>	<i>104</i>
5.2.2	<i>Die Anwesenheit der Invarianten Kette verändert die DQ-Konformation .....</i>	<i>105</i>
5.2.3	<i>Der Polymorphismus beeinflusst die Transporteigenschaften der DQ-Heterodimere unabhängig der Invarianten Kette .....</i>	<i>106</i>
5.3	STRUKTURANALYSE VON HLA-DQ-MOLEKÜLEN .....	108
5.3.1	<i>Sequenzspezifische Abhängigkeit der DQ-Allelkombinationen von der Invarianten Kette.....</i>	<i>108</i>
5.3.2	<i>Die extrazellulären Domänen sind entscheidend für den erfolgreichen Zusammenbau eines Heterodimers.....</i>	<i>111</i>
5.3.3	<i>Einfluss des Polymorphismus der Aminosäuresequenz 65 bis 87 auf den Transport von Heterodimeren</i>	<i>112</i>
5.4	AUSBLICK .....	115
	Anhang .....	118
	Literaturverzeichnis .....	138
	Danksagung .....	148
	Curriculum vitae .....	149
	Erklärung .....	150

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 2.1: DER MENSCHLICHE HLA-KOMPLEX .....	4
ABBILDUNG 2.2: STRUKTURMODELL VON HLA-KLASSE-II-MOLEKÜLEN.....	5
ABBILDUNG 2.3: SELEKTIVER ZUSAMMENBAU VON HLA-KLASSE-II-MOLEKÜLEN .....	12
ABBILDUNG 2.4: TRANSPORTROUTE VON HLA-KLASSE-II-DIMEREN ZWISCHEN ER UND ZELLMEMBRAN.....	14
ABBILDUNG 2.5: ANTIGENBELADUNG EINES MHC-II-REZEPTORS.....	16
ABBILDUNG 2.6: POLYMORPHISMUS VON HLA-DQ UND AUTOIMMUNERKRANKUNGEN .....	20
ABBILDUNG 2.7: RELATIVES RISIKO FÜR T1D DURCH HLA-KLASSE-II-MOLEKÜLE.....	21
ABBILDUNG 3.1: PUNKTMUTATION DURCH OVERLAP-EXTENSION-PCR.....	35
ABBILDUNG 3.2: VERBINDUNG ZWEIER DNS-STRÄNGE DURCH OVERLAP-EXTENSION-PCR.....	36
ABBILDUNG 3.3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES DURCHFLUSSZYTOMETERS.....	45
ABBILDUNG 3.4: ZUSAMMENBAU VON N-GLYKOSIDISCH GEBUNDENEN GLYKOPROTEINEN .....	49
ABBILDUNG 4.1: EINFLUSS DER II AUF DIE KOHLENHYDRATREIFUNG EINER DR- UND DP-ALLELKOMBINATION.....	56
ABBILDUNG 4.2: II FÖRDERT DIE ENDOH-RESISTENZ DER N-GLYKOSIDE VON HLA-DQ-DIMEREN .....	58
ABBILDUNG 4.3: II ERHÖHT DIE ZELLOBERFLÄCHENEXPRESSION VON HLA-DR UND -DP .....	60
ABBILDUNG 4.4: II FÖRDERT DIE OBERFLÄCHENEXPRESSION VON HLA-DQ-REZEPTOREN .....	62
ABBILDUNG 4.5: ANALYSE DER ENDOH-RESISTENZ VON ZELLOBERFLÄCHEN-MOLEKÜLEN.....	65
ABBILDUNG 4.6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON MUTATIONEN DER INVARIANTEN KETTE .....	66
ABBILDUNG 4.7: OBERFLÄCHENEXPRESSION VON HLA-DQ IN ABHÄNGIGKEIT VON DER II-MUTANTEN .....	67
ABBILDUNG 4.8: ENDOH-SENSITIVE HLA-DQ- REZEPTOREN .....	69
ABBILDUNG 4.9: ANALYSE DER OBERFLÄCHENEXPRESSION VON ENDOH-SENSITIVEN HLA-DQ-REZEPTOREN .....	70
ABBILDUNG 4.10: KONKURRENZ ZWEIER HLA-DQ $\beta$ -KETTEN UM DIE BILDUNG EINES FUNKTIONELLEN PEPTIDREZEPTORS.....	72
ABBILDUNG 4.11: INTRAZELLULÄRE LOKALISIERUNG ZWEIER DQ-ALLOTYPEN IN MIIC-ORGANELLEN.....	74
ABBILDUNG 4.12: ENDOH-VERDAU EINER DQ $\beta$ - KETTE MIT 3 MUTIERTEN AS.....	81
ABBILDUNG 4.13: STRUKTURELLER AUFBAU VON CHIMÄREN DQ/DR MOLEKÜLEN .....	83
ABBILDUNG 4.14: OBERFLÄCHENEXPRESSION VON NICHT-FUNKTIONELLEN CHIMÄREN DQ/DR-PEPTIDREZEPTOREN.....	84
ABBILDUNG 4.15: ANALYSE VON FUNKTIONELLEN CHIMÄREN DQ/DR-PEPTIDREZEPTOREN IM DURCHFLUSSZYTOMETER .....	86
ABBILDUNG 4.16: MODIFIKATION DER CHIMÄREN DQ/DR-MOLEKÜLE IM GOLGI.....	87
ABBILDUNG 5.1: MODELL DES ZUSAMMENBAUS VON DQ-UNTEREINHEITEN ZU EINEM HETERODIMER IM ER .....	97
ABBILDUNG 5.2: REGIONALE VERTEILUNG VON NICHT-FUNKTIONELLEN HLA-DQ-ALLELEN.....	99
ABBILDUNG 5.3: SEQUENZVERGLEICH ZWISCHEN DQA1*0103 UND DQA1*0501 .....	109
ABBILDUNG 5.4: SEQUENZVERGLEICH UND STRUKTURANALYSE ZWEIER CHIMÄRER MOLEKÜLE.....	114
ABBILDUNG 6.1: pCDNS 3.1.V5 HIS-VEKTOR.....	118
ABBILDUNG 6.2: BILDICHE DARSTELLUNG DER ALLELVERTEILUNG VON „NICHT PASSENDEN“ HLA-DQA1 UND -DQB1.....	134
ABBILDUNG 6.3: BILDICHE DARSTELLUNG DER ALLELVERTEILUNG VON „PASSENDEN“ HLA-DQA1 UND -DQB1 .....	136
ABBILDUNG 6.4: FUNKTIONELLE DQ-REZEPTOREN IN ABHÄNGIGKEIT DER ZELLINIE .....	137

---

**Tabellenverzeichnis**

TABELLE 2.1: NOMENKLATUR VON HLA-KLASSE-II-MOLEKÜLEN .....	7
TABELLE 3.1: MASTERMIX (A) UND TEMPERATURPROFIL (B) EINER STANDARD-PCR.....	34
TABELLE 3.2: ZELLINIEN UND ZELLKULTURBEDINGUNGEN.....	42
TABELLE 3.3: FILTER DES FACSCAN UND ZUGEHÖRIGE KENNZEICHNUNG.....	45
TABELLE 3.4 DIFFERENZIERUNG VON PROTEIN-SEPHAROSE .....	47
TABELLE 3.5: REZEPT FÜR DEN VERDAU DURCH ENDOH UND PNGASEF .....	50
TABELLE 3.6: REZEPT ZUM GIEßEN EINES SDS-POLYACRYLAMIDGELS.....	50
TABELLE 4.1: ÜBERSICHT ÜBER HLA-ALLELE EUKARYOTISCHER ZELLINIEN .....	53
TABELLE 4.2: FUNKTIONELLE UND NICHT- FUNKTIONELLE DQ-PEPTIDREZEPTOREN .....	71
TABELLE 4.3: KOPPLUNGSUNGLEICHGEWICHT VON HLA-DQ-HAPLOTYPEN.....	76
TABELLE 4.4: HAPLOTYPEN UND GEMITTELTES KOPPLUNGSUNGLEICHGEWICHT .....	78
TABELLE 4.5: ÜBERSICHT ÜBER EINGEFÜHRTE PUNKTMUTATIONEN IN EINER HLA-DQ-KETTE .....	80
TABELLE 4.6: FUNKTIONELLER ZUSAMMENBAU VON CHIMÄREN DR/DQ-KETTEN.....	89
TABELLE 5.1 ERGEBNISVERGLEICH FÜR EINE OBERFLÄCHENEXPRESSION VERSCHIEDENER DQ-ALLOTYPEN .....	93
TABELLE 6.1: STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG VON HLA-DQ/ -DR DURCH EXPASY.ORG .....	119
TABELLE 6.2: BESCHREIBUNG EINER DQ $\beta$ - KETTE MIT DR- STRUKTURMERKMALEN.....	120
TABELLE 6.3: BESCHREIBUNG DER HLA-DQ/DR-FUSIONSKONSTRUKTE .....	121
TABELLE 6.4: HAPLOTYPEN UND KOPPLUNGSUNGLEICHGEWICHT INNERHALB ETHNISCHER GRUPPEN .....	123
TABELLE 6.5: WELTWEITE FREQUENZ VON HLA-DQ-ALLELEN .....	131
TABELLE 6.6: FREQUENZ VON HLA-DQA1 / B1-HAPLOTYPEN UND DEREN KOPPLUNGSUNGLEICHGEWICHT.....	131



**Abkürzungsverzeichnis**

<b>A</b>	
7-AAD	7-Aminoactinomycin
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle (Antigen presenting cell)
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
<b>B</b>	
bp	Basenpaare
BFA	Brefeldin A
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
<b>C</b>	
C	Cytosin
C- terminal	Carboxy-terminal
ca.	Circa
CBS	Klasse-II-Bindungsregion
cDNS	Copy DNS (entsteht durch Reverse Transkriptase aus RNS)
CLIP	class II-associated invariant chain peptide
<b>D</b>	
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<b>E</b>	
E. coli	Escherischia coli
ECL	Elektro-chemische Lumineszenz
EDTA (Trypsin)	Ethylendiamintetraessigsäure
EMEM	Eagle's minimal essential medium
EndoH	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und weitere
<b>F</b>	
Fa	Firma
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FCS	Fötales Kälberserum
FL1, 2	Fluoreszenz 1, 2
FSC	Vorwärtsstreulicht
<b>G</b>	
°C	Grad Celsius
g	Gravitationskonstante
G	Guanin
GBS	Grubebindesequenz (Aminosäuresequenz innerhalb von CLIP)
gDNS	Genomische DNS
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
<b>H</b>	
h	Stunde
HLA	Human Leukocyte Antigen
<b>I</b>	
IC	Intermediäres Kompartiment
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin

INF	Interferon
IP	Immunpräzipitation
<b>K</b>	
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
<b>L</b>	
L	Liter
LB- Agar	Luria-Bertani-Agar
<b>M</b>	
µM	Micromolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	Molar
MIIC	Endosomales Kompartiment; Lokalisierung der Antigenbindung durch MHC II
mA	Milliampère
mg	Milligramm
MHC	Histokompatibilitätskomplex
min	Minute
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MW	Molekulargewicht
<b>N</b>	
nm	Nanometer
<b>P</b>	
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
Pen / Strep	Penicillin / Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
PNgaseF	N-Glykosidase F
<b>R</b>	
RNS	Ribonucleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
<b>S</b>	
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
sog.	Sogenannt
SSC	Seitwärtsstreulicht
<b>T</b>	
T	Thymin
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	Tetramethyldiamin
TH	T-Helferzelle
TM	Transmembran
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Aminomethan
T1D	Insulinabhängiger Diabetes mellitus Typ 1
<b>U</b>	
ü.N.	Über Nacht
<b>V</b>	
V	Volt
<b>W</b>	

w/v	Gewicht pro Volumen
-----	---------------------

### **Y**

YT- Agar	Yeast-Trypton-Agar
----------	--------------------

### **Z**

z.B.	Zum Beispiel
------	--------------

## 1. Zusammenfassung

Klasse-II-Moleküle werden durch Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (HLA) kodiert und dienen der Antigenpräsentation. Ein Klasse-II-Molekül besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die sich zu einem Heterodimer im ER zusammenlagern. Die Beladung des HLA-Heterodimers mit einem antigenen Peptid erfolgt im MIIC-Kompartiment. Nach dem Transport des Klasse-II-Peptidrezeptors zur Zelloberfläche erfolgt die Präsentation des Antigens für CD4-positive T-Helferzellen. Innerhalb der Gruppe der Klasse-II-Gene des HLA-Komplexes werden drei Genpaare unterschieden, die für die Isotypen DR, DP und DQ kodieren. Gemeinsam ist allen drei Isotypen, dass sie über eine Vielzahl von Allelen, sowohl für die  $\alpha$ - als auch für die  $\beta$ -Genorte, verfügen (Ausnahme DR $\alpha$ ). Ausgehend von diesem Polymorphismus kann ein Individuum maximal zwei Allele für die  $\alpha$ - und zwei Allele für die  $\beta$ -Untereinheit besitzen. Die verschiedenen Allele führen nach Translation zu den HLA-Untereinheiten. Nach heutigem Stand konnten im menschlichen Genom 26 unterschiedliche  $\alpha$ - und 89  $\beta$ -Untereinheiten identifiziert werden, wovon in einem Individuum maximal zwei verschiedene  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Ketten vorkommen. Eine freie Kombinierbarkeit der Untereinheiten lässt eine große Vielfalt an DQ-Heterodimeren in der menschlichen Population postulieren. In dieser Arbeit sollte der Einfluss des Polymorphismus auf den Zusammenbau von DQ-Heterodimeren im ER, die Abhängigkeit vom Chaperon „Invariante Kette“ und die Oberflächenexpression der HLA-Rezeptoren untersucht werden. Die Identifikation wichtiger Abschnitte der Primärsequenz, die für die Stabilisierung von Heterodimeren beitragen, sollte weiterführende Erkenntnisse zur Bedeutung des Polymorphismus liefern. Für die experimentellen Analysen dieser Arbeit konnten drei DQ $\alpha$ - und vier DQ $\beta$ -Untereinheiten genutzt werden, die zu insgesamt zwölf DQ-Heterodimeren kombiniert wurden. Zum Nachweis eines funktionsfähigen DQ-Heterodimers wurde der Transport durch den Golgi Komplex, sowie die Oberflächenexpression der Rezeptoren, bestimmt. Die Untersuchung der Reifung der N-Glykane durch Enzyme des Golgi Apparates lieferte zudem einen Hinweis auf die korrekte Faltung der DQ-Moleküle. Die Analyse der zwölf DQ-Allotypen ergab, dass ein Drittel der Heterodimere weder eine Glykanreifung im Golgi erfuhren, noch konnten diese auf der Zelloberfläche detektiert werden. Anhand weiterführender Konkurrenzexperimente gelang der Nachweis, dass eine Untereinheit eine nicht-passende Kette aus dem  $\alpha/\beta$ -Komplex verdrängen kann und im Anschluss ein neuer funktionsfähiger HLA-Rezeptor entsteht. Nicht-zusammenpassende HLA-Untereinheiten verbleiben im ER. Die Relevanz dieser Resultate wurde anhand der Kopplung des jeweiligen DQ $\alpha$ - und DQ $\beta$ -Allels auf einem Chromosom (Haplotyp) in 20 regional differenzierten Ethnien untersucht. DQ-Allelkombinationen, die nicht zu einem funktionsfähigen Heterodimer kombiniert werden konnten, sind in 78 von 80 Fällen mit einem negativen Kopplungsungleichgewicht assoziiert. Hingegen sind die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der funktionell getesteten DQ-Allelkombinationen mit einer positiven Kopplung auf einem Chromosom verbunden. Für die Vererbung von DQ-Molekülen sind vermutlich selektive Mechanismen vorhanden, die das Auftreten von nicht-funktionellen DQ-Allelkombinationen verhindern. Der Ausfall aller möglichen DQ-Rezeptoren in einem Individuum konnte nicht nachgewiesen werden. Die transportkompetenten DQ-Moleküle zeigten eine strikte Abhängigkeit von der Invarianten Kette bezüglich der Reifung der Kohlenhydrate und unterschieden sich dabei von HLA-DR und -DP. Untersuchungen mit chimären Fusionskonstrukten, die Sequenzbereiche von DR und DQ enthalten, lieferten den Hinweis, dass besonders die Aminosäurebereiche am Grubenein- und Ausgang für die Stabilität der Heterodimere verantwortlich sind.

## 2. Einleitung

### 2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen besteht aus einem komplexen und differenzierten Netzwerk von Abwehrreaktionen, die die Aufgabe besitzen, den Organismus vor Krankheitserregern wie z.B. Bakterien, Pilze und Viren zu schützen und somit das Überleben des Individuums zu sichern. Das Immunsystem ist dabei in die angeborene und in die erworbene Immunabwehr unterteilt. Die erworbene Immunabwehr ist hoch spezifisch für Erreger und entwickelt sich im Laufe eines Lebens mit Merkmalen wie Immungedächtnis und Toleranz zu einer individuellen Abwehrmauer. Einige Zellen erwerben nach dem ersten Antigenkontakt ein Gedächtnis, um bei erneutem Kontakt schneller und vor allem effektiver antworten zu können. Gleichzeitig muss das Immunsystem eine Form der Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen ausüben, damit die Immunantwort sich nicht gegen den eigenen Organismus richtet (Janeway, 1999).

Die spezifische Immunabwehr wird durch die B- und T-Lymphozyten vermittelt. Diese Zellen besitzen Rezeptoren, die in der Lage sind, Antigene spezifisch zu erkennen.

*Humorale Immunantwort:* Die Antigen-Rezeptoren der B-Zellen heißen Antikörper (auch Immunglobuline (Ig)), die der T-Zellen werden als T-Zellrezeptoren (TCR) bezeichnet. Die B-Zellen bekämpfen die Antigene extrazellulär, indem sie Antikörper freisetzen, die spezifisch Oberflächenmoleküle der Erreger erkennen können. Sezernierte Immunglobuline entstehen durch alternatives Spleißen der m-RNS und besitzen somit keine Transmembrandomäne.

*Zelluläre Immunantwort:* T-Zellen können erst dann aktiviert werden, wenn ein Antigen über MHC-Moleküle (MHC = Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex) auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Die MHC-Moleküle der Klasse I (MHC I) werden auf kernhaltigen Körperzellen exprimiert, die MHC-Moleküle der Klasse II (MHC II) indessen nur auf Zellen des Immunsystems, die als Antigen-präsentierende Zellen (APC) bezeichnet werden. Zu den APC gehören B-Lymphozyten, Makrophagen bzw. Monozyten und dendritische Zellen (DC). Die zytotoxischen (CD8-positiven) T-Zellen erkennen an MHC-I-Moleküle gebundene, zumeist intrazelluläre, Peptide und bekämpfen die infizierten Zellen. CD4-positive T-Helferzellen (TH-Zellen) können in ihrer Immunantwort nur durch MHC-II-Peptidrezeptoren stimuliert werden. Durch MHC-II-Moleküle werden Peptidstücke von einer Länge von 12 – 25 AS präsentiert, die durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und in Lysosomen fragmentiert wurden (Rammensee, 1996).

Je nach Funktion in der zellulären bzw. humoralen Abwehr werden die TH-Zellen in TH1- und TH2-Zellen unterschieden. TH1-Zellen, die Interferon  $\gamma$  (INF  $\gamma$ ) ausschütten, aktivieren vor allem Makrophagen, die als Phagozytosezellen bekannt sind. Durch diese Aktivierung wird die zelluläre Immunantwort unterstützt. TH2-Zellen hingegen sind Teil

der humoralen Immunantwort. Sie produzieren die Interleukine IL-4 und IL-5, wodurch B-Zellen aktiviert werden (Rao, 2000).

Sowohl die T- als auch die B-Zellen durchlaufen eine zentrale und eine periphere Toleranzentwicklung. Durch negative Selektion bei der T-Zellentwicklung im Thymus soll ausgeschlossen werden, dass die T-Zellen, die körpereigene Antigene erkennen, in die Peripherie gelangen. Die zentrale Toleranzentwicklung der T-Zellen findet im Thymus statt. Es handelt sich dabei um eine Selektion, bei der T-Zellen, die sich gegen körpereigene Zellen richten, den Reifungsprozess nicht überstehen. Ein Großteil der B-Zellen wird im Knochenmark auf Funktionalität getestet. Gelangen dennoch autoreaktive B- oder T-Zellen in die Peripherie, so werden sie im Rahmen der peripheren Toleranzentwicklung durch weitere Toleranzmechanismen kontrolliert (Nossal, 1994).

## **2.2 Human-Leukocyte-Antigen (HLA)**

### **2.2.1 Übersicht zum menschlichen HLA-System**

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (HLA) ist ein Satz von Genen mit überwiegend immunologischen Funktionen. Der HLA-Komplex umfasst eine Region von ca. 200 Genen. Mehr als 4 Millionen Basenpaare dieser Gene kodieren für den HLA-Komplex (0,1% des humanen Genoms), dessen Lokalisierung auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.31) angegeben wird (Alberts, 1990; Penn, 2005).

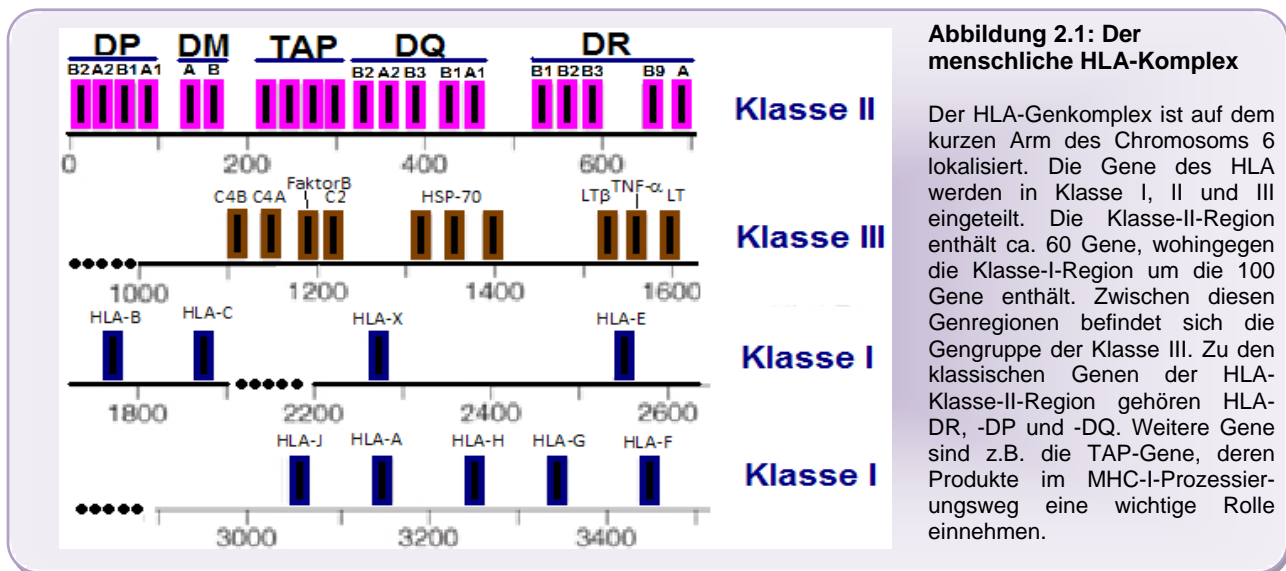
Die Gene des HLA-Komplexes lassen sich in drei unterschiedliche Klassen unterteilen, die sich durch ihre Funktionen abgrenzen.

Die Einführung dieser Unterteilung im MHC-System (Major Histocompatibility Complex) erfolgte erstmals 1977 durch Klein. Der MHC-Komplex geht auf die Forschung am Mausmodell zurück und wird in der Literatur häufig als Synonym für das HLA-System genutzt (Jones, 1990; Klein, 1997; Nonaka 2001).

Ausgehend von den ca. 4.000 Kb des gesamten HLA-Komplexes umfasst die HLA-Klasse-I-Region ca. 1800 Kb und die HLA-Klasse-II-Region ca. 1000 Kb (Penn, 2005). Die klassischen Gene der Klasse-I-Moleküle lassen sich in die Isotypen HLA-A, HLA-B und HLA-C unterscheiden. Die Isotypen der Klasse-II-Region werden hingegen als HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ bezeichnet (Klein & Sato, 2000).

Die Klasse der MHC-III-Gene ist im HLA zwischen den Klasse-I- und Klasse-II-Genorten lokalisiert. Die Klasse-III-Region besitzt dabei die höchste Gendichte mit ca. 60 verschiedenen Genorten und umfasst ca. 730 Kb. Eine Vielzahl der Gene der Klasse-III ist mit immunologischen Funktionen assoziiert. Dazu gehören die Komplementfaktoren (C2, C4A, C4B und BF), Zytokine TNFa, TNFb, LTa and LTb) und Chaperone wie HSP70.

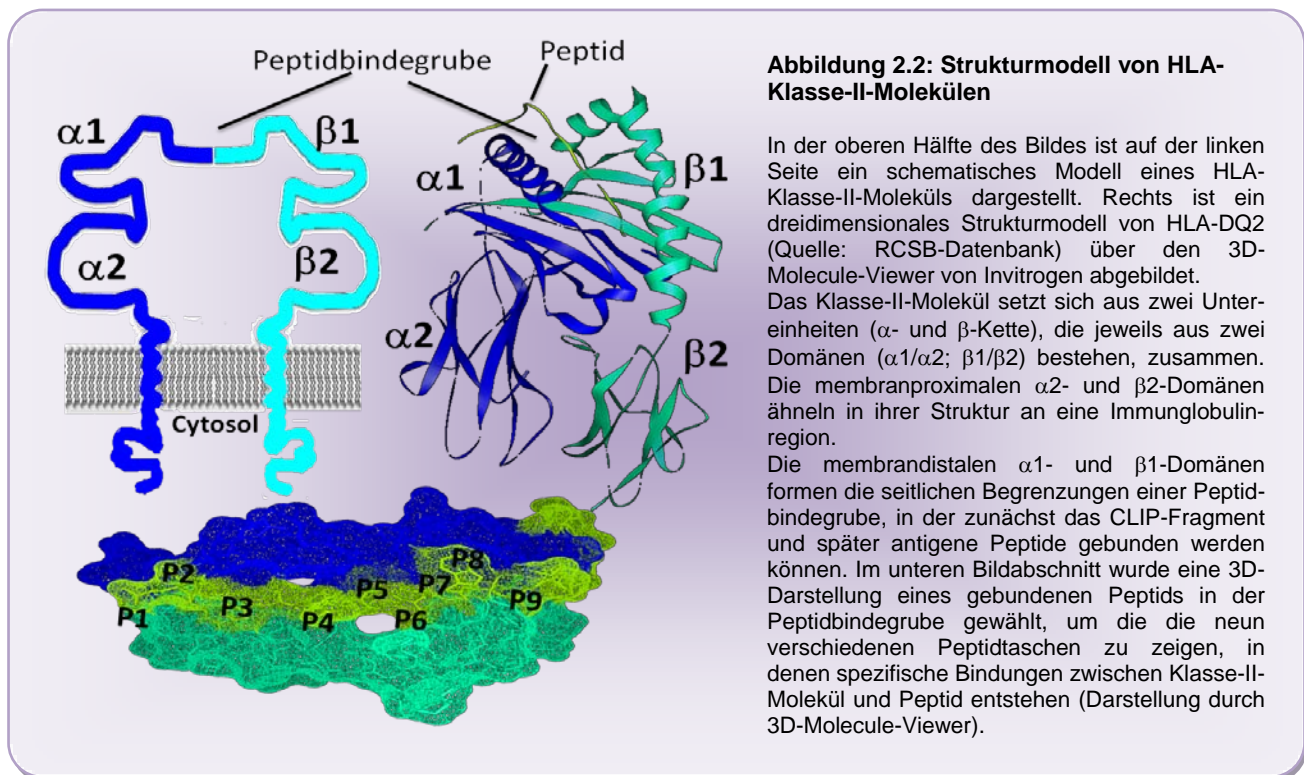
Das HLA-System ist sehr polymorph, d.h. für die meisten Genorte existieren zahlreiche genetische Varianten, die sogenannten Allele. Die Genprodukte des HLA-Komplexes werden als HLA-Antigene beschrieben, denen innerhalb des Immunsystems eine zentrale Rolle zukommt. Die Unterscheidung zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen ist essentiell für die Organisation des Immunsystems und für das Überleben des menschlichen Organismus (Vandiedonk & Knight, 2009). Um diese Unterscheidung zu gewährleisten ist die Antigenpräsentation durch die antigenpräsentierenden Klassen des HLA-Komplexes unerlässlich.



### 2.2.1 Aufbau und Struktur von HLA-Klasse-II-Molekülen

Die Analyse der dreidimensionalen Struktur von HLA-Molekülen ist auf Röntgenstrukturanalysen zurückzuführen. Mittels dieser Technik wird ein HLA-Molekül als Heteropeptid-dimer beschrieben, das aus zwei Untereinheiten mit gebundenem Peptid besteht. Dabei kodiert jeweils ein Gen für eine dieser Untereinheiten, die als Alpha- ( $\alpha$ -) und Beta- ( $\beta$ -) Kette bezeichnet werden.

Ein reifes HLA-Klasse-II-Molekül hat ein Molekulargewicht von ca. 58 – 65 kD, wobei die  $\alpha$ -Kette ca. 33 – 35 kD ausmacht und die  $\beta$ -Untereinheit 25 – 30 kD. HLA-Antigene besitzen eine Domänenstruktur und gehören zu den Molekülen der Immunglobulin-superfamilie. Die einzelnen Domänen sind in zwei N-terminale extrazytoplasmatische Regionen von 90 – 100 Aminosäuren, eine Transmembranregion von 20 – 25 Aminosäuren und in ein kurzes zytoplasmatisches Segment von 12 – 15 Aminosäuren gegliedert. Die membranproximalen Domänen ( $\alpha_2$ ;  $\beta_2$ ) enthalten eine intramolekulare Disulfidbrückenbindung und ihr Aufbau ähnelt der konstanten Immunglobulinregion. Die distalen  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Domänen formen eine sogenannte Peptidbindedomäne aus, die der Präsentation von Antigenen dient. Die peptidbindende Domäne besitzt eine Grube, deren Boden durch eine  $\beta$ -Faltblattstruktur entsteht und durch zwei seitliche  $\alpha$ -Helices begrenzt werden (Stern et al., 1994; siehe Abbildung 2.2).



Die Peptide, die in den Positionen P1 bis P9 in der Peptidgrube binden, zeigen eine konservierte Konformation (siehe Abbildung 2.2). Diese erweiterte Peptidkonformation entsteht durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den konservierten AS-Resten des HLA-Klasse-II-Moleküls und dem Peptidrückgrat. Dabei werden die Positionen P1, P4, P6 und P9 des Peptids als Anker-Reste bezeichnet, da diese eine direkte Bindung in die Taschen der Peptidbindegrube zeigen und zur Stabilisierung des Klasse-II-Moleküls führen (Jones et al., 2006). Die Eigenschaften dieser Ankerreste sind besonders interessant für die Strukturanalysen in engem Kontext mit der Entstehung und genetischer Disposition von Autoimmunerkrankungen.



Bei einem Vergleich der Strukturmodelle für die HLA-Isotypen DR mit DQ, ist eine bedeutende Übereinstimmung der strukturellen Gegebenheiten festzustellen. Dies lässt eine sehr ähnliche biologische, immunologische Aufgabe wie Antigenbindung, Homodimerisierung der Alpha- und Beta-Kette vermuten. Jedoch zeigen sich bei näherer Betrachtung der Sequenzen distinkte Bereiche, die zu einer unterschiedlichen Konformation führen. Diese sterischen Unterschiede könnten u.a. unterschiedliche Funktionen der Isotypen erklären (Paliakasis et al., 1996). Ein besonders auffälliger Unterschied liegt in der ersten Bindungstasche der Peptidbindegrube, die bei dem HLA-DQ-Isotypen polymorph ist. Dieser Unterschied führt zu einer unterschiedlichen Antigenpeptidselektion durch DQ-Moleküle.

### 2.2.2 Nomenklatur von HLA-Klasse-II-Molekülen

Die Nomenklatur eines Allels beschreibt den spezifischen HLA-Genort, die Familie, das Allel und letztlich das Suballel. Anhand der Nomenklatur können Unterschiede in der Primärsequenz bis hin zu stillen Mutationen nachvollzogen werden. Alle Klasse-II-Antigene werden mit dem spezifischen Kürzel „D“ versehen. Die Subregion bzw. Familie der Klasse-II-Moleküle wird durch einen zweiten Buchstaben charakterisiert. Die bisher beschriebenen Familien tragen die Bezeichnung DR, DQ, DP, DO und DM. Der dritte Buchstabe bezeichnet die jeweilige Untereinheit. „A“ steht für die Alpha-Peptiduntereinheit und „B“ für die Beta-Kette. Bei Vorhandensein mehrerer Gene für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette wird die Spezifizierung des Gens durch eine zusätzliche Zahl erreicht. Bisher sind für DQ-Moleküle jedoch nur „DQA1“ und „DQB1“ von Interesse, da DQA2 als ein Pseudogen deklariert wurde.

Aufgrund des sehr stark ausgeprägten Polymorphismus der HLA-Klasse-II-Antigene wird eine weitere Differenzierung vorgenommen. Um ein spezifisches Allel zu beschreiben wird hinter die Charakterisierung des Genortes ein „\*“ gesetzt. Anschließend folgt ein erstes Zahlenpaar, beginnend mit „01“. Diese Ziffern bezeichnen das Hauptmerkmal, die danach anschließenden beiden Ziffern beschreiben spezifische Untermerkmale auf der Codon-Ebene.

Nach diesem Nomenklatorsystem bezeichnet HLA-DRB1\*130102 den Genort des HLA-Komplexes, D steht für die Klasse-II-Moleküle, R beziffert die Isotypenzugehörigkeit und B1 steht für die  $\beta$ -Polypeptidkette (siehe Tabelle 2.1, Quelle: [www.ebi.ac.uk/imgt/hla/](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/)).

**Tabelle 2.1: Nomenklatur von HLA-Klasse-II-Molekülen**

Nomenklatur	Bedeutung
<b>HLA</b>	HLA-Region und Prefix für HLA-Gene.
<b>HLA-DRB1</b>	Ein spezieller HLA-Genort der Klasse II, Familie R und Subeinheit B1.
<b>HLA-DRB1*13</b>	Bezeichnung des Allels DR13.
<b>HLA-DRB1*1301</b>	Ein spezifisches Allel als ein HLA-Suballel von DR13 dargestellt.
<b>HLA-DRB1*130102</b>	Ein spezifisches Allel, dass sich durch eine stumme Mutation von DRB1*130101 unterscheidet.
<b>HLA-DRB1*13010102</b>	Ein Allel enthält eine Mutation im nicht-kodierenden Bereich.

### 2.2.3 Vererbung von HLA-Genen und Kopplungsungleichgewicht

Charakteristisch für das HLA-System ist die besonders hohe Anzahl an Genvarianten, den Allelen. Dieser Polymorphismus ist der umfangreichste des ganzen humanen Genoms. Jedes Individuum besitzt aufgrund des diploiden Chromosomensatzes zwei Chromosomen 6, wobei eines maternal (mütterlicherseits) und das andere paternal (väterlicherseits) vererbt wird. Da jeder Isotyp der HLA-Gene aus zwei Subtypen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette) besteht, liegt auf jedem Chromosom jeweils ein charakteristisches Allel für HLA-DQ $\alpha$  und HLA-DQ $\beta$  vor. Ein Heterodimer, bestehend aus den funktionellen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Subeinheiten, das aus den Genen nur eines Chromosoms hervorgeht, wird als Haplotyp bezeichnet. Der Begriff erklärt sich aus der Verknüpfung von „haploid“ und „Genotyp“ und geht auf den Immunogenetiker Ruggero Ceppellini zurück, der Beobachtungsstudien zu familiären Genotypen durchführte (Vandiedonk & Knight 2009). Jeder Mensch bekommt somit einen Haplotypen vom Vater (paternal) und einen Haplotypen von der Mutter (maternal) vererbt, beide zusammen werden als der Genotyp des Individuums bezeichnet (Müller, 2003; Penn, 2005). Eine beliebige Kombination aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette wird hingegen als Allotyp bezeichnet. Der Phänotyp eines Menschen setzt sich aus den HLA-Allelen zusammen, die molekularbiologisch bestimmt werden.

#### Bestimmung von Haplotypen

Für die Berechnung von Häufigkeitsverteilungen gibt es bestimmte Berechnungsmethoden. Zur Bestimmung der Phänotypfrequenz wird die Anzahl der für ein bestimmtes Merkmal positiven Individuen gezählt und durch die Gesamtzahl der untersuchten Individuen geteilt. Die einfachste Bestimmung der Genfrequenz beruht auf der folgenden Berechnung: Genfrequenz =  $1 - \sqrt{1/\text{Phänotypenfrequenz}}$ . Ein HLA-Phänotyp könnte beispielhaft folgendermaßen lauten: HLA-A1, A2, B7, B8, DRB1\*1501, \*0301, DQB1\*0602, \*0201. Für diesen Phänotyp ist der wahrscheinlichste Genotyp wie folgt zusammengesetzt:

Haplotyp: HLA- A1, B8, DRB1\*0301, DQB1\*0201  
Haplotyp: HLA- A2, B7, DRB1\*1501, DQB1\*0602

Bei einer entsprechend großen Stichprobe wurde eine Schätzmethode entwickelt, um aus der Phänotypenfrequenz die Haplotypenfrequenz abzuleiten. Nach dieser Schätzmethode können, aus einem gegebenen Phänotypen, die möglichen Genotypen abgeleitet werden (Gemsa et al., 1997).

Die exakte Bestimmung des Haplotypen eines Individuums kann nur in sogenannten Segregationsanalysen von HLA-Allelen in Familien bestimmt werden. Dies bedeutet, dass eine gekoppelte Vererbung der Allele desselben HLA-Genorts zu jeweils einem weiteren HLA-Allel eines anderen HLA-Genorts von jedem Elternteil bei mindestens zwei Kindern nachgewiesen werden muss. Die Kinder müssen sich dabei komplett in den ererbten HLA-Allelen unterscheiden (Müller, 2008).

Der heutige Goldstandard zur Bestimmung von Haplotypen findet sich unter den molekularbiologischen Methoden. Bei der Methode der AS-PCR (Allele specific Polymerase Chain Reaction) wird die genomische DNS amplifiziert. Dabei werden Primer verwendet, die spezifisch zum Ablesen nur eines von zwei möglichen Allelen entworfen wurden. Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Einsatz von somatischen Zellhybriden, mit deren Hilfe eine physikalische Trennung der beiden Chromosomen vorgenommen werden kann. Im Anschluss ist die Analyse eines Haplotypen des ganzen Chromosoms möglich (Crawford & Nickerson, 2005).

Aufgrund des hohen Aufwands und der hohen Kosten der molekularbiologischen Methoden erfolgt die Bestimmung von Haplotypen, ausgehend von den Genotyp-Daten in Populationsstudien mit großen Stichproben, durch statistische Schlussfolgerungen. Diese statistischen Rückschlussprogramme werden in drei Gruppen unterschiedlicher Algorithmen eingeteilt: Parsimony, Maximum Likelihood und Bayesian. Jedes Programm aus den einzelnen Gruppen hat Vor- und Nachteile, die entsprechend der gewünschten Zielparameter, angewendet werden (Crawford & Nickerson, 2005). Vergleiche zwischen den führenden Methoden zur Haplotypenbestimmung und empirisch bestimmten Haplotypenhäufigkeiten (durch Familienanalysen bestimmt) zeigen nur sehr geringe Abweichungen. Die Genauigkeit der unterschiedlichen statistischen Berechnungswege unterscheidet sich kaum. Jede vorkommende Haplotypenkombination mit einer Häufigkeit von über 1% in der Stichprobe (empirisch bestimmt) konnte auch anhand statistischer Berechnungsmethoden identifiziert werden (Adkins, 2004). Auch andere Untersuchungen zur Genauigkeit der Haplotypen-Softwareprogramme zeigten, dass eine genaue Bestimmung der Haplotypenfrequenz erst ab einer Häufigkeit von mind. 1% erreicht wird (Bettencourt et al., 2008). Die Möglichkeit seltene Haplotypen in großen Stichproben über rechnerische Wege zu identifizieren würde jedoch bei der Aufklärung des Zusammenhangs von Prädispositionen bestimmter Erkrankungen weiterhelfen. Die Zuordnung der Haplotypen zu bestimmten Individuen ist dabei abhängig von der Anzahl der heterozygoten SNP's (Single Nucleotid Polymorphism) und liegt zwischen 80 – 90% (Adkins, 2004).

### Definition eines Kopplungsungleichgewichts

Die Gene eines Haplotypen tragen gleichermaßen zur Entwicklung des Phänotyps bei, da die Gene kodominant korrespondierend exprimiert werden (Klein, 2000). Dies bedeutet, dass aus zwei unterschiedlichen Haplotypen, die aus jeweils einer DQ $\alpha$ - und einer DQ $\beta$ -Kette bestehen, vier unterschiedliche Heterodimere exprimiert werden können.

Rekombination ist ein Prozess, der dafür sorgt, daß neue Kombinationen von Allelen in Nachkommen entstehen. Während der Meiose kann es zum Austausch von genetischem Material zwischen Chromosomen kommen. Dabei entstehen an beiden Strängen Brüche, die überkreuz wieder verknüpft werden und rekombinieren („Crossing Over“). Dabei können Gene eines Chromosoms auch voneinander getrennt werden („Entkopplung“). Laut dem Mendel'schen Vererbungsgesetz der meiotischen Rekombination kann ein Crossing Over nur unter der Voraussetzung entstehen, dass es sich bei der räumlichen Verteilung von Crossing Overs entlang zweier homologer Chromosomen um einen zufallsbestimmten biologischen Prozess handelt. Je näher zwei Gene beieinander liegen, desto seltener werden sie getrennt. In diesem Fall wird von der Kopplung dieser Gene gesprochen.

In Assoziationsstudien wurden sogenannte Kopplungsungleichgewichte nachgewiesen. Diese werden zumeist definiert als das überzufällige Auftreten zweier Allele von zwei gekoppelten Genorten innerhalb einer Population. Kopplungsungleichgewichte treffen in der klinischen Relevanz auf die HLA-Antigene zu (Krawczak, 2003).

Die Vererbung des HLA-Komplex erfolgt überwiegend in zusammenhängenden Abschnitten. Es wird in diesem Zusammenhang von einer „en bloc“-Vererbung gesprochen. Somit wird z.B. das Segment von HLA-B bis HLA-DQ fast immer als ganzes Segment an die nächste Generation weitergegeben.

Somit ist es nicht verwunderlich, dass die theoretisch errechnete Zufallsfrequenz von Allelen in einem Haplotyp nicht mit Beobachtungen in verschiedenen Populationen übereinstimmen. Hingegen zeigt sich, dass ganz spezifische Allele in Haplotypen häufiger gekoppelt vererbt werden. Dieses Phänomen wird als *Kopplungsungleichgewicht* bezeichnet und wird in der Literatur als „ $\Delta$ -Wert“ angegeben (Begovich et. al, 1992; Vandiedonk & Knight, 2009).

Als Beispiel kann die Verteilung der HLA-Allele A1 und B8 herangezogen werden. Die Genfrequenz des HLA-A1-Allels in der europäischen Bevölkerung liegt beispielsweise bei 16%, die des HLA-B8-Allels bei zehn Prozent. Die Wahrscheinlichkeit, dass beide Allele gekoppelt in einem Haplotyp vorkommen ergibt sich rein rechnerisch durch das Produkt der beiden Genfrequenzen:  $0,16 \times 0,10 = 0,016$  Prozent (1,6 %).

Die tatsächlich ermittelte Häufigkeit dieser Allelkombination auf einem Chromosom hat jedoch, abweichend von den rechnerisch ermittelten 1,6%, einen Wert von 8,8%. Bei Übereinstimmung dieser Werte würde man von einem Gleichgewicht sprechen. Da jedoch ein Deltawert von 7,2 Prozentpunkten bestimmt werden konnte herrscht hier ein Ungleichgewicht in der Verteilung der verschiedenen Kombinationen. Aufgrund des

Kopplungsungleichgewichts gibt es sehr viel weniger verschiedene HLA-Kombinationen, als theoretisch zu erwarten wäre. In der Praxis profitiert besonders die Suche nach einem geeigneten Spender im Falle einer notwendigen Organtransplantation von dieser Verteilung (van den Tweel, 1999).

Beeinflusst wird ein Kopplungsungleichgewicht durch evolutionäre Faktoren wie Mutation, Genetischer Drift, Migration, Selektion und Genfluss. Entscheidend für die Stabilität eines Kopplungsungleichgewichts ist die Rekombinationsrate.

Allgemein gilt, dass zwei Genorte entweder sehr eng gekoppelt oder die Selektion sehr stark sein muss, damit ein Ungleichgewicht stabil existieren kann. Als Beispiel aus dem Tierreich soll die verbreitete Landschnecke *Cepaea nemoralis* dienen. Die Genorte für die Merkmale der Färbung des Gehäuses sowie für das Bandenmuster sind eng miteinander gekoppelt und zeigen in den meisten Populationen keine Rekombination, was ein Zeichen für die sehr starke Selektion sein kann. Eine natürliche Selektion ist dabei zumeist an den Überlebens- oder Reproduktionserfolg eines Individuums gekoppelt. Die genetische Drift hingegen bezeichnet eine zufällige Veränderung der Genfrequenz innerhalb des Genpools einer Population.

Bei Migration wird das Kopplungsungleichgewicht durch die Durchmischung zweier Populationen mit unterschiedlichen Genen entstehen. Dabei ist die Höhe des Ungleichgewichts stark von den Unterschieden der Genhäufigkeiten der ursprünglichen Populationen abhängig. Der entscheidende Faktor ist jedoch die Rekombinationsrate und somit die Vermischung des Erbgutes.

### **2.3 Antigenprozessierung durch MHC-Klasse-II-Moleküle**

HLA-Klasse-II-Moleküle werden in Abwesenheit inflammatorischer Stimuli nur von wenigen Zelltypen exprimiert, die in diesem Zusammenhang als antigenpräsentierende Zellen (APC) bezeichnet werden. Weiterhin sind einige wenige Zelltypen bekannt, die andere Aufgaben im Organismus erfüllen, aber bei gegebener Stimulation ebenfalls die Fähigkeit der Klasse-II-Expression besitzen. Als Beispiel für diese Zellgruppe sind die Epithelzellen der Lunge oder Endothelzellen zu benennen, die aufgrund ihrer genannten Eigenschaften als nicht professionelle antigenpräsentierende Zellen bezeichnet werden (Zelle, 1990).

Für ein funktionierendes Immunsystem sind HLA-Klasse-II-Moleküle unerlässlich. Ihre Hauptfunktion, Peptide aus antigenen Strukturen zu binden und diese auf der Zelloberfläche zu präsentieren, gewährleistet den Kontakt zu den T-Zellen. Durch diesen Vorgang kann der Organismus Zellen unterscheiden, die entweder körpereigene bzw. körperfremde Peptide beinhalten. Die Kommunikation der Klasse-II-Moleküle mit T-Helferzellen führt einerseits zur Einleitung einer Immunantwort durch Stimulierung der

CD4<sup>+</sup>-Zellen, andererseits wird dieser Kontakt auch zur Ausreifung von T-Zellen genutzt (Müller, 2003). Als Schlüsselreaktionen werden für die Verbindung zwischen Zelle und Immunsystem einerseits die Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche, aber auch ihre Voraussetzung, die Antigenprozessierung innerhalb der Zellorganellen, gesehen. Ist ein Peptid auf eine entsprechende Größe geschnitten, so ist die Aufnahme an die jeweilige Struktur der Peptidbindegrube eines HLA-Heterodimers gekoppelt. Eine Peptidbindegrube wird jeweils durch die Alpha-, aber auch durch die Beta-Untereinheit eines HLA-Moleküls geformt. Nur die Isotypen DP, DR, DM und DQ sind in der Lage, beide Ketten der HLA-Antigene zu kodieren und somit eine Antigenbeladung zu gewährleisten (Bodmer et al., 2003).

### **2.3.1 Zusammenbau der MHC-Klasse-II-Moleküle im Endoplasmatischen Retikulum**

Die Kombination aus Alpha- und Beta-Kette ist entscheidend für die Bindung des spezifischen Antigens. Der Zusammenbau der beiden Untereinheiten findet dabei innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Nach der Translation werden innerhalb des Prozesses der Translokation die N-terminalen Signalpeptide abgeschnitten und die Moleküle erhalten die ersten kohlenhydratspezifischen Modifikationen (Cresswell, 1994).

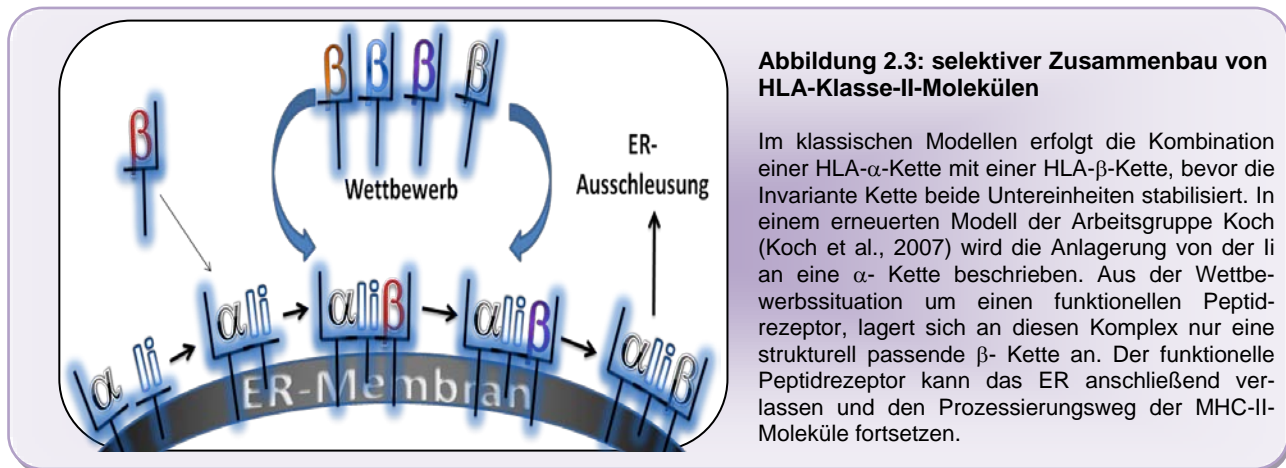
Für den eigentlichen Prozess der Bildung eines Heterodimers aus den Subeinheiten spielt ein drittes nicht-polymorphes Molekül eine wichtige Rolle, die Invariante Kette (Ii). Die Invariante Kette ist ein 30 kD schweres Glykoprotein, welches die Plasmamembran der Zelle mit einer Transmembrandomäne von 26 AS durchdringt. Ein kurzer, aminoterminaler Teil des Proteins (30 AS) befindet sich auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Der kohlenhydratmodifizierte, carboxyterminale Abschnitt ist auf der extrazytoplasmatischen Seite der Membran zu finden. Durch unterschiedliches Spleißen der RNA können zwei differenzierte Formen entstehen: Ii33 und Ii41. Letztere besitzt 64 zusätzliche Aminosäuren carboxyterminal, die funktionell als Proteaseinhibitordomäne beschrieben wird (Bevec et al., 1996). In verschiedenen Zelltypen kann das Verhältnis beider Isoformen abweichen. Eine weitere Variante der Ii33 entsteht durch einen alternativen Startpunkt der Translation, die die Ursache für 16 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus darstellt. Diese Isoform wird als Ii35 bezeichnet (Cresswell, 1994).

Die wichtigste Funktion der Invarianten Kette wird in ihrer Chaperonfunktion gesehen, wobei die korrekte Faltung eines HLA-Klasse-II-Moleküls unterstützt und stabilisiert wird (Koch et al., 2007). Zu diesem Zweck lagern sich jeweils drei Proteine Ii nach ihrer

Synthese im ER zu einem sogenannten Trimer zusammen. Es wird in diesem Zusammenhang von Trimerisierung der Invarianten Kette gesprochen. Das Trimer wird in einem folgenden Prozess erweitert, indem HLA-Klasse-II-Peptide, bestehend aus  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette, gebunden werden, so dass ein li-HLA-Komplex entsteht (Anderson & Miller, 1992; Romagnoli et al., 1994) Aktuell wird über die Stöchiometrie dieses Komplexes diskutiert.

Große Bedeutung bei der Stabilisierung von HLA-II-Molekülen spielt die CLIP-Region (CLIP = for class II-associated invariant chain peptide) der Invarianten Kette. Die CLIP-Region ist ein Peptidabschnitt, der durch die Aminosäuren 81 und 105 von der li33 begrenzt wird. CLIP bindet überwiegend in der Peptidbindegrube des Heterodimers, wodurch die Stabilisierung des Komplexes ermöglicht wird (Stern et al., 1994). CLIP hat weiterhin die Aufgabe, eine frühzeitige Peptidbindung des Heterodimers zu verhindern (Riberdy et al., 1992; siehe Abschnitt 2.3.2).

Vor der Bildung dieses li-HLA-Komplexes und kurz nach der Translation der Proteine liegen die HLA-Klasse-II-Moleküle in Komplexen mit einem ER-spezifischen Chaperon BIP vor, bevor sie mit Hilfe eines weiteren Chaperons, Calnexin, in li-HLA-II-Komplexe übergehen. Die Tatsache, dass die Assoziation von einzelnen HLA-Molekülen und li mit Calnexin nur vor der Ausbildung des li-HLA-Komplexes gefunden wurde, beweist, dass dieses Chaperon eine entscheidende Bedeutung bei der Bildung des li-HLA-Komplexes besitzt (Marks et al., 1995; Cresswell, 1994). Zur Beantwortung der Frage nach dem genauen Ablauf der Entstehung eines funktionellen Peptidrezeptors aus den beiden Untereinheiten mit Hilfe der Invarianten Kette müssen heutzutage zwei unterschiedliche Modelle genauer betrachtet werden. Im klassischen Modell wird zunächst die Assoziation der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette beschrieben, die erst als Dimer an den trimerisierten li-Komplex binden. Der li-Klasse-II-Komplex verlässt anschließend das ER, um in den Antigenprozessierungsweg einzutreten (Cresswell, 1994).



Die Arbeitsgruppe Koch et al. publizierte 2007 ein komplexeres Modell (siehe Abbildung 2.3). Darin wird die Anlagerung der  $\alpha$ -Untereinheiten mit der Invarianten Kette beschrieben. Erst in einem folgenden Schritt wird selektiv eine passende  $\beta$ -Kette zu

dieser Matrix hinzustoßen, um den li-HLA-Komplex zu bilden. Hintergrund ist, dass bei der Vielzahl der existierenden Kombinationsmöglichkeiten nur solche selektiv das ER verlassen, die funktionell in Lage sind, Antigene zu binden. Es ist demnach davon auszugehen, dass spezifische Kombinationen aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur nicht zueinander passen und die  $\beta$ -Kette solange ausgetauscht wird bis ein passendes Gegenstück zur  $\alpha$ -Untereinheit gefunden ist (Koch et al., 2007).

### 2.3.1 Intrazelluläre Transportrouten von HLA-Klasse-II-Dimeren

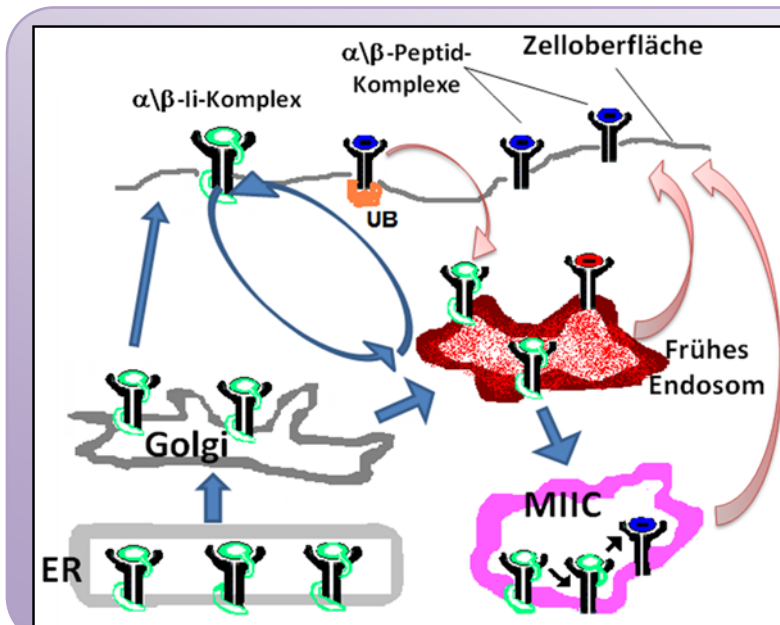
Ausgehend vom Endoplasmatischen Retikulum werden Klasse-II-Dimere im Komplex mit der Invarianten Kette ausgeschleust. Die Heterodimere gelangen auf verschiedenen Wegen zur Zelloberfläche, wo sie ihrer Funktion der Peptidpräsentation nachkommen. Voraussetzung für diese Peptidpräsentation ist es, dass die HLA-II-Komplexe in den endozytotischen Prozessierungsweg eingeschleust werden. Die eigentliche Peptidbeladung der  $\alpha/\beta$ -Komplexe erfolgt dabei in sogenannten MIIC-Komplexen (MHC-Klasse-II-beinhaltenes Kompartiment), welche zum späten endosomalen Kompartiment gezählt werden (Rocha & Neefjes, 2007).

MIIC-Kompartimente werden mit unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften wie multivesikular, multilamellar oder einer Kombination aus beiden Formen beschrieben (Kleijmeer et al., 1997). Die multivesikulären MIICs (MVB) haben einen Durchmesser von 400 – 500 nm und schließen internalisierte Vesikel eines Durchmessers von 40 – 90 nm ein. Üblicherweise werden sie zum späten endosomalen Kompartiment gezählt und kommen relativ ubiquitär in der Zelle verteilt vor (Stern et al., 2006). Die multilamellären MIICs (MLB) werden hingegen zum lysosomalen Kompartiment gezählt und unterscheiden sich in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung. Im Vergleich zu den multivesikulären MIIC-Vesikeln kommen sie nur in sehr distinkten Bereichen der Zelle vor. Aufgrund der differenzierten Eigenschaften dieser Zellorganellen wird eine unterschiedliche Funktion für die Beladung der Klasse-II-Dimere vermutet, die sich auf unterschiedlichen pH-Werten und der lokalen Konzentration von HLA-DM-Molekülen begründet (Stern et al., 2006).

Ausgehend von der Bildung der ubiquitär verteilten MVBs wurde ein Modell der effektiven Peptidpräsentation auf der Zelloberfläche entwickelt. Dabei ist bekannt, dass bereits 200 bis 300 peptidbeladene HLA-Moleküle (dies entspricht 0,002 – 0,006 % aller Klasse-II-Komplexe auf der Zelloberfläche einer antigenpräsentierenden Zelle) ausreichen, um eine Immunantwort hervorzurufen (Demotz et al., 1990). Weiterhin verstärkt wird die Effektivität in der Antigenpräsentation vermutlich durch die



Organisation von diskreten Mikrodomänen an der Zelloberfläche, in denen Klasse-II-Moleküle gehäuft auftreten und die Peptidfragmente desselben Antigens präsentieren. Um zu gewährleisten, dass diese HLA-Moleküle zu einem distinkt abgegrenzten Mikrodomänenbereich transportiert werden, wird das Vorhandensein von bestehenden mikrotubulären Transportrouten genannt. Anhand dieser Routen werden zielgerichtete tubuläre Vesikel geformt, die entlang dieser Transportwege die spezifischen Areale der Zellmembran erreichen (Boes et al., 2004). Beobachtungen zeigten dabei eine Start-Stop-Bewegung in bidirektionaler Transportrichtung, wofür die Hilfe von spezifischen Motorproteinen erforderlich ist. Das Hilfsprotein Dynein ermöglicht den Transport von der Zelloberfläche in die Zentren des mikrotubulären Systems, hingegen ist Kinesin für den Transport zur Zellmembran verantwortlich (Wubolts et al., 1999). Zur weiteren Aufklärung der intrazellulären Transportrouten der  $I\alpha/\beta$ -Komplexe auf ihrem Weg zu den MIIC-Kompartimenten muss zunächst der Durchgang der Peptidrezeptoren durch den Golgi Komplex erwähnt werden, in dem verschiedene Glykosylierungsschritte die Reifung der Kohlenhydrate fördern. Ausgehend vom trans-Golgi-Netzwerk werden unterschiedliche Transportwege beobachtet (s. Abbildung 2.4). Zur genaueren Bestimmung der intrazellulären Transportroute wurden Inhibitoren des Transportes von frühen Endosomen zum späten endosomalen Kompartiment eingesetzt. Als Ergebnis zeigte sich nur eine geringe Beeinflussung der HLA-Klasse-II-Moleküle auf dem Weg zum lysosomalen Kompartiment, so dass ein direkter Transport der Heterodimere vom trans-Golgi zu den MIIC-Vesikeln wahrscheinlich ist (Benaroch et al., 1995).



**Abbildung 2.4: Transportroute von HLA-Klasse-II-Dimeren zwischen ER und Zellmembran**

$I\alpha$ -Klasse-II-Moleküle verlassen den trans-Golgi in zwei verschiedene Richtungen. Der größte Anteil wird in frühe Endosomen sortiert. Andere  $\alpha/\beta$ - $I\alpha$ -Komplexe werden zur Zellmembran transportiert. Zwischen Zelloberfläche und den frühen Endosomen herrscht ein ständiger Austausch der Peptidrezeptoren. Von dem frühen endosomalen Kompartiment können die  $I\alpha$ -Peptidrezeptoren zu MIIC-Kompartimenten geleitet werden. Hier erfolgt die eigentliche Antigenprozessierung. Im Anschluss werden die peptidbeladenen Rezeptoren auf der Zellmembran präsentiert. Eine Ubiquitin-Markierung (Ub) der peptidbeladenen MHC-II-Dimere führt zur Internalisierung in die frühen Endosomen, wo es zur Peptidbeladung kommt.

Ein zweiter Weg führt, ausgehend vom Golgi-Apparat, zu einer direkten Transportroute der  $I\alpha/\beta$ -Komplexe auf die Zelloberfläche. Die dort lokalisierten Klasse-II-Moleküle dienen dabei als ein Speicher zur besonders schnellen Bereitstellung von funktionellen HLA-Peptidrezeptoren im endosomalen Kompartiment. Die Heterodimere werden über

einen Clathrin-vermittelten Internalisierungsprozess von der Zelloberfläche in die Zelle abgeschnürt und gelangen in das frühe endosomale Kompartiment. Hintergrund für diese Internalisierung ist ein Di-Leucin-Endozytose-Motiv, das in der cytosolischen Region der Invarianten Kette lokalisiert liegt (Roche et al., 1993). Die frühen Endosomen werden als eine Zwischen- und Verteilungsstation für die li-HLA-Moleküle genutzt. Der Hauptanteil der Klasse-II-Peptide erreicht die frühen Endosomen ausgehend vom trans-Golgi. Von den Vesikeln der frühen Endosomen können die Peptide zwischen Zelloberfläche und endosomalem Kompartiment in einem Kreislauf ihre Lokalisierung ständig verändern. Unabhängig der jeweiligen Lokalisierung wird jeder MHCII-li-Komplex von den frühen Endosomen in Richtung des lysosomalen Kompartiments transportiert. Ziel ist die Aufnahme eines entsprechenden Peptidfragments in einem MIIC, um dieses potentielle Pathogen auf der Zelloberfläche den T-Helferzellen zu präsentieren (Hiltbold & Roche, 2002).

Ergänzend zu den genannten Transportrouten der unreifen li- $\alpha/\beta$ -Komplexe können reife und peptidbeladene  $\alpha/\beta$ -Komplexe von der Zelloberfläche internalisiert werden und es kommt zu einem sowohl HLA-DM abhängigen, als auch unabhängigen Austausch der antigenen Peptide (Hiltbold & Roche, 2002). Das Internalisierungssignal kann durch Prozesse wie Ubiquitylierung der Klasse-II- $\beta$ -Kette am cytoplasmatischen Ende bestimmt werden (Rocha & Neefjes, 2007). Dabei wird ein konservierter Lysinrest an Position 225 über MARCH I- und MARCH VIII- Ubiquitinligasen mit Ubiquitin verbunden. Im Vergleich zu der Clathrin-unabhängigen Endozytose der li-HLA-Komplexe werden diese beladenen  $\alpha/\beta$ -Heterodimere clathrinabhängig internalisiert (Shin et al., 2006).

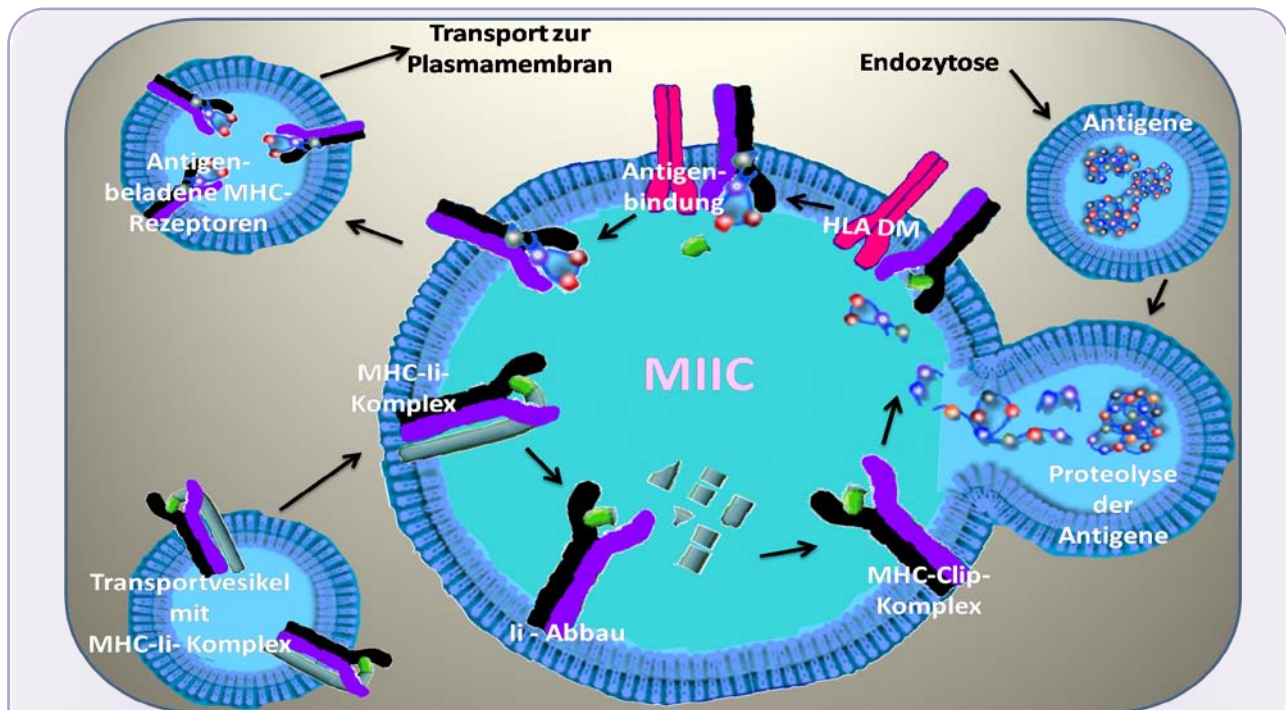
### **2.3.2 Antigenpräsentation: der Klasse-II-Prozessierungsweg**

Zur Peptidpräsentation durch MHC-Klasse-II-Moleküle auf der Zelloberfläche müssen Antigene zunächst durch Proteasen in kleinere Fragmente gespalten werden. Eine wichtige Rolle scheint das Enzym AEP (Asparaginy Endopeptidase) bei der Peptidzerkleinerung zu spielen (Manoury *et al.*, 1998). Weiterhin beteiligt sind Enzyme der Cathepsin-Familie. Dazu gehören die Enzyme Cathepsin B, Cathepsin E (Nishioku *et al.*, 2002) und für einige Antigene auch Cathepsin L und S (Hsieh *et al.*, 2002). Die Spaltung von Disulfidbrückenbindungen wird dabei durch die Aktivität von GILT (Gamma-Interferon-Inducible-Lysosomal-Thiolreductase) ermöglicht, was eine Voraussetzung für die Zugänglichkeit der übrigen Enzyme darstellt. Die in den endosomalen Kompartimenten jeweils vorzufindenden Proteasen, der herrschende pH-Wert und das Reduktionspotential nehmen einen großen Einfluss auf die resultierende Antigenprozessierung. Sie geben einen jeweils unterschiedlichen Prozessierungsweg vor. So

können aus ein- und demselben Antigen viele verschiedene zu präsentierende Peptidfragmente entstehen (Watts, 1997).

Desweiteren wird auch ein Einfluss der Invarianten Kette (Ii41) für die Proteolyse der Peptide vermutet, da die Isoform Ii41 Homologien zur Cystatin-Familie der Protease-Inhibitoren besitzt (Bevec et al., 1996).

Der Prozess, in dem die entstehenden Peptidfragmente auf die Klasse-II-Rezeptoren geladen werden, findet in den MIIC (MHC-II-Beladungskompartiment) statt, in denen es nicht nur die HLA-Moleküle in großer Vielfalt gibt, sondern auch spezifische Hilfs- und Adapterproteine (Stern et al., 2006; siehe Abbildung 2.5). Das Vorkommen dieser Helfer konnte jedoch auch außerhalb der MIIC's nachgewiesen werden, was eine Peptidbeladung der HLA-II-Moleküle auch in anderen Kompartimenten wie den frühen Endosomen oder der Zelloberfläche ermöglicht (Robinson & Delvig, 2002).



**Abbildung 2.5: Antigenbeladung eines MHC-II-Rezeptors**

Nach dem funktionellen Zusammenbau eines Klasse-II-Peptidrezeptors wird dieser im Golgi-Komplex an seiner Kohlenhydratstruktur modifiziert. Die Beladung eines MHC-Moleküls mit einem Antigen erfolgt in einem sogenannten „MIIC-Kompartiment“. Durch Mitwirkung von Proteasen wird die Invariante Kette proteolytisch zerlegt. Unter Einfluss eines Moleküls HLA-DM wird die Bindungsgrube des Rezeptors von dem Ii-Fragment CLIP befreit und ein Peptid kann gebunden werden. Ein beladener MHC-Peptid-Komplex wird zur Plasmamembran der Zelle transportiert, wo der Informationsaustausch mit einem T-Zell-Rezeptor erfolgt.

Zur Vorbereitung der Ii-HLA-II-Moleküle auf die Bindung eines Peptids, erfolgt der schrittweise Abbau der Invarianten Kette, die in der Peptidbindegrube eine Interaktion von Antigen und HLA-Molekül verhindert. Die Proteasen Cathepsin S und L sind hauptverantwortlich für die stufenweise Verkürzung von der Ii bis nur noch das CLIP-Fragment in der Peptidgrube verbleibt. Der Austausch von CLIP gegenüber einem antigenen Peptid erfordert

die Voraussetzungen eines niedrigen pH-Wertes, der proteolytischen Verkürzung des CLIP-Peptids, sowie die Anwesenheit des Hilfsproteins HLA-DM (Mosyak et al., 1998). Das DM-Molekül stabilisiert den Komplex aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Subeinheit in Abwesenheit eines Peptids und unterstützt somit den Peptidaustausch. HLA-DM wird als Editor für die Beladung mit spezifischen Proteinen beschrieben, da es die passenden Peptidfragmente aus dem Gesamtpertoire herausfiltert (*Kropshofer et al., 1996*). Die Annäherung und der Peptidaustausch findet dabei nicht auf der limitierenden Membran der MIIC-Vesikel statt, sondern ist aufgrund der multivesikulären Struktur dieser im Inneren der MIIC lokalisiert (Zwart et al., 2005).

Nach erfolgreicher Beladung der HLA-II-Moleküle mit hochaffinen Peptidfragmenten werden diese in eine noch stabilere Struktur überführt. Im Anschluss findet der in Abschnitt 2.3.1 beschriebene Transport zur Zelloberfläche statt, wo die Schnittstelle mit dem Immunsystem (genauer: den entsprechenden T-Zellen) erfolgt.

## **2.4 Zusammenhang zwischen HLA-Genen und Erkrankungen**

### **2.4.1 Krankheitsassoziiertes HLA-Polymorphismus**

Variationen innerhalb des HLA-Komplexes, wie beispielsweise Punktmutationen oder Deletionen, sind verantwortlich für monogenetische Erkrankungen, wie z.B. Hämochromatosis oder kongenitale adrenale Hyperplasie. Jedoch weitaus signifikanter ist der Zusammenhang zwischen dieser Region des humanen Genoms und häufigen multifaktoriellen Erkrankungen. Erste Hinweise auf diesen Zusammenhang zeigten sich in den 70er Jahren zwischen HLA-Antigenen und Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis (Vandiedonk & Knight, 2009). Somit wird die Assoziation mit dem Genort des HLA-Systems als Charakteristikum zur Beschreibung einer Autoimmunerkrankung herangezogen. Autoimmunerkrankungen können dabei in organspezifische und systemische, also den gesamten Organismus betreffende, Erkrankungen unterteilt werden. Beispiel für eine systemische Erkrankung ist die rheumatoide Arthritis im Gegensatz zum Diabetes mellitus Typ1. Bei letzterer Erkrankung kommt es, aufgrund einer fehlgesteuerten Immunantwort, zur Selbstzerstörung eines einzelnen Organs, was letztlich zu einem Insulin- und Enzymmangel führt (Heard, 1994).

Es ist bekannt, dass verschiedene Allele eine positive oder auch negative Korrelation mit den Autoimmunerkrankungen aufweisen. Dies bedeutet, dass es positiv, aber auch negativ korreliertes Auftreten bestimmter Allele mit Erkrankungen gibt. Daraus

resultierend werden verschiedene Allele als protektiv (negative Korrelation) gegenüber verschiedenen Erkrankungen beschrieben bzw. als risikofördernd (positive Korrelation). Weiterhin ist bekannt, dass mehrere Allele, je nach ihrer Primärsequenz, für eine Erkrankung entweder protektiv oder aber positiv korreliert sein können (Weyand et al., 1995). Die Stärke der Assoziation wird als relatives Risiko angegeben. Dieser Index gibt einen Faktor an, mit dem ein Träger eines bestimmten Allels die entsprechende Erkrankung im Vergleich zu einer anderen Kontrollperson bekommen wird, die dieses Merkmal nicht besitzt.

Beispielhaft soll hier die Korrelation zwischen HLA und Morbus Bechterew (MB) beschrieben werden. Die Assoziation zwischen HLA-B27 und der Prädisposition für MB ist eine der stärksten bekannten HLA-assoziierten Erkrankungen. Zwischen 90 – 95% der Patienten mit MB sind positiv auf HLA-B27 getestet, wohingegen weniger als 10% der gesunden Bevölkerung dieses Gen trägt (relatives Risiko > 100). Dabei ist die Unterscheidung des spezifischen Allotypen des HLA-B27 Gens entscheidend für die Prädisposition dieser Erkrankung. Die Allele HLA-B\*2705, \*2704 und \*2702 sind mit der Erkrankung assoziiert, wohingegen die Allele B\*2709 und B\*2705 keine Korrelation mit MB aufzeigen (Marcilla & Lopez de Castro, 2008).

Bis heute ist die Ursache und der Wirkmechanismus für die Beziehung zwischen HLA-System und Erkrankung nicht letztendlich aufgeklärt. Im Folgenden sind die in der Literatur beschriebenen Hypothesen kurz beschrieben:

Der Hypothese der „Molekularen Mimikry“ liegt eine strukturelle Ähnlichkeit der Epitope von pathogenen und körpereigenen Antigenen zu Grunde. Dabei kann eine Immunreaktion gegen körperfremde Organismen eingeleitet werden, die aufgrund einer Kreuzreaktion mit den Selbstantigenen zur Zerstörung von körpereigenen Geweben führt (Taylor et al., 2009).

Bei der Theorie der „klonalen Deletion“ hingegen wird eine fehlerhafte T-Zellreifung im Thymus vermutet. Anstatt autoreaktive T-Zellen zu eliminieren, kann es aufgrund einer unvollständigen Deletion zur Fehlerkennung von körpereigenen Geweben kommen; eine Autoimmunerkrankung ist die Folge (Oshima et al., 2007).

Im Falle einer „T-Zell-Restriktion“ sind HLA-Moleküle nicht in der Lage das „normale“ Repertoire von Peptiden an der Zelloberfläche zu präsentieren, um die Immunkaskade über die T-Zellen einzuleiten. Bestimmte Peptide werden in diesem Fall nicht an der Oberfläche präsentiert, mit der Folge einer Immunsuppression. Eindringende Pathogene und Mikroorganismen können somit ungehindert zur Schädigung der betroffenen Gewebe führen.

Eine letzte Hypothese beschreibt eine „indirekte Beteiligung der HLA-Allele“ über eine genetische Kopplung. Der eigentliche Faktor für die Auslösung der Erkrankung sind dabei andere Gene, die jedoch mit den HLA-Genen gekoppelt vererbt werden. Umso geringer der Abstand zwischen den Genen auf dem jeweiligen Chromosom ist, desto wahrscheinlicher ist die zusammenhängende Vererbung. Die krankheitsassoziierten Gene werden als Suszeptibilitätsgene bezeichnet.

## 2.4.2 HLA-DQ-Moleküle und Autoimmunerkrankungen

Eine besondere Stellung hinsichtlich der Korrelation zwischen HLA-Genen und einer Erkrankung nimmt vor allem der Isotyp DQ ein. Grundsätzlich unterscheidet sich HLA-DQ von den anderen Isotypen in der Expression der Moleküle. Die allgemeine Expressionsrate von DQ-Molekülen ist im Normalfall geringer als die von DR (Robbins, 1988). Eine Ausnahme von dieser Regel findet sich dabei im Thymus (Ishikura, 1987). Dabei wird sowohl ein Polymorphismus in einer transkriptionellen Kontrollregion von DQ $\alpha$  und DQ $\beta$  als Ursache vermutet, aber auch ein spezifischer post-transkriptioneller Regulationsmechanismus wurde bereits beschrieben (De Lerma Barbro, 1994).

Narkolepsie gehört zu den chronisch neurologischen Erkrankungen, die sich durch die Symptome der exzessiven Schläfrigkeit über Tage und mit Schlafstörungen während der Nachtruhe beschreiben lässt. Der einzige genetische Risikofaktor, der bisher identifiziert wurde, ist das HLA-Allel DQB1\*0602, das 90 - 100% der Patienten besitzen. Hingegen gilt das Allel HLA-DQB1\*06011 als protektiv, so dass in der strukturellen Ausrichtung beider Proteine der Unterschied zu finden ist, ob ein Individuum erkrankt oder gar vor Narkolepsie geschützt ist (Jones et al., 2006). Bei der Analyse der strukturellen Gegebenheiten zwischen DQ6.1 und 6.2 ist der größte Unterschied in der Peptidbindetasche P4 in den Aminosäureresten 13 $\beta$  und 26 $\beta$  zu finden (siehe Abbildung 2.6). Aufgrund dieses Polymorphismus wird die Tasche P4 im DQ6.1 Allel verschlossen, was zu einer sterischen Blockade der Bindung eines Peptids führen kann. Laut strukturbasierten Analysen kann solch eine Differenzierung der Peptidbindung und somit der Auswahl des Peptids Auslöser für die negative und positive Assoziation eines Allels mit Narkolepsie sein (Siebold et al., 2004).

Die Zöliakie (einheimische Sprue) gehört zu den Autoimmunerkrankungen des Dünndarms und wird durch das Antigen Gliadin, einem Klebereiweiß aus Getreide, ausgelöst. Als Symptome sind Durchfälle, Mangelernährung und Malabsorption sowie Wachstumsstörungen beschrieben. 90% der Patienten mit einheimischer Sprue besitzen das HLA-Allel DQ2 (DQA1\*0501/DQB1\*0201) und 5% sind HLA-DQ8 (DQA1\*0301/DQB1\*0302) positiv (Sollid et al., 1989). DQ2 und DQ8 haben beide eine erhöhte Affinität diverse Glutenpeptide aufzunehmen. Eine Präsentation dieser Glutenpeptide an der Oberfläche führt über glutenreaktive CD4<sup>+</sup>-Zellen zur Auslösung einer Entzündungsreaktion (van de Wal et al., 1998). Die Gliadin-Antigene sind reich an Prolin- und Glutamat-Aminosäureresten. Nach Analyse der Struktur von HLA-DQ2 zeigte sich, dass in den Peptidbindetaschen P4, P6 und P9 der  $\beta$ -Kette die strukturellen Voraussetzungen liegen, um die Glutamat-Seitenketten des Gluten-Antigens zu binden (Stepniak et al., 2008). Verantwortlich für diese sterischen Möglichkeiten des DQ2 ist der Polymorphismus an den Positionen Ser30 $\beta$  anstelle von Tyr30 $\beta$  und Lys71 $\beta$  anstelle von Thr71 $\beta$  bei HLA-DQ8 (Jones et al., 2006).

DQ8 hat im Vergleich zu DQ2 eine verminderte Affinität zu Gluten, da nur P9 eine ähnliche Affinität zu Gliadin herstellen kann. Desweiteren unterscheidet sich DQ2 in

dem Aminosäurerest  $\alpha 53$  in der Peptidbindetasche P1, der im Unterschied zu DQ8 deletiert ist. Diese Deletion ermöglicht die Bindung eines Prolinrestes des Gliadins ohne Behinderung durch eine Wasserstoffbrückenbindung (Caillat-Zucman, 2008).

Pocket	P4		P6			P9		
Residues	13 $\beta$	26 $\beta$	9 $\beta$	30 $\beta$	66 $\alpha$	37 $\beta$	38 $\beta$	57 $\beta$
<u>DQ</u>								
0602	G	L	F	Y	A	Y	A	D
0302	G	L	Y	Y	L	Y	A	A
0604	G	L	Y	H	A	Y	A	V
06011	A	Y	L	Y	A	D	V	D

**Abbildung 2.6: Polymorphismus von HLA-DQ und Autoimmunerkrankungen**

Je nach Besetzung der polymorphen Reste von HLA-DQ $\beta$  lässt sich ein Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen herstellen. Die hier aufgelisteten AS-Reste und ihre Lage in den spezifischen Bindetaschen der Peptidgrube werden in der Abbildung unter Berücksichtigung des Polymorphismus dargestellt. Die Allele 0602, 0302, 0604 und 06011 erhöhen das relative Risiko an einer spez. Autoimmunerkrankung zu erkranken.

Der insulinabhängige Diabetes mellitus Typ 1 (T1D) ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der die Beta-Zellen des Pankreas zerstört werden. Erst wenn 80 – 90 % der Zellen zerstört sind, manifestiert sich der T1D. Die Symptomatik äußert sich erst lange Zeit nach dem Beginn der Zerstörung der Inselzellen, die für die endogene Insulinproduktion verantwortlich sind. Die entstehende Hyperglykämie wird langfristig Mikro- und Makroangiopathien zur Folge haben (Stryer, 1999). Ca. 1% der Bevölkerung ist von T1D betroffen. Zwillingsstudien mit homzygoten und heterozygoten Zwillingen zeigten, dass, zusätzlich zu einer genetischen Prädisposition, ein bestimmter Umwelteinfluss vorhanden sein muss, um die Zerstörung der  $\beta$ -Zellen auszulösen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ca. 50% des Risikos an Diabetes zu erkranken auf die HLA-Gene zurückfallen (Caillat-Zucman, 2008). Die stärksten Risikoallele sind die HLA-DQ-Allele DQ8 und DQ2; dagegen gilt DQB1\*0602 als nahezu 100%ig protektiv (Todd et al., 1987). Aber auch die HLA-DR-Allele werden in der Literatur als einflussgebend für die Prädisposition beschrieben, wenn auch der Einfluss dieses Isotyps der Assoziation von T1D mit HLA-DQ untergeordnet wird. HLA-DRB1\*0301 und verschiedene HLA-DR4 Allele gelten als risikoe erhöhend, wohingegen DRB1\*0403 als protektiv eingestuft wird (Jones et al., 2006).

Bei der Strukturanalyse wurden zunächst die risikoe erhöhenden Allele miteinander verglichen und im Anschluss die Unterschiede zu den protektiven Allelen geprüft. Bei dem Vergleich zwischen DQ2 und DQ8 fällt die konservierte polare Struktur in der P4 Proteinbindetasche auf. Da jedoch auch bei den protektiven Allelen diese konservierten AS-Reste vorliegen, wird ein Einfluss von P4, für die Wahrscheinlichkeit an T1D zu erkranken, ausgeschlossen. Der größte Einfluss hinsichtlich einer erhöhten Anfälligkeit für T1D wird in P9 gesehen. An Aminosäureposition 57 besitzen die meisten DQ $\beta$ -Ketten einen Asparaginsäurerest, der für eine Wasserstoffbrückenbindung zum gebundenen Peptid und eine Salzbrücke innerhalb der P9-Tasche zu Arg76 der DQ $\alpha$ -Kette verantwortlich ist (Stern et al., 1994). Somit wird diese Aminosäure nicht nur als Indiz für die Anfälligkeit gegenüber T1D gesehen, sondern hat auch einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität des HLA-DQ $\alpha/\beta$ -Dimers (Ettinger et al., 2000).

Der Austausch des Asparagins mit Alanin (DQ2 und DQ8) hat strukturelle Folgen. Arg76 $\alpha$  liegt nun ungepaart vor und wird einen stärkeren Einfluss auf die Bindung des Peptids in der P9 Tasche verursachen. Weiterhin ist Alanin wesentlich kleiner als Asparagin und führt zu einem vergrößerten Volumen der Peptidbindetasche. Im Vergleich zu Asparagin ist der elektrostatische Zustand von Alanin neutral, was das Fehlen der Wasserstoffbrückenbindung zum gebundenen Peptid erklären kann (Jones et al., 2006).

Jedoch wurde bereits eine Ausnahme gefunden. DQB1\*0401 besitzt zwar einen Asparaginsäurerest an Position 57 der  $\beta$ -Untereinheit, jedoch wird das Allel als positiv korreliert mit T1D beschrieben. Lee et al. erklärte in diesem Zusammenhang, dass die Anwesenheit des Leucins an Position 56 die Besetzung der Asparaginsäure an Position 57 egalisiert und ähnliche sterische Eigenschaften in der P9-Tasche schaffen kann (Lee et al., 2001).

Ein weiterer Unterschied zwischen positiv und negativ korrelierten Allelen scheint sich in der P6 Tasche zu finden. Dabei sind die positiv korrelierten Allele volumenbeschränkt aufgrund der großen Seitenketten in Aminosäureposition 9 $\beta$  und 66 $\alpha$  (siehe Abbildung 2.6). Bei Betrachtung dieser Größenbeschränkung mit der elektrostatischen Eigenschaft in P6 zeigt sich, dass die Ankerproteine des bindenden Peptids relativ kleine Seitenketten aufweisen und zudem eine erhöhte Affinität zu Glutamat-Resten (siehe Zöliakie-Abschnitt) haben (Qiao et al., 2005).

Relatives Risiko T1D	++	—	+	+
57. AS von DQ $\beta$	Alanin	Asparaginsäure	Valin	Serin
	0201; 0202; 0205; 0302; 0304; 0305; 0307; 0308; 0311; 0314; 0318; 0626; 0629;	0203; 0204; 0301; 0303; 0306; 0309; 0310; 0312; 0313; 0315; 0316; 0317; 0319; 0320; 0321; 0322; 0323; 0324; 0225; 0326; <b>0401</b> ; 0402; 0403; 0404; 0503; 0601; 0602; 0603; 0607; 0611; 0614; 0615; 0616; 0619; 0620; 0623; 0624; 0628; 0630; 0631; 0632; 0633	0501; 0604; 0605; 0606; 0608; 0609; 0612; 0613; 0617; 0618; 0621; 0622; 0627; 0634;	0502; 0504; 0505; 0610; 0625; 0626

**Abbildung 2.7: Relatives Risiko für T1D durch HLA-Klasse-II-Moleküle**

Eine besondere strukturelle Rolle kommt der 57. Aminosäure der  $\beta$ -Kette zu. Je nach der Besetzung dieser Position kann das relative Risiko an T1D zu erkranken gegeben (Alanin, Serin, Valin) sein, oder aber bei Besetzung der Position 57 mit Asparaginsäure gilt das Risiko als minimiert. Die DQ $\beta$ -Kette 0401 besitzt zwar einen Asparaginsäurerest, ist jedoch aufgrund anderer Strukturmerkmale mit einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus korreliert.



## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Modell entwickelt, nach dem das Chaperon „Invariante Kette“ passende und nicht-passende Untereinheiten von Klasse-II-Molekülen isotypen-spezifisch sortiert und die Ausbildung eines funktionellen Peptidrezeptors fördert. Die bisherigen wissenschaftlichen Untersuchungen sind zu einem großen Teil für den HLA-Klasse-II-Isotypen DR durchgeführt worden. DR-Moleküle sind strukturell durch Methoden wie Röntgen-Strukturanalysen, aber auch mit Hilfe biochemischer Verfahren sehr gut untersucht.

Hinsichtlich der klinischen Relevanz sind vor allem die Isotypen HLA-DQ äußerst interessant. Grundlage für die Vielfalt der Isotypen bildet der Polymorphismus, der durch die Klasse-II-Moleküle (Ausnahme DR $\alpha$ ) besonders gut repräsentiert wird. Der Isotyp DQ besitzt 26 verschiedene Alpha- und 89 verschiedene Beta-Subeinheiten. Diese hohe Vielfalt an Untereinheiten des Isotyps DQ ist wiederum maßgeblich dafür verantwortlich, dass eine Prädisposition von Autoimmunerkrankungen mit bestimmten DQ-Allelen assoziiert beschrieben ist.

Die häufige Erkrankungsassoziation von HLA-DQ in Kombination mit dem stark ausgeprägten Polymorphismus führte zu der Zielsetzung, dass, im Rahmen dieser Dissertation, die Aufklärung des Zusammenbaus im ER und des funktionellen Transports zur Zelloberfläche unterschiedlicher DQ-Allotypen im Vordergrund stehen soll. Initial sollen erste Versuche zur Abgrenzung des Isotypen DQ von DR und DP durchgeführt werden. Anschließend werden verschiedene DQ-Allelkombinationen auf ihre unterschiedlichen Eigenschaften, hinsichtlich einer funktionellen Peptidpräsentation, untersucht. Hinweise auf eine erfolgreiche Peptidpräsentation werden aus der Überprüfung der Kohlenhydratmodifikationen des Golgi Apparats (N-Glykanreifung), sowie aus der Feststellung des erfolgreichen Transports der Heterodimere zur Zelloberfläche, abgeleitet.

Mit Hilfe der Analyse von Haplotypenhäufigkeiten aus der „Allele-Frequencies.net-Datenbank“ sollen weitere Aussagen über die Vererbungsrelevanz innerhalb von verschiedenen ethnischen Populationen generiert werden. Die Relevanz der Ergebnisse aus den praktischen Arbeiten am Zellmodell für die Vererbung bestimmter DQ-Allelkombinationen soll auf Grund dieser populationsspezifischen Zahlen näher bestimmt werden.

Neben der Aufklärung unterschiedlicher Transporteigenschaften der Heterodimere ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Untersuchung von Struktur und Funktion chimärer DQ-DR-Fusionskonstrukte. Diese sollen auf ihre Funktionalität und Transportkompetenz innerhalb der Zelle überprüft werden. Besonders interessant ist der Sequenzbereich, der für die Stabilität der Subeinheiten eines Peptidrezeptors verantwortlich ist und der zudem die Abhängigkeit von der Invarianten Kette (bezüglich ihrer Chaperonfunktion) auf ein Minimum reduziert.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Geräte

<b>A</b>	
Agarosegelelektrophorese	Renner, Darmstadt
Analysenwaage / Feinwaage (Analytik)	Sartorius, Göttingen
Autoradiographiekassetten	Siemens, Deutschland; Faust GmbH, Köln
<b>B</b>	
Bechergläser	
➤ Glas	Jena Glas, Jena
➤ Plastik	Brand Labortechnik, Deutschland
Brutschränke	
➤ Bakterieninkubator (Innova 4300)	New Brunswick Scientific, Edison
➤ Begasungsbrutschrank	Heraeus, Zürich
<b>D</b>	
Durchflusszytometer (FACScan)	BD, USA
Durchlichtscanner (Agfa Duo)	Agfa- Gevaert AG, Leverkusen
<b>E</b>	
Eismaschine	Ziegra, Deutschland
Elektrophoresekammer	cti, Idstein
Entwicklermaschine (Curix 60)	Agfa-Gevaert AG, Leverkusen
<b>G</b>	
Gewindeglasflasche	Biochrom KG, Berlin
<b>H</b>	
Heizblöcke (Thermostat 5320)	Eppendorf GmbH, Hamburg
<b>K</b>	
Kamera	Canon, Deutschland
Kühlschränke	
➤ Kühlschränke (+4°C)	Liebherr, Deutschland, Siemens, Deutschland
➤ Kühlschränke (-20°C)	Liebherr Deutschland, AEG, Deutschland
➤ Kühlschränke (-80°C)	Colora, Ratingen
Küvette	
➤ Quarzglas	Sarstedt, Deutschland
➤ Plastik	Sarstedt, Deutschland
<b>M</b>	
Magnetrührer (Ihamag Reo)	Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Messkolben	Jena Glas, Mainz
Messzylinder	Jena Glas, Mainz
Mikroskope	
➤ Wilovert	Hund, Wetzlar
Mikrowellenofen (Lunik 820)	Lunik, Deutschland
<b>P</b>	
pH – Meter (Orion 42 a)	WTW, Weilheim
Pipetten (Mikroliterpipetten)	Labsystems, Finnland, Gilson Deutschland, Edmann, Deutschland
Pipettierhilfen	
➤ Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
➤ Accu jet	Brand, Deutschland
Pumpe (Vakuum-)	Vakuubrand GmbH, Wertheim

<b>R</b>	
Reinstwasseranlage	Millipore, Deutschland
<b>S</b>	
Schüttelinkubator (Bakterien TH15)	Edmund Bühler, Deutschland
Semidry Blotting Apparatur	Biometra, Göttingen
Spektralphotometer (U-1100)	Biorad, München
	Hitach, Japan
<b>T</b>	
Tischschüttelgerät (Reax 2000)	Heidolph, Deutschland
Thermomixer (5436)	Eppendorf GmbH, Hamburg
Thermocycler (T3)	Biometra, Göttingen
Trichter	VitLab, Deutschland
<b>U</b>	
UV-Beleuchtungstisch / Geldokumentationsapparatur	Cybertech, Berlin
<b>W</b>	
Wasserbäder (Julabo 12 B)	Julabo, Houston
Werkbank, steril	Steag, Pfullingen
Wippe (Rocking Platform)	Biometra, Göttingen
<b>Z</b>	
Zählkammer (Neubauer)	Faust GmbH, Köln
Zentrifugen	
➤ Biofuge 13	Heraeus, Zürich
➤ Biofuge 22	Heraeus, Zürich
➤ Centrifuge 5417	Eppendorf GmbH, Hamburg
➤ J-2HS	Beckmann, Hamburg
➤ Megafuge 1.0	Heraeus, Zürich
➤ Varifuge 3.0	Heraeus, Zürich

## 3.2 Verbrauchsmaterialien

### 3.2.1 Einwegmaterial

<b>D</b>	
Deckgläschen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>E</b>	
Einmalröhrchen (15 ml, 50 ml Falcon)	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen	B.Braun, Melsungen
<b>F</b>	
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier für Gel- Blotting(GB003)	Whatman, UK
<b>G</b>	
Gewebekulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht; TPP, Schweiz
<b>H</b>	
Handschuhe, Einmal- (Rotiprotect)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

<b>K</b>	
Kanülen	Henke-Sass Wolf, Tuttlingen
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
<b>M</b>	
Messpipetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nümbrecht
<b>N</b>	
Nitrozellulosemembran (Protran, BA83)	Whatman, UK
<b>P</b>	
Parafilm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PCR-Platten und Reaktionsgefäße	Peqlab, Erlangen
Petrischale	Sarstedt, Nümbrecht
pH – Indikationspapier	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
<b>R</b>	
Reaktionsgefäße	
➤ 0,5 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
➤ 1,5 ml	Sarstedt, Nürnberg
➤ 2,0 ml	
Röntgenfilme (Cronex 5)	Agfa-Gaevert, Leverkusen
<b>S</b>	
Skalpelle	
➤ Plastik	B.Braun, Melsungen
➤ Metall	B.Braun, Melsungen
Sterilfilter	
➤ 0,2 µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
➤ 0,45 µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>Z</b>	
Zellkulturflaschen	
➤ 0,75 l	Sarstedt, Nümbrecht
➤ 1,5 l	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten	
➤ 6-Lochplatten	TPP; Schweiz
➤ 24- Lochplatten	TPP, Schweiz
➤ 96-Lochplatten	Sarstedt, Nümbrecht
➤ 10er Schalen	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen	Beckmann, USA

### 3.2.2 Chemikalien, Reagenzien

<b>A</b>	
AA/Bis (Acrylamid – Bisacrylamid, 30%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	Biorad, Richmond, USA
Ampicillin (C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Sna)	Sigma-Aldrich, München

<b>B</b>	
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau (C19H10Br4O5S)	Sigma-Aldrich, München
<b>C</b>	
CL4B-Sepharose	Pharmacia GmbH, Freiburg
Complete Protease Inhibitoren	Roche, Mannheim
<b>D</b>	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Biorad, Rochmond, USA
DMEM – Medium	PAA, Österreich
DNS-Standards:	
➤ Gene Ruler 100bp DNS Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
➤ Gene Ruler 1kb DNS Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<b>E</b>	
Entwicklerlösung für Röntgenfilme	Agfa-Gaevert, Leverkusen
EMEM-Medium	Lonza, Belgien
ECL-Substratlösung	Amersham, Freiburg
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung, 1%	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>F</b>	
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
Fixierlösung für Röntgenfilme	Agfa-Gaevert, Leverkusen
Fötales Kälberserum (FCS Gold)	PAA, Österreich
<b>G</b>	
Glutamin (L-Glutamin) (200mM)	Sigma Aldrich, München
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glyzerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
G418	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>H</b>	
HEPES	PAA, Österreich
<b>I</b>	
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>K</b>	
Kanamycin A	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>L</b>	
LB Broth, Lennox	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>M</b>	
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Medium 2x YT	DIFCO, USA
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>N</b>	
Natriumazid	Sigma Aldrich, München
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich, München
Natriumpyruvat	PAA, Österreich

Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka AG, Schweiz
<b>P</b>	
PBS	PAA, Österreich
Penicillin / Streptomycin	PAA, Österreich
PermaFluor	Immunotech, Frankreich
PMSF	Serva, Heidelberg
Ponceaurot	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Protein A- Sepharose	Amersham, Freiburg
Protein G- Sepharose	Amersham, Freiburg
Proteinstandards	
➤ Prestained Protein MW	Peqlab, Erlangen
<b>R</b>	
Roti-Block	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 – Medium	PAA, Österreich
<b>S</b>	
Salzsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS- Probenpuffer (Roti-Load)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>T</b>	
TEMED	Biorad, USA
Transfektionsreagenzien:	
➤ jetPEI™	Biomol, Hamburg
Tris – Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypanblau, 0,4%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	PAA, Österreich
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

### 3.2.3 Allgemeine Lösungen

<b>C</b>	
Coomassie- Lsg.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 50 % Methanol</li> <li>➤ 10 % Essigsäure</li> <li>➤ 0,115 % Coomassie Brilliant Blue</li> </ul>
<b>D</b>	
DNS- Ladepuffer (10x)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Glycerin 10 ml</li> <li>➤ TAE (50x) 2 ml</li> <li>➤ Bromphenolblau 0,4%</li> <li>➤ Xylencyanol 0,4%</li> </ul>
<b>F</b>	
FACS- Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ PBS</li> <li>➤ 2% FCS</li> <li>➤ 0,01% Na- Azid</li> </ul>
<b>L</b>	
Lämmli- Puffer (nicht reduzierend)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ SDS 2%</li> <li>➤ 1 M Tris/HCl (pH 6,8) 62,5%</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Glycerin 10%</li> <li>➤ Bromphenolblau 0,5%</li> <li>➤ SDS 2%</li> </ul>
Lämmli- Puffer (reduzierend)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 1 M Tris/HCl (pH 6,8) 62,5%</li> <li>➤ Glycerin 10%</li> <li>➤ Bromphenolblau 0,5%</li> <li>➤ DTT 100 mM</li> </ul>
Laufpuffer für SDS- Gele (4fach- Konzentrat)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 60 g Tris</li> <li>➤ 288 g Glycin</li> <li>➤ 100 ml 20 % SDS</li> <li>➤ auf 5 l mit A. dest. auffüllen, pH 8,5</li> </ul>
Lösung A	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 91,5 g Tris</li> <li>➤ 120 ml 1 N HCl auf 250 ml mit A. dest., pH 8,5</li> <li>➤ 0,575 ml TEMED</li> </ul>
Lösung C	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 29,26 g Acrylamid</li> <li>➤ 0,735 g N,N'-Methylenbisacrylamid</li> <li>➤ auf 100 ml mit A. dest. auffüllen</li> </ul>
Lösung D	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 38,4 ml 1 M Tris/HCl pH 7,0</li> <li>➤ 1,6 ml 20 % SDS</li> <li>➤ 0,1 ml TEMED</li> </ul>
Lysepuffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ ST- Puffer 910 µl</li> <li>➤ NP- 40 (10%ig) 50 µl</li> <li>➤ Complete 40µl</li> </ul>
<b>P</b>	
PBS (Phosphate buffered saline, 10x)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ NaCl 1,4 M</li> <li>➤ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 0,1 M</li> <li>➤ pH 6,6</li> </ul>
Puffer B für Mini- DNS- Präparation	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ NaOH 200 mM</li> <li>➤ SDS 1%</li> </ul>
Puffer C für Mini- DNS- Präparation	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ammoniumacetat 7,5 M</li> </ul>
<b>S</b>	
SDS- Laufpuffer	siehe Laufpuffer für SDS-Gele
ST- Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 10 mM Tris</li> <li>➤ 150 mM NaCl</li> <li>➤ pH 7,5</li> </ul>
SOC-Medium	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Yeast Extract 0.5%</li> <li>➤ Tryptone 2%</li> <li>➤ NaCl 10 mM</li> <li>➤ KCl 2.5 mM</li> <li>➤ MgCl<sub>2</sub> 10 mM</li> <li>➤ MgSO<sub>4</sub> 10 mM</li> <li>➤ Glucose 20 mM</li> </ul>
<b>T</b>	
TAE- Puffer (50x)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Tris 2M</li> <li>➤ Essigsäure 5,71 %</li> <li>➤ EDTA 50 mM</li> </ul>
Transferpuffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Tris-Base (48mM)</li> <li>➤ Glycin (39 mM)</li> <li>➤ Methanol p.A. (20 v/v)</li> <li>➤ SDS (0,375 % w/v)</li> </ul>
<b>W</b>	
Waschpuffer für Western Blotting	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ PBS 0,8%</li> <li>➤ Tween 20 0,2%</li> </ul>

### 3.2.4 Enzyme

Endo Hf	NEB, Hercules, USA
PNGaseF	NEB, Hercules, USA
Restriktionsendonukleasen	NEB, Hercules, USA MBI FERMENTAS, Heidelberg
RNase A	MACHERY-NAGEL, Düsseldorf
Taq- Polymerase	MBI FERMENTAS, Heidelberg

### 3.2.5 Reaktionskits

Nucleospin Extraction Kit	Macherey-Nagel, Düren
E.Z.N.A® Total RNA- Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
NucleoBond PC 100 (Midi)	MACHEREY-NAGEL, Düren
pcDNS3.1/V5-His-TOPO Kit	INVITROGEN, Karlsruhe

### 3.2.6 Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80d/lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), $\lambda$ -
TOP10 (Invitrogen)	F- mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 $\lambda$ <sup>-</sup>

### 3.2.7 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
<b>IMR90S</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Humane Lungenfibroblasten</li> <li>➤ SV-40 transformierte Version der IMR90 Zelllinie</li> <li>➤ adhärent wachsend</li> <li>➤ keine MHCII- und li-Expression vorhanden</li> </ul>
<b>HeLa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, 1951</li> <li>➤ keine MHCII- und li- Expression vorhanden</li> </ul>
<b>COS-7</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ SV-40 transformierte Affennierenzellen (Cercopithecus aethiops)</li> <li>➤ adhärent wachsend</li> <li>➤ keine MHCII- und li-Expression vorhanden</li> </ul>
<b>Mel-Juso</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Humane Zelllinie, etabliert aus dem primären Tumor einer 58jährigen Frau mit malignem Melanom, 1977 (Johnson J. P. et al., 1981)</li> <li>➤ adhärent wachsend</li> </ul>



	➤ MHCII- und Ii- Expression vorhanden
<b>WT49</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ B- Lymphoblastoid- Zelllinie einer Frau, Italien, 1992</li> <li>➤ Suspensionszelllinie</li> <li>➤ MHCII- und Ii- Expression vorhanden</li> </ul>
<b>BM92</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ B- Lymphoblastoid- Zelllinie eines Mannes, Italien, 1992</li> <li>➤ Suspensionszelllinie (in RPMI 1620 kultiviert)</li> <li>➤ MHCII- und Ii- Expression vorhanden</li> </ul>

### 3.2.8 Primär-Antikörper

Klon	Isotyp / Spezies	Gerichtet gegen	Einsatz	Quelle
LG-II-612.14	IgG1, Maus	Monomorphe Determinante der MHC II $\beta$ - Ketten	Western FACS	Soldano, Ferrone, Roswell Park Cancer Institute, Temponi M., 1993
Mar 18.5	IgG2a, Maus	Maus anti- Ratte	FACS	Lanier L. L. et al., 1982
Bu43	IgM, Maus	Trimerisierungsdomäne der humanen invarianten Kette	Western	Wraight et al., 1990
Bu45	IgG1, Maus	Carboxyterminus der humanen invarianten Kette II	FACS IP	Wraight et al., 1990
anti-His	IgG1, Maus	Oligohistidin am Carboxyterminus von Proteinen	Western IP	Invitrogen
anti-6D4	IgG1, Maus	10 AS großes Epitop: RT1- DM $\beta$	Western	Herstellung durch J. Neumann , Neumann, 2005, Kurth et al., 1997
anti-12B8	IgG1, Maus	10 AS großes Epitop: $\alpha$ 1-Domäne Ratten DM $\alpha$	Western	J. Neumann
Anti- V5	IgG2a, Maus	14 AS große V5-Epitop aus dem P/V Protein des Paramyxovirus SV5	Western IP FACS	Invitrogen (Southern et al., 1991)

### 3.2.9 Sekundär-Antikörper

Klonname	Isotyp & Spezies	Gerichtet gegen	Einsatz	Quelle
HRP-gekoppelt Goat-anti-Mouse IgG	Ziegenantiserum	Mausimmunglobuline	Western	Dianova
HRP-gekoppelt Goat-anti-Mouse IgM	Ziegenantiserum	Mausimmunglobuline	Western	Dianova
Alexa488 gekoppelt Goat-Anti-Mouse IgG	Ziegenantiserum	Mausimmunglobuline	FACS	Invitrogen
Alexa594 gekoppelt Goat-Anti-Mouse IgG	Ziegenantiserum	Mausimmunglobuline	FACS	Invitrogen

### 3.2.10 Oligonukleotide / Primer

Nr.	Kennzeichnung	Sequenz
<u>Oligonukleotide zur Herstellung von Fusionsprodukten</u>		
D1	DR-DQ-Alpha-Fusion.vw	5'- CTC CGA TCA CCA ATT CTC CCG TGA CAC TG -3'
D2	DR-DQ-Alpha-Fusion.rv	5'- CAG TGT CAC GGG AGA ATT GGT GAT CGG AG -3'
D3	DQA1*0501.24.Bp.vw	5'- ATG ATC CTA AAC AAA GCT CTG ATG -3'
D4	DQ-DR-Alpha-Fusion.vw	5'- ACA GTG TTT TCC AAG GTA CCT CCA GAG GTA AC -3'
D5	DQ-DR-Alpha-Fusion.rv	5'- TAC CTC TGG AGG TAC CTT GGA AAA CAC TGT -3'
D6	DRA1*0101.21Bp.rv	5'- CAG AGG CCC CCT GCG TTC TGC -3'
D7	DQB1*0302.23Bp.vw	5'- ATG TCT TGG AAG AAG GCT TTG CG -3'
D8	DQ-DR-Beta-Fusion.vw	5'- ACC TTG CAG CGG CGA GAG CCT AAG GTG ACT -3'
D9	DQ-DR-Beta-Fusion.rv	5'- AGT CAC CTT AGG CTC TCG CCG CTG CAA GGT -3'
D10	DRB1*0101.21Bp.6D4.rv	5'- TCA AGG GAC GAT CTG TCC CTC CTC TGG ATC CCA CAA GCT CAG GAA TCC TGT TGG CTG -3'
D11	DRA1*0101.20Bp.vw	5'- ATG GCC ATA AGT GGA GTC CC -3'
D12	DQA1*0501.12B8.rv	5'- TCA CTG CGA CTC ATC CCA CCA CGC CTG GGG AGA AGC TTC CAA GGG CCC TTG GTG TCT GGA AG -3'
D13	DRB1*0101.20Bp.vw	5'- ATG GTG TGT CTG AAG CTC CCT G -3'
D14	DR-DQ-Beta-Fusion.rv	5'- CAC TGT GGG CTC CAC AAC TCG CCG CTG CAC -3'
D15	DQB1*0302.25Bp.rv	5'- TCA GTG CAG GAG CCC TTT CTG ACT C -3'
<u>Oligonukleotide für Mutationen</u>		
S1	Soluble MHC.vw	5'- CAA CAT GAT CCT AAA CAA AGC -3'
S2	Soluble MHC.rv	5'- CTC TGT GAG CTC TGA TAC -3'
Pu1	DQB1*030201.fw	5'- ATG TCT TGG AAG AAG GCT TTG CGG -3'
Pu2	DQB1*030201.rv	5'- GTG CAG GAG CCC TTT -3'
Pu3	Mutation 7+8+9.vw	5'- CAA CAC CAC GAC CTC CCG GAG ACA GAA CCT ACC CCT CTG CCA GTG ACA -3'
Pu4	Mutation 7+8+9.rv	5'- ACA GTG ACC GTC TCC CCA TCC AAG ACA GAG GCC CTC CAG CAC CAC AAC -3'
<u>Oligonukleotide zur Typisierung von eukaryotischen Zelllinien</u>		
Ty1	DQB1.uni	5'- CAC CAT GTC TTG GAA AAA GGC TTT GCG -3'
Ty2	DQB1.6D4.rev	5'- TCA CTG CGA CTC ATC CCA CCA CGC CTG GGG AGA AGC TTC GTG CAG GAG CCC TTT CTG ACT CC -3'
Ty3	DQA1.vw	5'- CAC CAT GAT CCT AAA CAA AGC TCT GC -3'
Ty4	DQA1.rv	5'- CAA TGG CCC TTG GTG TCT GGA AG -3'
Ty5	DRB1.vw	5'- CAC CAT GGT GTG TCT GAG GCT TTT -3'
Ty6	DRB1.rv	5'- GCT CAG GAA TCC TGT TGG CTG -3'
Ty7	DPA1.vw	5'- CAC CAT GCG CCC TGA AGA CAG AAT GTT C -3'
Ty8	DPA1.rv	5'- CAG GGT CCC CTG GGC CCG G -3'
Ty9	DPB1.vw	5'- CAC CAT GAT GGT TCT GCA GGT TTC TGC G -3'
Ty10	DPB1*rv	5'- TGC AGA TCC TCG TTG AAC TTT C -3'

## 3.2.11 Verwendete Plasmide

Nr	Kennzeichnung	Subtyp	Klonierungs-vektor	Detektion über Tag
1	DR $\alpha$ (<95 AS) / DQ $\alpha$ (>96 AS)	DRA1*0101 (AS 1 - 95) DQA1*050101 (AS 96 - 788)	pcDNS3.1	12B8 Tag
2	DR $\alpha$ 1 / DQ $\alpha$ 2	DRA1*0101 (1. Domäne) DQA1*050101 (2. Domäne)	pcDNS3.1	12B8 Tag
3	DR $\beta$ 1 / DQ $\beta$ 2	DRB1*0101 (1. Domäne) DQB1*0302 (2. Domäne)	pcDNS3.1	Kein Tag
4	DQ $\alpha$ 1 / DR $\alpha$ 2	DQA1*050101 (1. Domäne) DRA1*0101 (2. Domäne)	pcDNS3.1	V5 His Tag
5	DQ $\beta$ 1 / DR $\beta$ 2	DQB1*0302 (1. Domäne) DRB1*0101 (2. Domäne)	pcDNS3.1	6D4 Tag
6	Soluble MHC	DQA1*050101 (AS 30 -227)	pcDNS3.1	V5 His Tag
7	DQA1*0103	DQA1*010301	pcDNS3.1	V5 His Tag
8	DQA1*0301	DQA1*030101	pcDNS6.2	V5 His oder kein Tag
9	DQA1*0501	DQA1*050101	pcDNS3.1	V5 His Tag
10	DQA1*0505	DQA1*050501	pcDNS3.1	V5 His oder 6D4 Tag
11	DQB1*0201	DQB1*020101	pcDNS3.1	V5 His oder 6D4 Tag
12	DQB1*0301	DQB1*030101	pcDNS3.1	12B8 Tag
13	DQB1*0302	DQB1*030201	pcDNS3.1	V5 His oder 6D4 Tag
14	DQB1*0602	DQB1*060201	pcDNS3.1	V5 His oder 6D4 Tag
15	Hu li 33	Humane Invariante Kette II	pcDNS3.1	-
16	Hu li 33 $\Delta$ PBS	Humane Invariante Kette II $\Delta$ PBS	pcDNS3.1	-
17	Hu li 33 M91G	Humane Invariante Kette II M91G	pcDNS3.1	-
18	Hu li 33 $\Delta$ GBS	Humane Invariante Kette II $\Delta$ GBS	pcDNS3.1	-
19	DQB1*0302 Ile133Val; Arg137Lys; Asn142Gln	DQB1*030201; DRB1*010101 (AS 133, 137, 142)	pcDNS3.1	12B8

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Gewinnung von cDNS aus menschlichen Tumorzellen

Um cDNS aus eukaryotischen Zellen zu gewinnen, musste zunächst die RNS aus den Zellen isoliert werden. Zur RNS-Gewinnung aus den Zelllinien BM92, WT49 und MelJuso wurde das E.Z.N.A.<sup>®</sup>Total-RNA-Kit (Peq-Lab Biotechnologie GmbH) verwendet. Für den Versuch wurden  $1 \times 10^7$  Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden unter Zugabe von 400 µl Lysepuffer homogenisiert und unter denaturierenden Bedingungen lysiert. RNasen wurden durch den Zusatz eines RNase-Inhibitors vollständig inhibiert. Das Lysat wurde mit 400 µl 70%igem Ethanol sorgfältig durchmischt, bevor die im Lysat enthaltene RNS an eine Silikamembran gebunden wurde. Zu diesem Zweck wurde der Ansatz auf eine Säule pipettiert und anschließend abzentrifugiert (10.000 g für 15 sec). Verunreinigungen konnten durch zweimaliges Waschen mit speziellen Waschpuffern entfernt werden. Nach jedem Waschschrift folgte die Zentrifugation der Säule bei 10.000 g für 15 sec und das Verwerfen des Überstandes. Die Eluierung der RNS gelang in 50 µl ddH<sub>2</sub>O-Wasser, das vorsichtig mit einer Pipette auf die Säulchen gegeben wurde. Ein erneuter Zentrifugationsschritt (10.000g für 15 sec) löste die RNS von der Kieselsäure-Membran und das Eluat wurde in einem 2 ml Sammelgefäß aufgefangen.

Anschließend konnte die RNS bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden oder es folgte in direktem Anschluss die Synthese der cDNS (copy DNS) durch das QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen. Bei dieser zweistufigen Verarbeitung der RNS wird zunächst genomische DNS aus dem Ansatz eliminiert. Dazu wurde folgender Ansatz vorbereitet:

- 4 µl gDNS Wipeout Buffer (7x)
- 2 µg (ca. 5 µl) Template Gesamt-RNA
- variable Menge an RNase-freiem Wasser für ein Gesamtvolumen von 28 µl

Dieser Ansatz wurde für 2 min bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte das Umschreiben der RNS durch eine Reverse Transkriptase, wozu die gDNS-befreite RNS für 15 min bei  $42^{\circ}\text{C}$  in folgendem Mastermix inkubiert wurde:

- 2 µl Quantiskript Reverse Transkriptase
- 8 µl Quantiskript RT Buffer (5x)
- 2 µl RT Primer Mix

Die Reaktion fand bei  $42^{\circ}\text{C}$  (Temperaturoptimum des Enzyms) statt, bevor der Abbruch durch Hitzeinaktivierung bei  $95^{\circ}\text{C}$  (3 min) vollzogen wurde.

### 3.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient der hochspezifischen, exponentiellen Amplifikation von Nukleinsäure-Sequenzen. Die PCR wurde in dieser Arbeit einerseits zur Klonierung von DNS, aber auch zur Mutagenese (siehe Abschnitt 3.3.3) eingesetzt. Voraussetzung zur Durchführung ist die Kenntnis über die Sequenz der flankierenden Abschnitte des zu amplifizierenden DNS-Strangs. Die verwendeten Oligonukleotidprimer wurden durch die Firma Biospring (Frankfurt/Main) synthetisiert. Diese Oligonukleotide sind Ausgang für die Herstellung eines zum Leitstrang exakt komplementären Tochterstrangs. Die Synthesearbeit des neuen DNS-Strangs wird durch eine DNS-Polymerase geleistet. Da dieses Enzym nur zu einer DNS-Strangverlängerung in der Lage ist, kann es erst nach Anlagerung der komplementären Primer an den Matrizenstrang seine Arbeit verrichten. Die Verlängerung der Oligonukleotidprimer erfolgt vom freien 3'-OH-Ende aus und verläuft dabei nur in 5' → 3'-Richtung. Als Matrize dient der zu amplifizierende DNS-Strang.

Ein Durchlauf einer PCR, auch Zyklus genannt, besteht aus drei Teilschritten:

- Initial erfolgt die Aufspaltung der doppelsträngigen DNS in ihre Einzelstränge durch thermische Denaturierung bei ca. 95°C.
- Es folgt die Anlagerung der Oligonukleotidprimer unter Hybridisierungsbedingungen an die einzelsträngige Matrizen-DNS. Die Temperatur lässt sich durch folgende Formel abschätzen:  $T_a = ([A + T] \times 2 + [G + C] \times 4) - 5$
- In der Elongationsphase wird durch eine DNS-Polymerase die DNS- Neusynthese begonnen. In dieser Arbeit wurde die Taq-Polymerase (MBI Fermentas, Heidelberg) eingesetzt, die bei einem Temperaturoptimum von 72°C ihre größte Arbeitsgeschwindigkeit aufweist. Die Geschwindigkeit der Neusynthese liegt bei dieser Polymerase bei 1 min pro kb DNS.

Ca. 20 bis 30 Zyklen sind notwendig, um eine entsprechende Vervielfältigung der Probe zu erreichen. Eine finale terminale Verlängerung der DNS findet bei 72°C für 7 min statt.

Standardmäßig wurde ein Mastermix angesetzt, der sich, wie in Tabelle 3.1.A dargestellt, zusammensetzt.

**Tabelle 3.1: Mastermix (A) und Temperaturprofil (B) einer Standard-PCR**

A)	Substrat	Volumen	B)	Temperatur	Dauer	Zyklen
	10x PCR-Puffer	2,5 µl		95 °C	3 min	1
	dNTP-Mix (10mM)	2,5 µl		95 °C	1 min	} 35
	Primer 1	0,5 µl		55 °C	1 min	
	Primer 2	0,5 µl		72 °C	1 min	
	steriles ddH <sub>2</sub> O	18,3 µl		72 °C	7 min	1

Dem Mastermix wurden 0,5 µg der zu amplifizierenden DNS und 0,2 µl (5 units/µl) der Taq-Polymerase (MBI Fermentas, Heidelberg) zugesetzt. Das Standardtemperaturprofil wurde entsprechend der Tabelle 3.1.B) in den Thermocycler (T3, Biometra Göttingen) eingegeben.

Nachfolgend wurde das Ergebnis durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Bei nicht erwarteten DNS-Molekulargewichten folgte die Wiederholung der PCR mit angepasstem Temperaturprotokoll, je nach spezifischer Annealingtemperatur der beiden Oligonukleotidprimer.

### 3.3.3 Overlap-Extension-PCR

Die Overlap-Extension-PCR ist eine molekularbiologische Methode mit deren Hilfe eine Mutagenese von DNS-Strängen durchgeführt wird. Mit Hilfe dieser Methode wurden in dieser Arbeit Punktmutationen, aber auch die Verknüpfung ganzer Moleküldomänen erreicht. Beide Arten der Mutation führten bei einer späteren Translation zu einer veränderten Aminosäuresequenz des Proteins.

Basierend auf dem Prinzip der DNS-Klonierung durch die PCR wurde die Amplifikation einzelner Sequenzen genutzt, um Mutationen einzuführen. Zur Veränderung oder zur Deletion einzelner Basenpaare wurden zwei mutagene Primer (P2, P3) eingesetzt, welche die angestrebte Veränderung in ihrer Sequenz besitzen. Ihre Basenlänge von ca. 25 Basen führte jedoch, trotz dieser Abweichung, zu einer Anlagerung an den spezifischen Bereich des DNS-Matrizen- bzw. kodierenden DNS-Strangs. Zwei weitere Oligonukleotidprimer (P1, P4) übernahmen die Rolle der flankierenden Marker.

In zwei getrennten Ansätzen einer PCR wurden zunächst kürzere DNS-Sequenzen amplifiziert, die entweder von P1 und P2 bzw. von P3 und P4 flankiert wurden. Diese wurden entsprechend dem Standardrezept zusammengestellt. Das Temperaturprotokoll wurde für die Hybridisierung der jeweiligen Oligonukleotidprimer angepasst. Die Ergebnisse der PCR wurden im Agarosegel kontrolliert und die DNS-Banden eluiert.

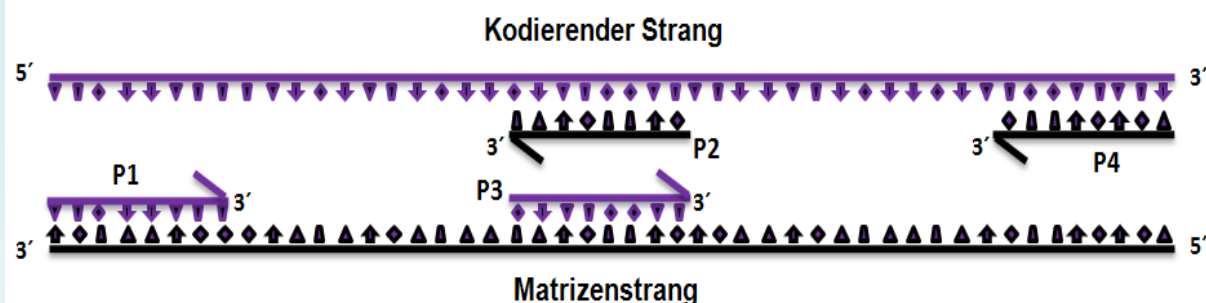


Abbildung 3.1: Punktmutation durch Overlap-Extension-PCR

In einem nächsten Schritt folgte der Ansatz einer Fusions-PCR, indem nun die neu gewonnenen DNS-Stränge mit den flankierenden Primern P1 und P4 zusammen gemischt wurden. Die PCR erfolgte nach dem beschriebenen Schema in Tabelle 3.1. Das Produkt aus dieser PCR enthält nun die von P1 und P4 begrenzte DNS-Sequenz, da die Enden der beiden Ausgangssequenzen komplementär zueinander sind und so eine Anlagerung ermöglicht wird. Das Fusionsprodukt wurde erneut im Agarosegel kontrolliert, die DNS-Banden eluiert und durch Sequenzierung überprüft.

Zur Verbindung zweier unterschiedlicher DNS-Teilstränge wurde ähnlich vorgegangen. Im Unterschied zur punktuellen Mutation erfolgte bei dieser Methode die Synthese der Primer, ohne dabei geplante Mutationen zu berücksichtigen. Als Matrix dienten zwei unterschiedliche DNS-Stränge, die jeweils als Vorlage für die beiden ersten PCR-Reaktionen verwendet wurden. Dabei wurde ein Teilbereich von DNS-Matrize 1 amplifiziert, der durch das Primerpaar P1 und P2 eingegrenzt wurde. Der zweite Teilstrang leitet sich von der DNS-Matrize 2 ab und wird durch P3 und P4 flankiert.

Die entstehenden Produkte wurden in einem nächsten PCR-Schritt durch Amplifikation zu einem einheitlichen Strang vereint. Aufgrund der Basensequenz von Primer P2 und P3 binden diese nicht nur an die komplementären DNS-Matrizen 1 und 2, sondern sind auch in einem Teilbereich ihrer Sequenz komplementär zueinander und führen so zur Vereinigung der Einzelprodukte. Die flankierenden Oligonukleotidprimer wurden bei diesem Ansatz so gestaltet, dass der P1-Primer flankierend für den P2-Primer-Strang und der P4-Primer als Begrenzung für den P3-Primer-komplementären Strang synthetisiert wurde.

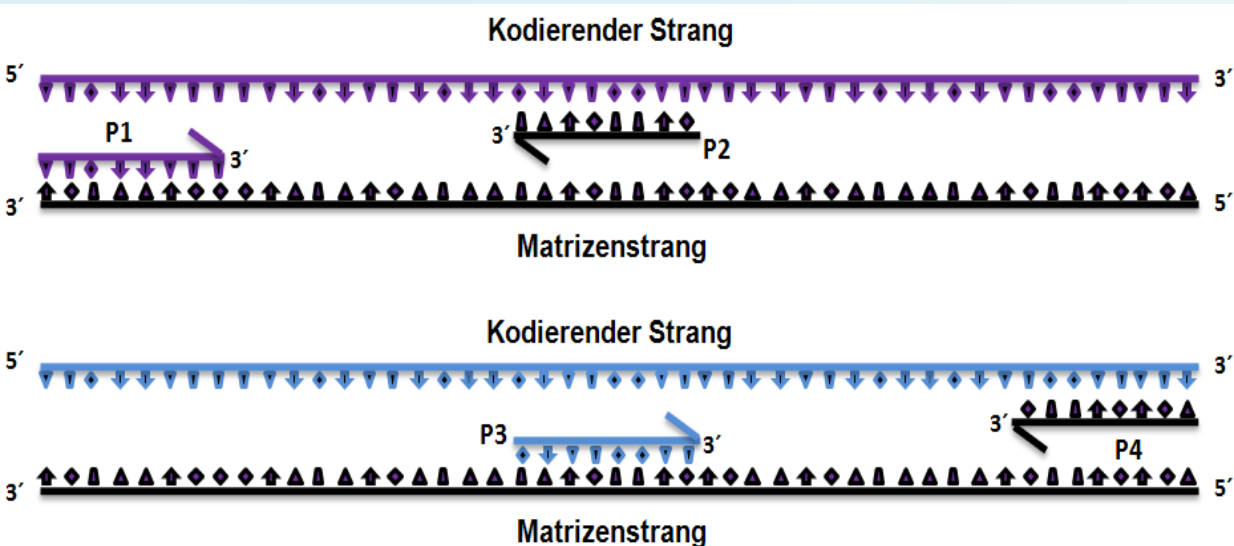


Abbildung 3.2: Verbindung zweier DNS-Stränge durch Overlap-Extension-PCR

### 3.3.4 DNS-Ligation

Mit Hilfe des pcDNS3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup> TA Expression Kit der Firma Invitrogen ist es möglich, PCR-Produkte in einen Plasmid-Vektor zu klonieren. Voraussetzung ist der Einsatz der Taq-Polymerase, die am 3'-Ende des PCR-Produktes einen matrizenunabhängigen Adenin-Überhang synthetisiert. Die Klonierung gelingt durch einen komplementären Überhang des TOPO-Vektors. Zusätzlich besitzt der Vektor eine kovalent gekoppelte Topoisomerase des Typ 1, die an speziellen Stellen doppelsträngiger DNS bindet und den Einzelstrang nach der Sequenz 5'-CCCTT spaltet (Shuman, 1991). Die entstehende Bindung zwischen dem Tyrosinrest 274 der Isomerase und einem Phosphatbaustein der DNS wird durch das 3'-OH Ende des Inserts attackiert und im Anschluss ersetzt. Nach Verknüpfung von Insert und Vektor kann sich die Isomerase von dem Plasmid lösen. Das Ligationsprodukt wird, wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben, in kompetenten Bakterien transformiert.

Die Durchführung der Klonierung lief nach folgendem Protokoll ab:

- 2 – 4 µl des PCR-Produktes wurde mit 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl<sub>2</sub>) versetzt und mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 5,5 µl aufgefüllt.
- Es folgte die Zugabe von 0,5 µl Vektor, der vorsichtig in den Ansatz eingerührt wurde.
- Die Inkubation erfolgte für 5 min bei RT bevor das Ligationsprodukt zur Transformation herangezogen wurde.

### 3.3.5 Kultivierung von Bakterien

In dieser Arbeit wurde mit zwei unterschiedlichen Bakterienstämmen gearbeitet. Diese wurden zur Vermehrung von Plasmid-DNS verwendet, die durch Transformation zuvor in die Bakterien eingebracht wurde. Die TOP-10 Bakterien und die kompetenten DH5 $\alpha$ -Bakterien wurden sowohl auf festen Nährböden als auch in Flüssigmedium kultiviert. Für die Kultivierung in Bakterien-schalen wurden die transformierten Bakterien aus einer Suspension auf sterilem LB-Agar ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht im Bakterieninkubator bei 37°C. Für die Vermehrung transformierter Bakterien in Flüssigmedium wurden diese in 2xYT-Medium als Ü/N-Kultur im beheizten Bakterien-schüttler (37°C) kultiviert.

Zur Selektion antibiotikaresistenter Klone wurde sowohl dem Agar als auch dem Flüssigmedium 100 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin zugegeben. Zur Lagerung konnten die Bakterien für einige Zeit bei 4°C aufgehoben werden. Im Anschluss wurden Sie gemäß der Vorschriften zur Entsorgung eines GVO's entsorgt.



### 3.3.6 Hitzeschock- Transformation von Bakterien

In der Molekularbiologie wird unter Transformation die Aufnahme von freier DNS in Prokaryoten verstanden. Unmittelbar vor der Transformation wurden die Zellen (TOP 10 oder kompetente DH5 $\alpha$ -Bakterien) auf Eis aufgetaut und ca. 100  $\mu$ l der Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt. 2  $\mu$ l des Ligationsansatzes wurden abgenommen und vorsichtig mit einer Pipettenspitze in die Bakteriensuspension eingerührt. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis folgte der „Hitzeschock“ für 30 sec bei 42°C im Wasserbad. Nach einer sofortigen Abkühlungsphase von 2 min auf Eis folgte die Zugabe von 250  $\mu$ l SOC-Medium (siehe Abschnitt 3.2.3). Dieser Ansatz wurde in einem Tischschüttelgerät Reax2000 (Heidolph) bei 37°C für 60 min geschüttelt, bevor die Zellen auf vorbereiteten LB-Agar-Schalen ausgestrichen und im Bakterieninkubator über Nacht vermehrt wurden. Im Anschluss konnten isolierte Antibiotika-resistente Kolonien in Flüssigmedium über Nacht vermehrt werden.

### 3.3.7 Präparation von Plasmid-DNS aus Bakterien

Der Aufschluss von Bakterien und die Isolation von Plasmid-DNS erfolgte aus den Ü/N-Bakterienkulturen. Dabei wurden zwei unterschiedliche Präparationsmethoden genutzt. Plasmid-DNS mit einem hohen Reinheitsgrad wurde mittels des Kits „NucleoBond PC 100“ (Macherey-Nagel) gewonnen. Das für Plasmid-DNS selektive Aufreinigungsprinzip beruht auf einer alkalischen SDS-Lyse der Zellen mit nachgeschalteter Anionenaustausch-Chromatographie. Diese Art der Aufreinigung wurde gewählt, wenn die gewonnene Plasmid-DNS für Transfektionen eukaryotischer Zellen verwendet werden sollte. Die Verfahrensschritte wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt:

- Initial wurde die Präparation durch Abzentrifugation der Bakterienkultur bei 4500 g (4°C) für 7 min begonnen.
- Nachdem der Überstand verworfen wurde konnte das entstandene Bakterienpellet in 4 ml Puffer S1 (enthält RNase) resuspendiert werden.
- Der Zugabe von 4 ml Puffer S2 folgte ein viermaliges Umdrehen der Reaktionsgefäße und eine 4 minütige Inkubation bei RT.
- Dem Ansatz wurde nun 4 ml Puffer S3 zugegeben, bevor der Ansatz 5 min auf Eis gestellt wurde.
- Die Suspension wurde mit Hilfe eines Filters auf eine mit 2,5 ml Puffer N2 equilibrierte Säule gegeben.
- Einem einmaligen Waschschrift mit 10 ml Puffer N3 folgte die Elution der gebundenen DNS mit 5 ml des Puffers N5.

- Nach der Präzipitation der DNS durch die Zugabe von 3,5 ml Isopropanol folgte ein 30minütiger Zentrifugationsschritt bei 12.000 g und 4°C.
- Das entstandene Pellet wurde mit 2 ml Ethanol (70%ig) gewaschen und erneut unter standardisierten Bedingungen abzentrifugiert.

Im Anschluss wurde die DNS in ca. 100 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. In den meisten Fällen wurde Plasmid-DNS eines höheren Reinheitsgrads in größeren Volumina benötigt. Somit wurden ca. 100 ml der Ü/N-Bakteriensuspension für eine sogenannte „Midi-Plasmid-Präparation“ verwendet.

Plasmid-DNS, die für PCR bzw. Restriktionsanalysen herangezogen werden sollte, wurde über ein Versuchsprotokoll isoliert, bei dem die Zellen über die alkalische Lyse aufgeschlossen wurden. Es genügte der Einsatz von 1,5 ml einer Bakteriensuspension zur erfolgreichen Durchführung. Aufgrund der geringeren Menge an isolierter Plasmid-DNS wird von einer „Mini-Präparation“ gesprochen.

- 1,5 ml einer Ü/N-Bakteriensuspension wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- Nach der Zentrifugation für 1 min bei 6.000 rpm (Zentrifuge 5417C, Eppendorf) folgte die Resuspension des Zellpellets in 200 µl S1 Puffer (Tris HCl 50 mM, EDTA 10 mM, RNase 100 µg/µl).
- Anschließend wurde die Zellsuspension mit 400 µl Lysepuffer B (0,2 M NaOH, 1% SDS) für 2 min bei RT inkubiert.
- Dem Ansatz wurde 300 µl Ammoniumacetat (7,5 M) zugefügt.
- Nach 10minütiger Inkubation auf Eis folgte das Zentrifugieren des Ansatzes bei 18.000 g für 15 min bei 4°C und die Überführung des Überstands in Reaktionsgefäße, die mit 500 µl Isopropanol befüllt waren.
- Ein drei- bis vierfaches Invertieren der Gefäße führte zur Fällungsreaktion.
- Ein erneuter Zentrifugationsschritt (14.000 rpm, 15 min, 4°C) sammelte die Plasmid-DNS in einem Bodenpellet.
- Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Reaktionsgefäß im Wasserbad getrocknet und anschließend mit ca. 40 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

Die längerfristige Lagerung von Plasmid-DNS erfolgte durch Kühlung bei -20°C.

### 3.3.8 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNS

Zur Überprüfung der Qualität isolierter Plasmid-DNS werden Endonukleasen eingesetzt, die DNS-Stränge an spezifischen Stellen zerschneiden. Danach liegt die DNS nicht mehr in ringförmig gefalteter Struktur vor und somit besteht die Möglichkeit, das Gewicht der einzelnen Stränge mittels der Agarosegelelektrophorese zu überprüfen. Ein Aufschluss über die exakte Basensequenz der einzelnen Stränge ist jedoch nur durch

eine Sequenzierung (in dieser Arbeit von Fa. GENterprise GmbH, Mainz durchgeführt) möglich.

Die Restriktionsanalysen wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl getätigt und die Inkubation erfolgte für mindestens 1 h bei zumeist 37°C. Abweichungen der Temperatur wurden gemäß Herstellerangaben in Einzelfällen vorgenommen.

### 3.3.9 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Separationsmethode, um Nukleinsäurefragmente entsprechend des Molekulargewichtes aufzutrennen. Antrieb zur Auftrennung der DNS stellt ein elektrisches Feld dar, das die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode wandern lässt. Die Wanderungsgeschwindigkeit steht in linearer Abhängigkeit zu der Ladungsdichte der Moleküle, die bei Nukleinsäuren in freier Lösung pro Nukleotid gleich groß ist. Der Trenneffekt erfolgt durch eine feste Trägermatrix, die Agarose. Die Poren der Agarosematrix sind gerade so groß, dass bei der Wanderung ein Reibungswiderstand entsteht. Je größer die Nukleinsäuren sind, desto größer ist der Widerstand und umso geringer die Wanderungsgeschwindigkeit.

Das Gießen von 1%igen Agarosegelen erfolgte nach folgender Vorgehensweise:

- Im Mikrowellengerät wurde Agarose (1% w/v) in TAE- Puffer aufgekocht.
- Nach leichtem Abkühlen folgte die Zugabe von Ethidiumbromid (3 µl einer 1%igen Lösung) mittels einer Einweg-Pipette.
- Vor dem endgültigen Erkalten wurde die Agarose in eine vorbereitete Gelkammer mit Kamm gegossen.
- Nach dem Erkalten des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Gelelektrophoresekammer gelegt.

Die Proben wurden mit DNS-Ladepuffer versetzt und mit einem Volumen von 15 µl in eine Geltasche eingebracht, nachdem die Gelelektrophorese-Kammer mit TAE-Puffer gefüllt wurde. Nach Zugabe eines DNS-Standards (1 kB Marker, MBI Fermentas) wurde eine Spannung von 120 V angelegt.

Die Visualisierung erfolgte auf einem Geldokumentationstisch unter UV-Licht-Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 256 nm. Dabei verstärkten die aromatischen Ringe des Ethidiumbromid die Fluoreszenz der Basenpaare der DNS. Die Nukleinsäurebanden wurden fotografiert und mittels Durchlichtscanner (Agfa Duo, Agfa) digitalisiert.

### 3.3.10 Elution von DNS aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung der DNS aus einem Agarosegel wurde das Nucleospin<sup>®</sup> Extraction Kit (Macherey Nagel) verwendet. Das zu isolierende DNS-Fragment wurde zunächst unter einer langwelligen UV-Lampe (302 nm) mit Hilfe eines Skalpells exakt aus dem Agarosegel herausgeschnitten und anschließend nach Angaben des Herstellers eluiert.

Diese Methode basiert auf einer Verflüssigung der Agarose mit anschließender Bindung der DNS durch Kieselsäure-Säulchen. Die Bindung gelingt, da die Eigenschaft von DNS ausgenutzt wird, sich in Gegenwart einer hohen Konzentration chaotroper Salze an Kieselsäure zu binden. Die Elution gelingt hingegen bei geringer Salzkonzentration und die DNS löst sich aus den Säulchen.

- Für die Gellyse wurde das ausgeschnittene Agarosestück gewogen.
- Pro 100 mg Gel wurde 200 µl NT-Puffer zugegeben. Der Ansatz inkubierte für 5 bis 10 min bei 50°C bis zur vollständigen Verflüssigung der Agarose.
- Nach der Zugabe des verflüssigten Gels auf das Kieselsäure-Säulchen erfolgte die Zentrifugation des Reaktionsgefäßes bei 11.000 g für 1 min.
- Der Zugabe von 600 µl Waschpuffer NT3 folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt.
- Nach der Trocknung der Säulen durch weitere 2 min in der Zentrifuge bei 11.000 g erfolgte die Elution mit ca. 50 µl NE-Puffer.

### 3.3.11 Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration

Die genaue Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen lässt sich durch die Aufnahme eines UV-Absorptionsspektrums bestimmen. Durch Messung der Extinktion in einem Spektralphotometer bei 260 nm kann die Konzentration von DNS oder RNS in einer Lösung bestimmt werden. Die Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNS. Somit berechnet sich die Konzentration nach folgender Formel:

---

$$\text{DNA-Konzentration} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ [}\mu\text{g/mL]}$$

---

Die Reinheit der DNS in einer Probe kann durch das Verhältnis der Absorption von 260 nm : 280 nm abgeschätzt werden. Saubere DNS-Proben zeigen einen Extinktionsquotienten von 1,8 bis 2,0. Bei Verunreinigungen durch Proteine oder Phenole sinkt der Wert unter 1,8 ab.

### 3.4 Zellbiologische Methoden

#### 3.4.1 Allgemeine Zellkultivierung

Als Standardbedingung für die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien wurde eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und einer Temperatur von 37°C im Begasungsbrutschrank (Heraeus, Zürich) gewählt. Alle Arbeiten zur Kultivierung wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Ein Passagieren der Zellen erfolgte regelmäßig jeden zweiten bis vierten Tag, abhängig von Wachstum und der Konfluenz der Zellen. Zur Expansion wurden die Zellen nach einer ca. 3minütigen Behandlung mit 1 ml Trypsin/EDTA mit ihrem Kulturmedium von der Bodenfläche der Zellkulturschale bzw. -flasche abgespült, im Verhältnis 1:5 bis 1:10 ausgedünnt (Zellzahlermittlung über Neubauer-Zählkammer), mit frischem Medium versetzt und in eine neue Zellkulturschale bzw. -flasche ausgesät. Spätestens nach der zehnten Passage der Zellen wurden diese geerntet, gezählt und eingefroren.

Die Kultivierung erfolgte in Abhängigkeit der Ansprüche der jeweiligen Zelllinie in unterschiedlichen Zellkulturmedien (siehe Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2: Zelllinien und Zellkulturbedingungen**

Zelllinie	Kulturmedium	Mediumzusätze
<b>IMR90S</b>	EMEM (High Glucose)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hepes (1%ig)</li> <li>➤ Natrium- Pyruvat (1%ig)</li> <li>➤ Penicillin / Streptomycin (1%ig),</li> <li>➤ hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (15%ig)</li> </ul>
<b>HeLa COS-7 MelJuso</b>	DMEM (High Glucose)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hepes (1%ig)</li> <li>➤ Natrium- Pyruvat (1%ig)</li> <li>➤ Penicillin / Streptomycin (1%ig),</li> <li>➤ hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (10%ig)</li> </ul>
<b>WT49 BM92</b>	RPMI 1620	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hepes (1%ig)</li> <li>➤ Natrium- Pyruvat (1%ig)</li> <li>➤ Penicillin / Streptomycin (1%ig),</li> <li>➤ hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (10%ig)</li> </ul>

### 3.4.2 Ernte, Zählen und Lyse von Zellen

Die Ernte von kultivierten Zellen dient als Voraussetzung für weitere Untersuchungen, wird aber auch in der täglichen Anwendungsroutine der Zellkultur genutzt. Hierzu wurden die abzulösenden Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA versetzt. Nach ca. 3 min im Brutschrank ließen sich die gelösten Zellen mit dem jeweiligen Kulturmedium von der Bodenfläche abspülen und in ein 15 ml bzw. 50 ml steriles Röhrchen überführen. Es folgte ein zweimaliges Waschen der sedimentierten Zellen mit sterilem PBS (PAA, Österreich), indem sie bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus), der Überstand verworfen und das Zellsediment erneut in PBS aufgenommen wurde.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels einer Neubauer-Kammer. Hierzu wurde ein leicht angefeuchtetes Deckgläschen auf die Kammerstege geschoben, so dass anhand von sichtbaren Newton'schen Ringen die passgenaue Lage erkennbar war. Die zu untersuchende Zellsuspension wurde 1:3 mit Trypanblau verdünnt und mittels Pipette in den Raum zwischen Zählkammerboden und Deckglas gefüllt. Gezählt wurden die Zellen in vier B-Feldern (Großquadrate) unter Verwendung eines binokularen Phasenkontrastmikroskops bei 100-facher Vergrößerung. Aus dem resultierenden arithmetischen Mittel der vier Quadrate wurde, jeweils unter Berücksichtigung des Ausgangsvolumens der Zellsuspension, die Zellzahl pro ml berechnet.

Zur Vorbereitung von biochemischen Analysen der Zellproteine folgte die Lyse der Zellen. Die kultivierten Zellen wurden zunächst gezählt und auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen eingestellt. Die eigentliche Lyse wurde durch die Zugabe von Lysepuffer (ST-Puffer [10mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5] + 0,5%igem NP-40 + Complete Protease Inhibitoren) erreicht. Die Inkubationszeit betrug 20 min auf Eis, wobei sich die eingesetzte Menge an Lysepuffer nach der Anzahl der zu lysierenden Zellen ausrichtete (50  $\mu$ l eiskalter Lysepuffer für  $1 \times 10^6$  Zellen). Anschließend wurden nicht gelöste Zellbestandteile sowie Zellkerne bei 4°C durch Zentrifugation bei 18.000 g für zehn Minuten abgetrennt. Bis zur Weiterverarbeitung konnten die lysierten Zellen bei -20 °C eingefroren werden.

Eine langfristige Lagerung der geernteten Zellen erfolgte durch Einfrieren der Proben in Flüssigstickstoff oder in der Kühlung bei -80°C. Dazu wurden die geernteten Zellen in FCS (PAA, Österreich) mit einem Zusatz von 10%igem DMSO (Sigma Aldrich, München) aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und zunächst bei -20 °C schonend eingefroren. Im Anschluss lagerten die Kryoröhrchen dann bei mindestens -80 °C. Das Auftauen dieser Zellen erfolgte in 50 ml sterilem PBS. Anschließend wurde das DMSO abgetrennt, indem die Zellen für 5 min bei 1.200 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) abzentrifugiert wurden. Die weitere Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen.

### 3.4.3 Transiente Expression von MHC-II-Proteinen in IMR90S-Zellen

Unter Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNS in eukaryotische Organismen verstanden. Die in der vorliegenden Arbeit angewandten transienten Transfektionen wurden mit Hilfe des JetPei™ Transfektionsreagenz (Biomol, Hamburg) durchgeführt. Das kationische Polymer JetPei™ (Polyethylenimin) bildet Komplexe mit der Plasmid-DNS. Die positive Nettoladung dieser Komplexe ermöglicht die Interaktion mit anionischen Glykoproteinen auf der Zelloberfläche und anschließend die Aufnahme der JetPei™-DNS-Komplexe in die Zelle durch Endozytose.

Um eine optimale Transfektionsrate zu erzielen, wurden ca.  $5 \times 10^5$  IMR90S-Zellen gezählt und in eine Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät. Die Zellen setzten sich über Nacht in ca. 2 ml frischem EMEM-Medium auf der Bodenfläche ab. Nach Ablauf von 24 Stunden wurden die einzelnen Vertiefungen jeweils zweimal mit PBS gewaschen und mit dem Gemisch aus Plasmid-DNS, JetPei™ und Zellkulturmedium aufgefüllt.

Zu diesem Zweck wurde 0,5 µg DNS mit 3 µl JetPei™ pro 50 µl Gesamtvolumen vermischt, 20 min bei RT inkubiert und anschließend langsam auf die Zellen mit frischem Zellkulturmedium (ca. 1 ml pro Vertiefung) getropft.

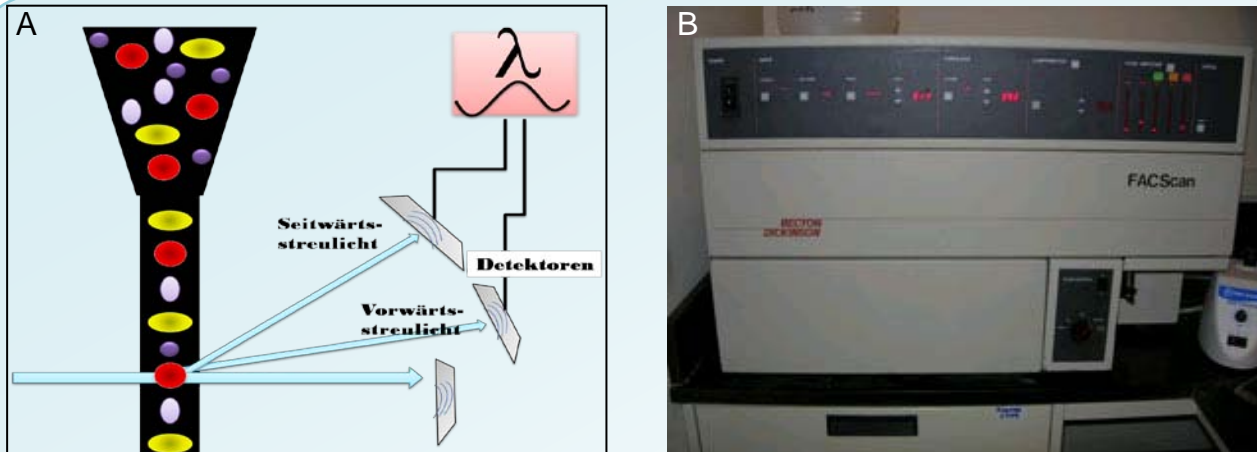
Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden ist nach Herstellerangaben keine weitere Aufnahme von DNS in die Zellen möglich. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen mit frischem Zellkulturmedium versehen und bis zur Ernte weitere 42 Stunden im Brutschrank bei Standardbedingungen kultiviert.

### 3.4.4 Durchflusszytometrie/ Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)

#### Hintergrund

Der Ausdruck "FACS" ist ein registriertes Markenzeichen der Firma Becton-Dickinson und steht eigentlich für „Fluorescence Activated Cell Sorting“ ([www.bd.com](http://www.bd.com)). Diese Bezeichnung hat sich aber inzwischen als Ausdruck für Durchflusszytometrie eingebürgert. Bei dieser Analysetechnik können verschiedene Eigenschaften von Zellen oder anderen Teilchen untersucht werden, während diese „Teilchen“ vereinzelt durch eine dünne Messkammer fließen, und von der Seite mit Laserlicht bestrahlt werden. Bei ungehinderter Passage des Lichtes durch die Flusszelle entsteht kein Streulicht. Passiert eine Zelle die Messzelle, so wird das Licht abgelenkt und es entsteht Streulicht. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren zu finden sind, desto größer ist das entstehende Streulicht. Zwei Messstellen gelten als Standard für das Streulicht:

1. Vorwärtsstreulicht (FSC):
  - in Richtung des nicht abgelenkten Lichtstrahls
  - abhängig von der Größe der Zelle
2. Seitwärtsstreulicht (SSC):
  - etwa im 90° Winkel zum ursprünglichen Strahl
  - abhängig von den internen Strukturen („Granularität“) der Zelle



**Abbildung 3.3: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers**

- A) Einzelzellen werden durch die Messzelle geschleust. Während der Passage wird ein Laserstrahl auf die vereinzelteten Zellen geworfen, der je nach Struktur und Größe der gemessenen Zelle in unterschiedlichem Winkel abgelenkt wird. Anhand der Messung der Wellenlänge  $\lambda$  des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts kann eine Aussage über Zellgröße und Granularität getroffen werden.
- B) Abbildung eines FACScan® (Becton-Dickinson)

Um weitere Eigenschaften von Zellen untersuchen zu können, kann das gesuchte Merkmal über fluoreszierende Antikörper markiert werden. Eigenschaften von nicht-permeabilisierten Zellen können nur auf der Zelloberfläche detektiert werden.

Der in dieser Arbeit verwendete FACScan (BD, USA) besitzt einen Laser mit 488 nm (Argonion-Laser) und Filter für die folgenden Wellenlängen:

**Tabelle 3.3: Filter des FACScan und zugehörige Kennzeichnung**

Filter	Kennzeichnung	Fluoreszenzfarbstoff
530/30	FL-1 (Fluoreszenz 1)	GFP, Alexa 488
585/42	FL-2 (Fluoreszenz 2)	Phycoerythrin, Alexa 588

Durch diese Filtereinstellungen und eine Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Fluoreszenzspektren ist eine gleichzeitige Detektion mehrerer Merkmale im FACScan möglich.



Nach der Messung werden die Zellen in sogenannten Dot-Plots dargestellt, wobei nicht interessierende Zellen und Zelltrümmer durch das sogenannte „Gaten“ ausgeblendet werden. Die Darstellung der gemessenen Zellen erfolgte in dieser Arbeit über Dot Blots, die logarithmisch skaliert wurden. Dabei wurde standardmäßig das SSC auf der y-Achse und die jeweilige Fluoreszenz auf der x-Achse gelegt.

### Durchführung

Die zu untersuchenden Zellen wurden, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, gezählt, ausgesät und transient transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen und durch fünfminütige Inkubation in einer PBS / 2,5mM EDTA-Lösung von der Bodenfläche abgelöst. Dabei wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen für die FACS-Analyse verwendet. Die restlichen Zellen der gleichen Probe wurden für die SDS-PAGE und Western Blot verwendet, um eine erfolgreiche Transfektion nachzuweisen.

Die FACS-Probe wurde nach folgendem Protokoll aufbereitet, wobei alle Schritte bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt wurden:

- Zunächst erfolgte das Waschen der Zellen mit 300 µl FACS-Puffer mit anschließendem Zentrifugationsschritt bei 1.200 rpm für 5 min (Varifuge 3.0 R, Heraeus).
- Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50 µl FACS-Puffer aufgenommen.
- Es folgte eine halbstündige Inkubation der Zellen mit einem Primärantikörper, wobei die Konzentration in Abhängigkeit des jeweiligen Antikörpers gewählt wurde.
- Die Probe wurde erneut zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 50 µL FACS- Puffer aufgenommen.
- Die Zellen wurden für 30 min mit dem Farbstoff 7-AAD und einem Sekundärantikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 gekoppelt ist, inkubiert.
- Die eigentliche Messung der Zellen erfolgte mittels eines, auf die jeweilige Zellpopulation, voreingestellten FACScan-Durchflusszytometers.
- Fluoreszenz 1 (FL 1) stellt das Zellmerkmal, dass durch den Erstantikörper markiert wurde, im Dot Blot dar.
- Fluoreszenz 2 (FL 2) zeigt die Zellen an, in die der Farbstoff 7-AAD eindringen konnte. Fluoreszenz 2- detektierte Zellen entsprechen dem Totzellenanteil der Zellpopulation.

## 3.5 Biochemische Methoden

### 3.5.1 Immunpräzipitation

#### Hintergrund

Die Methode der Immunpräzipitation (IP) dient in der Biochemie der Isolierung spezifischer Proteine aus Proteingemischen, wie z.B. Zelllysaten. Zudem kann eine IP in Form einer Ko-Immunpräzipitation den Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen liefern.

Die Verwendung von Protein A- bzw. Protein G-Sepharose (Amersham, Freiburg) ermöglicht durch Sedimentation, die einzelnen Proteine spezifisch vom Lysat abzutrennen. Zur Bildung der Immunkomplexe aus Sepharose und Protein werden Proteindeterminanten-spezifische Antikörper verwendet, die über ihre konstante Region an die Sepharose binden. In Abhängigkeit des Einsatzes von Protein A oder Protein G können verschiedene Antikörper eingesetzt werden.

**Tabelle 3.4 Differenzierung von Protein-Sepharose**

Sepharose	Spezifität				
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM
Maus					
Protein A-Sepharose	+	++	++	-	+
Protein G-Sepharose	++	++	++	+	-

Zur Verhinderung einer unspezifischen Bindung von Proteinen an die Sepharose-Matrix kann eine Vorinkubation (Präadsorption) mit Sepharose CL4B durchgeführt werden.

Die Protein-Protein-Wechselwirkung kann durch den Einsatz eines weiteren spezifischen Erstantikörpers nach SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen werden.

#### Durchführung

##### *Isolation von Proteinen aus Zelllysaten*

- $6 \times 10^6$  Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät, transient transfiziert und geerntet.
- Die Zellen wurden durch die Inkubation für 30 min in 250  $\mu$ l eiskaltem Lysepuffer (ST-Puffer + 0,5%igem NP-40 + Complete Protease Inhibitoren) lysiert.
- Anschließend wurden tote Zellen, Zellpartikel und -trümmer für 20 min bei 18.000 g bei 4°C abzentrifugiert.
- Es folgte eine Vorinkubation mit CL4B-Sepharose (Pharmacia, Freiburg) für 1 h in einem Volumen von 250  $\mu$ l.
- Die CL4B-Sepharose-gebundenen Proteine wurden bei 4.000 rpm für 3 min abzentrifugiert (Zentrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg).
- Die spezifische Immunpräzipitation erfolgte durch die Zugabe von 15  $\mu$ l Protein A- / G-Sepharose (Amersham, Freiburg) und einem spezifischen Antikörper in einem Gesamtvolumen von 250  $\mu$ l. Die Inkubation erfolgte für 12 h (4°C) auf dem Sonnenrad.

- Es folgte die Sedimentation des Sepharose-Protein-Komplexes durch Zentrifugation bei 4.000 rpm für 3 min (Zentrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg).
- Der präzipitierte Komplex wurde dreimal mit jeweils 300 µl Waschpuffer (ST-Puffer + 0,25% NP-40) gewaschen und je Waschvorgang bei 4.000 rpm für je 3 min abzentrifugiert.
- Das zentrifugierte Pellet wurde in 30 µl reduzierenden SDS-Probenpuffer (Lämmli, 1970) für 5 min bei 95°C aufgekocht.
- Die weitere Probenverarbeitung erfolgte durch SDS-PAGE und Western Blot.

### *Isolation von Proteinen auf der Zelloberfläche*

- $6 \times 10^6$  Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät, transient transfiziert und geerntet.
- Die Behandlung der Zellen mit dem Primärantikörper LG-II-612.14, der DQ $\beta$ -Moleküle von der äußeren Seite binden kann, erfolgte in FACS-Puffer (PBS, 2% FCS, 0,01% Na-Azid) für 60 min bei 4°C.
- Die Zellen wurden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und durch Zentrifugation für 5 min bei 1.200 rpm (Varifuge 3.0 R, Heraeus) erfolgte die Bildung eines Bodenpellets.
- Die Lyse der Zellen wurde durch die Inkubation für 30 min in 250 µl eiskaltem Lysepuffer (ST-Puffer + 0,5%igem NP-40 + Complete Protease Inhibitoren) erreicht.
- Anschließend wurden tote Zellen, Zellpartikel und -trümmer für 20 min bei 18.000 g bei 4°C abzentrifugiert.
- Die weiteren Behandlungsschritte sind identisch der Isolation von Proteinen aus Zelllysaten (siehe vorheriger Abschnitt).

## **3.5.2 Abbau von N-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden**

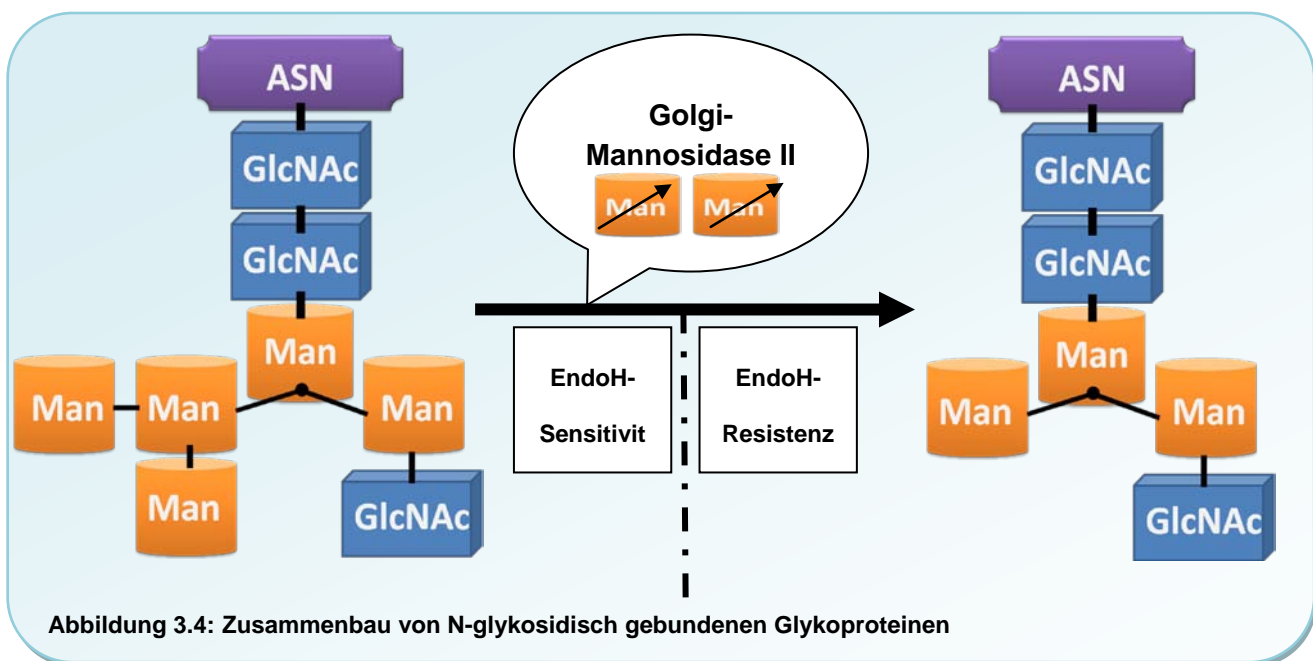
### Hintergrund

Viele sekretorische Proteine oder Membranproteine tragen kovalent gebundene Oligosaccharideinheiten, welche entweder durch N-glykosidische Bindungen an Asparagin oder O-glykosidisch an Serin-/Threoninseitenketten gebunden werden. N-glykosidische Kohlenhydrate enthalten dabei immer den gleichen Kern aus Monosacchariden (Stryer, 1999).

*Core Glykosylierung:* Die Übertragung der ersten Oligosaccharideinheit auf das Peptid erfolgt durch das Carrier-Lipid Dolicholphosphat, das in der ER-Membran lokalisiert ist. Durch schrittweise Addition von Monosacchariden entsteht eine Core-Oligosaccharideinheit aus zwei Molekülen N-Acetylglucosamin, neun Mannose- und drei Glukosemolekülen. Das Dolichol mit seiner Kohlenhydratkette wird durch die Membran auf die

Lumenseite befördert, wo der aus 14 Monosacchariden bestehende Zucker auf den Asparinrest des Proteins übergeben wird.

*Terminale Glykosylierung:* Ein richtig gefaltetes Protein verlässt anschließend das ER und wird über Transportvesikel zum Golgi Komplex transportiert. Hier werden O-glykosidisch gebundene Zuckerreste angefügt und N-gebundene Kohlenhydrate über verschiedene Wege modifiziert. Als Resultat dieser erneuten Modifikationen entstehen komplexe Oligosaccharideinheiten. Dabei ist die Struktur der N-gebundenen Kohlenhydrateinheiten abhängig von der Sequenz und der Konformation des zu glykosylierenden Proteins, sowie der Zusammensetzung der Glykosyltransferasen der Golgi-Kompartimente.



### Methode

Der heutige Wissensstand über die Lokalisierung des Zusammenbaus von N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharideinheiten wurde in dieser Arbeit im Zusammenhang mit dem Einsatz des Enzyms EndoglykosidaseH (EndoH, E<sub>H</sub>) zum Nachweis des intrazellulären Transportweges von Zellproteinen genutzt. Sobald ein Protein im Golgi Komplex durch das Enzym Mannosidase-II modifiziert wurde, kann durch die Behandlung mit EndoH kein Zuckerrest mehr vom Protein abgespalten werden. Hingegen führt der Einsatz des Enzyms N-Glykosidase F (PNGaseF) auch nach der terminalen Glykosylierung noch zur Abspaltung von N-glykosidisch gebundenen Zuckerresten. Es verbleibt nur ein Oligosaccharidcore am Protein, das bei Darstellung in der SDS-Gelelektrophorese keinen sichtbaren Unterschied im Molekulargewicht im Vergleich zu EndoH-inkubierten Proteinen aufweist.

### Durchführung

- Die Zellen wurden in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät, transient transfiziert und nach der Ernte lysiert.
- Die Zelllysate wurden mit reduzierendem Probenpuffer im Verhältnis 1:4 versetzt und bei 95°C im Thermocycler (T3, Biometra, Göttingen) aufgekocht.
- Anschließend wurden jeweils 3 Ansätze (siehe Tabelle 2.5) generiert:
- Alle Ansätze wurden für 12 h bei 37°C im Thermocycler inkubiert.
- Die weitere Probenverarbeitung erfolgte über SDS-PAGE und Immunoblotting.

**Tabelle 3.5: Rezept für den Verdau durch EndoH und PNGaseF**

Ansatz	Zusammensetzung
Unverdaut	20 Lysat + 3 µl G5 + 7 µl ST-Puffer
EndoH	20 µl Lysat + 3 µl G5 + 6,5 µl ST-Puffer + 0,5 µl EndoH
PNGaseF	20 µl Lysat + 3 µl G7 + 3 µl NP-40 (10%ig) + 3,7 µl ST-Puffer + 0,3 µl PNGase F

### 3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (Lämmli, 1970) durchgeführt. Bei diesem Verfahren durchlaufen die Proben zunächst ein großporiges, Polyacrylamid-ärmeres Sammelgel, in dem sich die Proteine in einer scharf abgegrenzten Zone fokussieren sollen. Eine weitere Aufgabe des Sammelgels ist die Konzentration der Proteine an der Front zum darauffolgenden Lauf- bzw. Trenngel. In diesem engporigen Gel, das einen höheren Gehalt an Polyacrylamid enthält, geschieht die eigentliche Auftrennung der SDS-umhüllten Proteine in einem elektrischen Feld nach dem Siebeffekt.

Für die Experimente dieser Arbeit wurden Minigele in Glasschablonen mit der Dicke von 1,5 mm der Rezeptur nach Tabelle 2.5 gegossen. Die Polymerisation des Gels erfolgte bei RT und dauerte ca. 30 min.

**Tabelle 3.6: Rezept zum Gießen eines SDS-Polyacrylamidgels**

Sammelgel (4%ig)		Trenngel (12%ig)	
Lösung A	1,5 ml	Lösung D	1 ml
Lösung C	5,1 ml	Lösung C	1 ml
20 % SDS	60 µl	A. dest. (blau)	4 ml
A. dest.	5,34 ml	10 % APS	80 µl
10 % APS	80 µl		

Eine Probenvorbereitung ist notwendig, damit weder Eigenladungen der Proteine noch die Faltung der Peptide die Auftrennung im Gel stören. Zu diesem Zweck wurde dem gewonnenen Zelllysat im Verhältnis 1:4 reduzierender SDS-Probenpuffer (vierfach konzentriert) zugesetzt. Reduzierender Probenpuffer enthält  $\beta$ -Mercaptoethanol, das die inter- und intramolekularen Disulfidbrücken zerstören kann. Nach Zusatz des Probenpuffers wurden die Proben kurz bei Raumtemperatur inkubiert oder bei 95°C für 5 min aufgeköcht. Durch das Detergenz SDS im Probenpuffer und das Aufkochen werden die Proteine denaturiert. Denaturierte Proteine sind ungefaltet und nahezu linear geformt. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt somit von der Peptidgröße ab. Die Auftrennung wird als diskontinuierlich bezeichnet.

In die Taschen des Sammelgels wurden in der Regel 15  $\mu$ l einer Probe aufgetragen. Eine Tasche des Gels wurde mit einem Molekulargewichtsstandard befüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer mit Laufpuffer (250mM Tris, 192mM Glycin, 1% (w/v) SDS) gefüllten Elektrophoresekammer (cti, Idstein). Es wurde eine Spannung von 80 V angelegt, bis die Proben das Ende des Sammelgels erreichten. Während der Trenngelpassage wurde eine Anpassung der angelegten Spannung auf 120 V vollzogen.

### 3.5.4 Western Blot

Zur Westernblot-Analyse wurden die aufgetrennten Proteine mittels Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. In dieser Arbeit wurde die „semi-dry“-Technik angewendet. Hierbei wurden zwei in Transferpuffer (50 mM Tris, 40 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,4 % SDS) getränkte Whatman-Papierstreifen in eine Elektrotransferapparatur (Biometra, Göttingen) gestapelt. Darauf folgten die Nitrozellulosemembran (Protran, Whatman) und das Gel aus der vorangegangenen SDS-PAGE, das zuvor zehn Minuten in ddH<sub>2</sub>O gelegt wurde.

Abschließend wurden auf das Gel zwei in Transferpuffer getränkte Whatman-Papierstreifen aufgelegt. Der eigentliche Transfervorgang erfolgte unter Anlegen einer Spannung von 10 V für 45 min. Antreibende Kraft ist somit ein elektrisches Feld, das die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe zur Wanderung auf die Nitrozellulosemembran zwingt. Die Transferqualität wurde durch Färbung mit Ponceau S überprüft. Die Banden des Molekulargewichtsstandards wurden auf der Membran durch Bleistiftmarkierungen dauerhaft sichtbar gemacht. Die Entfärbung gelang durch einen Waschschrift der Membran mit Blot-Waschpuffer (PBS-Tween).

Ein 30minütiges Wippen der Membran in Blockierlösung (Roti-Block™) führte zu einer Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen, bevor ein weiterer sorgfältiger Waschvorgang mit PBS-Tween durchgeführt wurde. Zur Spezifizierung der Protein-

banden erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden Erstantikörper, der spezifisch gegen das jeweils zu untersuchende Protein gerichtet ist. Nach drei weiteren, gründlichen Waschschritten folgte eine Inkubation für 45 min mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper.

Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Bindungen wurde nach einem erneuten Waschschriff die Nitrozellulosemembran für 1 min mit ECL-Reagenz (NEN) inkubiert. Das Reagenz wurde als Substrat für die an den Zweitantikörper gekoppelte HRP eingesetzt. Die bei der Reaktion entstehende Lumineszenz konnte durch Auflegen eines Röntgenfilms (AGFA) in der Dunkelkammer sichtbar gemacht werden. Die Expositionszeiten waren von der Signalstärke abhängig und konnten zwischen einigen Sekunden und mehreren Minuten schwanken. Für die Entwicklung der Röntgenfilme wurde die Entwicklermaschine Curix60 (Agfa, Leverkusen) genutzt. Die Digitalisierung der belichteten Röntgenfilme erfolgte mittels eines Durchlichtscanners (Agfa Duo).

### 3.6 Angewandte PC-Software

- Alignments
  - Vector NTI Version 11
  - NCBI-Datenbank
  - IMGT/HLA-Datenbank
  - DNS-Converter, bioinformatics.org
  - pDRAW32 Version 2007
- Darstellungen für die Durchflusszytometrie
  - WinMDI, Miscellaneous Software
- Datenbanken:
  - IMGT / HLA (EBI)
  - NCBI / HLA
  - Allele frequencies
- Datenverarbeitung
  - Microsoft Excel 2007
- Graphiken und Schemata
  - Microsoft PowerPoint 2007
- PDF-Erstellung
  - Cute-PDF, Acro Software
- Textverarbeitung
  - Microsoft Word 2007

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Isolierung von Klasse-II-Molekülen aus eukaryotischen Zelllinien

Um möglichst umfassende und genaue Aussagen über den Zusammenbau von DQ-Untereinheiten, den Transport der Heterodimere und deren Abhängigkeit von der Invarianten Kette treffen zu können, sollte die bestehende Genbank der Arbeitsgruppe erweitert werden. Aus menschlichen Tumorzellen wurden weitere DQ-spezifische cDNAs kloniert. Zu diesem Zweck wurden drei unterschiedliche humane Zelllinien mit einer zuvor sichergestellten Klasse-II-Expression ausgewählt.

Zur Gewinnung von cDNS aus den Zelllinien MeJuso (MJ), BM92 und WT49 wurde die RNS aus den Zellen isoliert und anschließend durch den Einsatz einer Reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben. In der folgenden PCR wurden aus der cDNS durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide, die cDNS bestimmter HLA-Klasse-II-Untereinheiten amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und entsprechend ihres Molekulargewichtes aus dem Gel ausgeschnitten. Nach der Aufreinigung der DNS aus der Agarose wurde der jeweilige Ansatz in den pcDNS3.1-Expressionsvektor (Invitrogen) kloniert. Dieser Vektor kodiert am 3'-Ende der Klonierungsstelle für einen V5-His-Anhang. Die klonierten Moleküle enthalten an ihrem C-Terminus einen zusätzlichen V5-His-Anhang, der eine spezifische Detektion in späteren Analysen ermöglicht.

Die anschließende Transformation erfolgte in TOP10 Bakterien. Jeweils zehn Bakterienklone wurden in Flüssigmedium vermehrt. Die enthaltene Plasmid-DNS wurde isoliert. Zur Überprüfung der Klonierung wurde ein Restriktionsverdau mit anschließender Auftrennung der DNS-Fragmente nach ihrer Größe herangezogen. Um zu überprüfen, ob sich die klonierten MHC-II-Untereinheiten exprimieren lassen, wurden COS-7 Zellen mit der Plasmid-DNS transient transfiziert. Nach der Lyse der Zellen und der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE erfolgte die Western Blot-Analyse mit einem Antikörper, der gegen das V5-Epitop gerichtet ist. Eine Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNS führte die Firma *GENterprise* (Mainz) durch. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit Einträgen der IMGT/HLA-Datenbank verglichen und auf diese Weise das Allel der HLA-II-Untereinheit bestimmt.

**Tabelle 4.1: Übersicht über HLA-Allele eukaryotischer Zelllinien**

Zelllinie	HLA-Allel	Anhang	Klonierungsvektor	Vorwärts- primer	Rückwärts- primer
MeJuso	DQB1*0201	6D4	pcDNS 3.1 / V5-His-TOPO	Ty1	Ty2
MeJuso	DPB1*1301	V5 His	pcDNS 3.1 / V5-His-TOPO	Ty9	Ty10
BM92	DQA1*0301	*	*	Ty3	Ty4
BM92	DQB1*0302	*	*	Ty1	Ty2
WT49	DRB1*0301	*	*	Ty5	Ty6
WT49	DQA1*0501	*	*	Ty3	Ty4
WT49	DQB1*0201	*	*	Ty1	Ty2
WT49	DPA1*0103	*	*	Ty7	Ty8
WT49	DPB1*0401	*	*	Ty9	Ty10

\* Diese Allele existierten bereits in der DNS-Bank der Arbeitsgruppe und mussten nicht erneut kloniert werden.



In Tabelle 4.1 sind die Typisierungsergebnisse der Sequenzierung in Zugehörigkeit zu den entsprechenden Ausgangszelllinien dargestellt. Die Allele DQB1\*0201 und DPB1\*1301 konnten neu kloniert und der Genbank der Arbeitsgruppe zugefügt werden.

## **4.2 Erhöhung der Oberflächenexpression von Klasse-II-Molekülen nach Expression der Invarianten Kette**

In den folgenden Abschnitten sind die Versuchsergebnisse dargestellt, die Hinweise auf den erfolgreichen Zusammenbau, den Transport und eine Chaperonabhängigkeit von HLA-Molekülen zulassen. Um diesbezüglich Erkenntnisse zu erlangen wurden charakteristische Durchgangspunkte der Klasse-II-Heterodimere auf ihrer Transportroute vom ER bis zur Zelloberfläche untersucht. Die Passage des Golgi Apparats wurde anhand der N-Glykanreifung untersucht, die Lokalisierung der Heterodimere in MIIC-Kompartimenten konnte anhand des spezifischen Markers CD63 überprüft werden und als Ziel des intrazellulären Transports wurde die Oberflächenexpression der Klasse-II-Moleküle untersucht.

### **4.2.1 Untersuchung der N-Glykanreifung von HLA-DR und -DP in Abhängigkeit der Invarianten Kette**

Anhand der Untersuchung der N-Glykosylierung der HLA-Moleküle können Rückschlüsse auf die Konformation der Moleküle, aber auch über einen erfolgreichen Zusammenbau im ER gemacht werden (Kwok et al., 1993). Der Nachweis der Reifung der N-gebundenen Kohlenhydrate ist Beleg für die richtige Faltung eines Klasse-II-Rezeptors und zeigt das Passieren des Golgi Komplexes auf dem Weg zu den MIIC-Kompartimenten an. Die Modifikation der N-Glykane der HLA-II-Moleküle während des intrazellulären Transports durch den Golgi Apparat hat eine Resistenz gegenüber dem Enzym EndoglykosidaseH (EndoH) zur Folge. Somit kann der Enzymeinsatz genutzt werden, um die Kohlenhydratreifung der N-Glykane eines Proteins zu untersuchen. Proteine mit EndoH-resistenten N-Glykanen besitzen nach Behandlung mit EndoH gegenüber einem sensitiven Protein ein höheres Molekulargewicht (ca.5 kDa) und können somit in der SDS-PAGE aufgetrennt werden. Standardmäßig wird eine EndoH-behandelte Probe mit einer unbehandelten Probe und einer Probe, die mit dem Enzym N-Glykosidase F (PNGaseF) behandelt wurde, verglichen. Die Inkubation mit PNGaseF

entfernt im Gegensatz zu EndoH alle gebundenen N-Glykane und hinterlässt ein N-deglykosyliertes Protein.

Anhand der Untersuchung der N-Glykanreifung der Klasse-II-Moleküle DR und DP sollte der Einfluss der li auf die Stabilisierung der Heterodimere und deren intrazellulärer Transport durch den Golgi Komplex nachgewiesen werden. Für die Versuchsdurchführung wurde eine humane Lungenfibroblastenzelllinie (IMR90S) verwendet. Diese Zellen wurden mit einer HLA-DP Allelkombination (DPA1\*0103/DPB1\*0401) bzw. mit HLA-DR Untereinheiten (DR $\alpha$ /DRB1\*0101) mit und ohne li transient transfiziert. Ca. 48h nach der Transfektion wurden die IMR90S-Zellen lysiert und anschließend mit den Enzymen EndoH und PNGaseF behandelt. Der unbehandelten Probe wurde ST-Puffer zugesetzt. Zur Kontrolle der erfolgreichen Expression wurden alle drei Ketten anhand eines spezifischen Antikörpers im Zellysate nachgewiesen (Abbildung 4.1; Spuren 7-10). Die  $\alpha$ -Ketten wurden mittels eines Anti-V5-Primärantikörpers, die  $\beta$ -Ketten anhand des LG-II-612.14-Antikörpers und die li anhand des Antikörpers Bu43 identifiziert. Sowohl die enzymbehandelten Proben als auch die Expressionskontrollen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf Nitrozellulose übertragen.

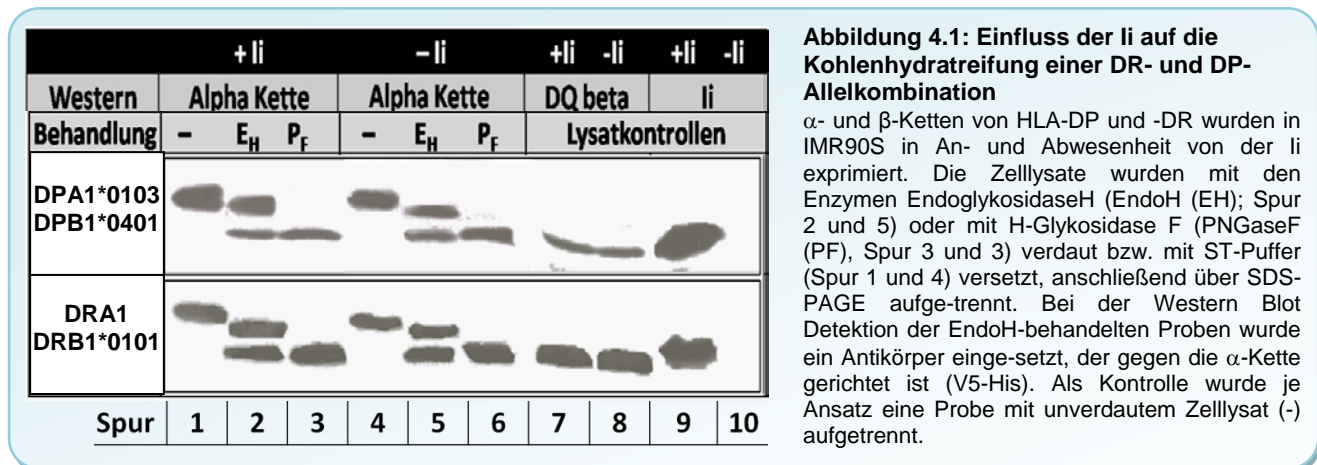
Die Ergebnisse aus der Immunoblotanalyse der EndoH-behandelten Proben sind in Abb. 4.1 dargestellt. Dabei ist in Spur 1 und 4 die unverdaute HLA $\alpha$ -Kette zu erkennen (erste Zeile: DR $\alpha$ , zweite Zeile: DP $\alpha$ ). In den Spuren 2 und 5 sind die Banden der Alpha-Kette nach dem Verdau der N-Glykane durch EndoH und in Spur 3 und 6 die Proteinbanden nach Verdau mit PNGaseF dargestellt. Die Spuren 1 - 3 zeigen den Ansatz mit li, die Spuren 4, 5 und 6 stellen den Ansatz ohne li dar.

Abbildung 4.1 zeigt in der Spur 1 bzw. 4 die unverdaute DR $\alpha$ /DP $\alpha$ -Kette in Abwesenheit bzw. Anwesenheit der li mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa. In den Spuren 2 und 5 sind nach der EndoH-Behandlung jeweils zwei Proteinbanden zu erkennen. Die untere Bande liegt jeweils auf der gleichen Höhe wie die Proteinbanden in Spur 3 bzw. 6. Diese EndoH-sensitiven Proteine entstehen durch den Überschuss der  $\alpha$ -Ketten gegenüber den  $\beta$ -Ketten. Die zweite Proteinbande nach EndoH-Behandlung (Spur 2 und 5) liegt zwischen der unbehandelten Probe und der PNGaseF-behandelten Probe. Diese partielle EndoH-Resistenz entsteht, wenn von den zwei N-Glykanen einer DR $\alpha$ /DP $\alpha$ -Kette nur eine im Golgi Apparat zum komplexen Kohlenhydrattyp modifiziert wird. Somit kann durch EndoH-Behandlung der nicht modifizierte Kohlenhydratrest abgespalten werden. Im Gegensatz zu EndoH entfernt PNGaseF beide N-Glykanreste. Das MW der DR $\alpha$ /DP $\alpha$ -Kette nach Behandlung mit PNGaseF liegt unterhalb des MW der EndoH-behandelten Probe. Bei der unbehandelten Probe bleiben beide N-Glykoside erhalten, so dass das Molekulargewicht in diesem Fall oberhalb der EndoH- und PNGaseF-behandelten Proben liegt. Die partielle EndoH-Resistenz der DR $\alpha$ - und DP $\alpha$ -Kette in Spur 2 und 5 zeigt, dass die N-Glykane dieser Ketten im Golgi Komplex modifiziert wurden.

Zur Ermittlung des Einflusses von der li auf die Kohlenhydratreifung der N-Glykane müssen die Ergebnisse der Proben mit und ohne li-Expression verglichen werden. In

Anwesenheit der li (Spur 1 - 3) zeigt sich sowohl für die DR $\alpha$ - und die DP $\alpha$ -Kette eine partielle EndoH-Resistenz. Ohne Expression der li (Spur 4 - 6) bestätigt sich diese partielle EndoH-Resistenz erneut für die  $\alpha$ -Ketten beider Isotypen. Eine Abhängigkeit von der Invarianten Kette hinsichtlich der Reifung der N-Glykane kann somit nicht für DR bzw. DP belegt werden. Unabhängig von der Expression der li werden Heterodimere aus dem ER durch den Golgi Komplex transportiert, wo die N-Glykanmodifikation stattfindet.

Bei der Analyse der EndoH-resistenten Proteinbanden von DR und DP (Spur 2 - 5) fällt auf, dass der Isotyp DP eine größere Bande in Anwesenheit der li im Vergleich mit der Proteinbande ohne die li aufweist. Die resistenten Proteinbanden von DR ähneln sich hingegen hinsichtlich Bandenstärke und Intensität. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Isotyp DR auch ohne die Invariante Kette sehr stabil ist und die Hilfestellung durch die li-Stabilisierung geringer ausfällt als bei HLA-DP.



#### 4.2.2 Kohlenhydratreifung von HLA-DQ in An- und Abwesenheit der li

Nach der Untersuchung der Kohlenhydratreifung für die HLA-Isotypen DR und DP folgte die Analyse des Isotyps DQ. Die DQ $\alpha$ -Ketten (0103, 0301 und 0501) und die DQ $\beta$ -Ketten (0201, 0301, 0302 und 0602) wurden untereinander kombiniert und in Abwesenheit der li bzw. nach li-Expression in IMR90S-Zellen transient transfiziert. Die Untersuchung hinsichtlich der N-Glykosylierungsformen durch Behandlung mit EndoglykosidaseH (EndoH) folgte anschließend. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Nach der Ernte der Zellen wurden diese lysiert, mit EndoH (Spuren 2 und 5), PNGaseF (Spuren 3 und 6) und die Kontrolle mit ST-Puffer versetzt (Spuren 1 und 4). Spuren 1 - 3 enthalten die Proben nach li-Expression, die Spuren 4 - 6 die Proben ohne li. Eine erfolgreiche Transfektion aller transfizierten Ketten wurde durch Immunfärbung der Einzelketten nach SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Die  $\alpha$ -Ketten

wurden mit dem Anti-V5-Primärantikörper (Spuren 1 - 6, ca. 35 kDa), die  $\beta$ -Ketten durch LG-II-612.14-Antikörper (Spuren 7 - 8; ca. 30 kDa) und li mit dem Bu43-Antikörper (Spuren 9 - 10) nachgewiesen.

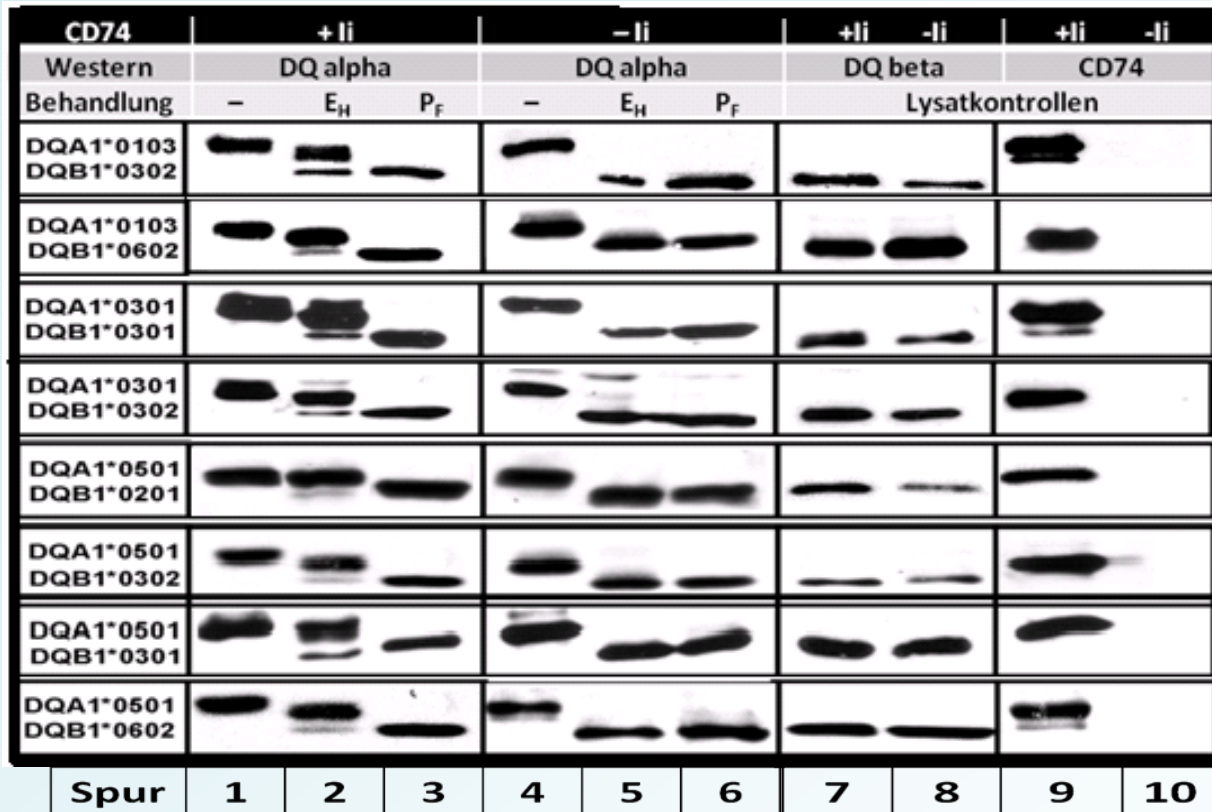
Bei Betrachtung der Ergebnisse nach Transfektion der DQ-Kombinationen unter Berücksichtigung der li zeigt sich in Abb. 4.2 für alle dargestellten DQ-Allotypen ein ähnliches Bandenprofil. Im Falle der EndoH-behandelten Proben (Spur 2) lassen sich zwei Proteinbanden erkennen. Die untere Proteinbande der DQ $\alpha$ -Ketten besitzt ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa und weist eine schwächere Bandenintensität im Vergleich mit der darüber liegenden Bande auf. Diese Proteinbanden zeigen das gleiche Laufverhalten wie die PNGaseF-behandelte Probe auf. Die Proteine innerhalb der Proteinbanden wurden durch EndoH-Behandlung N-deglykosyliert und können demnach als EndoH-sensitiv angesehen werden. Diese Proteinbanden entstehen aufgrund eines quantitativen Unterschieds zwischen Alpha- und Beta-Kette. Bei Überschuss der Alpha-Kette verbleiben die DQ $\alpha$ -Ketten ungebunden im ER. Durch diese EndoH-sensitiven Banden ist keine Aussage hinsichtlich eines intrazellulären Transportes durch den Golgi Komplex möglich. Eine höhere Aussagekraft hat das Vorhandensein einer EndoH-resistenten Bande. Die zweite Proteinbande in Spur 2 (Abb. 4.2) befindet sich zwischen der unbehandelten Probe (Spur 1) und der PNGaseF-behandelten Probe (Spur 3). Ähnlich dem EndoH-Verdau der Isotypen DR und DP liegt hier eine partielle EndoH-Resistenz der DQ $\alpha$ -Ketten vor, d.h. ein Kohlenhydratrest der beiden N-Glykane ist resistent gegenüber der Behandlung mit EndoH.

Nach Analyse der gleichen DQ-Allelkombinationen ohne Expression der li zeigt sich jedoch ein Unterschied im Vergleich mit den Ergebnissen der Isotypen DR und DP in Abschnitt 4.2.1. Die EndoH-behandelte Probe in Spur 5 weist lediglich eine Proteinbande auf, die sich auf Höhe der PNGaseF-behandelten Probe befindet. Die EndoH-Behandlung führte somit bei der DQ $\alpha$ -Kette zu einer Deglykosylierung der N-Glykane, ähnlich einer PNGaseF-Behandlung. Die Proteine in Spur 5 sind somit als EndoH-sensitiv zu bezeichnen. Im Vergleich zu den in dieser Arbeit getesteten DR und DP Allotypen ist bei DQ ein Unterschied in Abwesenheit von der Invarianten Kette zu erkennen. Die EndoH-sensitiven DQ $\alpha$ -Glykoproteine deuten darauf hin, dass die Reifung der N-Glykane bei HLA-DQ, im Gegensatz zu DR und DP, grundsätzlich von der li abhängig ist.

Eine Auffälligkeit der Ergebnisse in Abb. 4.2 konnte für den Allotyp DQ $\alpha$ /DQ $\beta$  0501/0201 festgestellt werden. In Anwesenheit der Invarianten Kette scheint die Proteinbande der DQ $\alpha$ -Kette nicht partiell, sondern total resistent gegenüber einer EndoH-Behandlung zu sein. Nach Analyse von DQA1\*0505 (gleiche Proteinsequenz wie DQA1\*0501) in Kombination mit DQB1\*0201 zeigte sich jedoch das erwartete Ergebnis einer partiellen EndoH-Resistenz, so dass die totale Resistenz wohl auf die zu geringe Auftrennung innerhalb der SDS-PAGE zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt).

Alle acht untersuchten DQ-Allelkombinationen der Abb. 4.2 werden in Anwesenheit von der li aus dem ER heraus transportiert und erfahren im Golgi eine Kohlenhydratreifung

zum komplexen N-Glykantyp. In Abwesenheit der li ist zu vermuten, dass die DQ-Heterodimere im ER verbleiben und nicht den intrazellulären Transportweg durch den Golgi Apparat bis zur Zelloberfläche antreten.



**Abbildung 4.2: li fördert die EndoH-Resistenz der N-Glykoside von HLA-DQ-Dimeren**

Nach der Transfektion von HLA-DQ ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette) in IMR90S-Zellen mit (+li; Spuren 1 - 3) und ohne (-li; Spuren 4 - 6) Expression von der li erfolgte der Verdau der Zelllysate mit EndoH (E<sub>H</sub>) und PNGaseF (P<sub>F</sub>). Die Immunfärbung nach SDS-PAGE und Western Blot erfolgte gegen die DQ $\alpha$ -Kette. Die Darstellung des Allotyps erfolgt in der Reihenfolge: unverdaut (Spur 1 und 4), E<sub>H</sub>-Verdau (Spur 2 und 5) und P<sub>F</sub>-Verdau (Spur 3 und 6). Die erfolgreiche Expression von DQ $\beta$  und der li ist in den Spuren 7 - 10 gezeigt.

### 4.2.3 Einfluss der li auf die Oberflächenexpression von HLA-DR und -DP

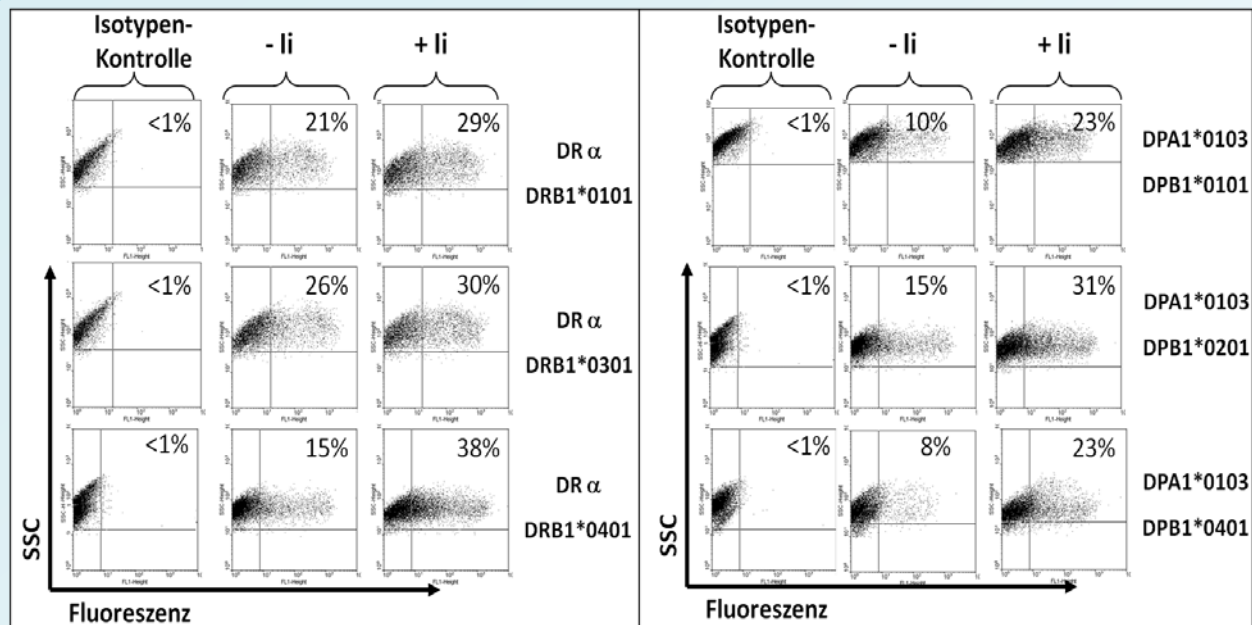
Im Rahmen der Antigenpräsentation ist der Endpunkt der intrazellulären Transportroute eines HLA-Klasse-II-Moleküls die Zelloberflächenmembran, auf deren extrazellulären Seite die Präsentation des antigenen Peptidfragments stattfindet. Um zu überprüfen inwieweit die li eine Zelloberflächenexpression von HLA-DR und -DP beeinflusst, wurden zunächst IMR90S-Zellen mit Allelkombinationen von DR bzw. DP mit und ohne li-Expression transient transfiziert. Die Oberflächenexpression der transfizierten Zellen konnte mittels Durchflusszytometrie überprüft werden.

Von HLA-DR und -DP wurden jeweils drei Allelkombinationen analysiert. Bei HLA-DR wurden folgende Allelkombinationen untersucht: DR $\alpha$ /DRB1\*0101, 0301 und 0401. Für HLA-DP wurde die DPA1\*0103-Kette in Kombination mit den Beta-Ketten DPB1\*0101, 0201 und 0401 getestet. Jede allotypische Kombination der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette wurde in An- und Abwesenheit der Ii geprüft. Zur Kontrolle der erfolgreichen Expression der einzelnen Ketten und der Invarianten Kette wurde das Zelllysate mittels Western Blot Analyse untersucht (Ergebnisse nicht gezeigt). 48h nach der Transfektion wurden die IMR90S-Lungenfibroblasten mit PBS/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und mit dem Primärantikörper LG-II-612.14 inkubiert. Durch den Einsatz eines Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörpers konnten die so markierten Zellen im Durchflusszytometer detektiert werden. Tote Zellen wurden durch die Inkubation mit dem Farbstoff 7-AAD eingefärbt und konnten in einem anderen Fluoreszenzkanal des FACScans detektiert und von lebenden Zellen unterschieden werden.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abbildung 4.3 mittels einer Dot Plot Darstellung abgebildet. Der jeweilige Allotyp ist rechtsseitig der Dot Plots zu erkennen. Jede Allelkombination wird durch drei Dot Plots beschrieben. Die Darstellung im Dot Plot zeigt die Granularität der Zellen (Seitwärtsstreulicht) gegenüber der Fluoreszenz 2 auf der X-Achse, die ein Parameter für HLA-II-Moleküle auf der Zelloberfläche ist. Die erste Abbildung zeigt die Färbung von IMR90S-Zellen mit dem Kontrollantikörper Mar18.5 (Isotypenkontrolle). Anhand dieser Zellpopulation wurde ein Quadrantenfeld für den jeweiligen Allotyp definiert. Im rechten oberen Quadranten sind Zellen mit oberflächenexprimierten HLA-Molekülen abgebildet. Liegen hingegen alle Zellen der Population im linken Quadranten, so wurde kein Heterodimer an der Zelloberfläche detektiert. Der mittlere Dot Plot zeigt das Ergebnis der Analyse der Zellen, die in Abwesenheit von der Ii analysiert wurden. Der rechte Dot Plot in der Abbildung stellt die Ergebnisse bei Anwesenheit von der Invarianten Kette dar.

Die Ergebnisse in Abbildung 4.3 zeigen anhand der Kontrollantikörperfärbung, dass keine unspezifische Bindung von Antikörpern an den IMR90S-Zellen vorliegt, was die Spezifität der LG-II-612.14-Färbung unterstreicht. Bei Betrachtung der Ergebnisse der Isotypen DR und DP wurden für jede Allelkombination Zellen im oberen rechten Quadranten identifiziert. Die zuvor als EndoH-resistent getesteten Allotypen DRA1\*0101 / DRB1\*0101 und DPB1\*0103 / DPB1\*0401 werden somit nicht nur aus dem ER freigesetzt, sondern über den Golgi Komplex hinaus bis zur Zelloberfläche transportiert. Das Erreichen der Zelloberfläche als Endpunkt der Transportroute für die Antigenpräsentation lässt darauf schließen, dass die hier getesteten Allotypen von HLA-DR und -DP funktionell sind und Antigene präsentieren können.

Bei dem Vergleich der beiden Isotypen zeigt sich bei Betrachtung der sechs unterschiedlichen Allotypen, dass DR eine höhere Anzahl an positiven Zellen gegenüber DP hervorbringt. Dies gilt sowohl nach Ii-Expression als auch in Abwesenheit der Invarianten Kette. Die DR-Allotypen zeigen dabei ca. die 2fache Menge an positiven Zellen gegenüber DP in Abwesenheit der Ii. Nach Ii-Expression verringert sich dieser Faktor auf einen Wert von 1 – 1,5.



**Abbildung 4.3: li erhöht die Zelloberflächenexpression von HLA-DR und -DP**

$\alpha$ - und  $\beta$ - Ketten von HLA-DR (links) und HLA-DP (rechts) wurden in IMR90S-Zellen in An- und Abwesenheit von der li exprimiert und in der Durchflusszytometrie (FACSscan) nach indirekter Antikörpermarkierung auf Oberflächenexpression getestet. Die Zellen wurden 48h nach Transfektion mittels PBS/EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst und mit dem Antikörper LG-II-612.14 (spezifisch für HLA-II-Beta-Ketten) bzw. einem Kontrollantikörper (MAR18.5) inkubiert. Nach Markierung mit einem Alexa-488 gekoppeltem Sekundärantikörper wurden die Zellen im Durchflusszytometer untersucht. Tote Zellen wurden mit 7-AAD angefärbt und so von der Analyse ausgeschlossen. Im linken Teil der Abbildung befinden sich die DR-Allelkombinationen aus der monomorphen DR-Alpha-Kette in Kombination mit DRB1\*0101, \*0301 und \*0401. Im rechten Teil sind die DP-Allelkombinationen DPA1/DPB1 (0103/0101; 0103/0201 und 0103/0401) gezeigt. Dargestellt ist eine Dot Blot-Analyse bei der der Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen das Fluoreszenzsignal (Fluoreszenz = FL-1) aufgetragen wurde. Die Kontrollfärbungen ist jeweils in der linken Spalte dargestellt. Die mittlere und die rechte Spalte enthält die LG-II-612.14 markierten Zellen. Die mittlere Spalte zeigt die Allotypen in Abwesenheit der li, wohingegen die rechte Spalte in Anwesenheit von der li gemessen wurde. Im rechten oberen Quadranten sind die Zellen dargestellt, die eine Oberflächenexpression der HLA-II-Moleküle aufweisen. Die Zahlenwerte geben den prozentualen Anteil der Zellen im oberen rechten Quadranten an. Die zur Transfektion verwendeten Allotypen sind jeweils rechts dargestellt.

Beim Vergleich der einzelnen Allotypen fällt auf, dass die Oberflächenexpression abhängig von der jeweiligen Allelkombination ist. Bei HLA-DR ist dabei besonders der Allotyp DR $\alpha$ /DRB1\*0401 zu nennen, der nach li-Expression eine größere Oberflächenexpression zeigt, als die beiden anderen DR-Allotypen. Hingegen ist diese Allelkombination ohne li mit einer geringeren Oberflächenexpression verknüpft als die beiden übrigen DR-Heterodimere.

Eine differenzierte Oberflächenexpression in Abhängigkeit von dem jeweiligen Allotypen zeigte sich ebenso für den Isotypen DP. Je nach Allelkombination konnten unabhängig von der li-Expression Schwankungen bis zu dem 1,5fachen Wert für die Oberflächenexpression gemessen werden. Gründe für diese Unterschiede können in der unterschiedlichen Transfektionseffizienz, der Reaktivität des LG-II-612.14-Antikörpers oder in der Fähigkeit der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten liegen, sich ohne li zu einem Heterodimer zusammen zu lagern.

Bei Analyse der Abhängigkeit der DR- und DP-Oberflächenexpression von der Invarianten Kette kann für jeden DR- und DP- Allotypen festgehalten werden, dass nach

li-Expression vermehrt Zellen im oberen rechten Quadranten gefunden wurden. Die Anwesenheit von der li erhöht also den Zellanteil mit oberflächenexprimierten Klasse-II-Rezeptoren unabhängig vom Iso- bzw. Allotyp. Die Expression der li steigert den Transport der Heterodimere zur Zelloberfläche bei allen sechs Allelkombinationen der Isotypen DR und DP. Dieser Effekt ist durch die Chaperonfunktion der li begründet, die zur Stabilisierung des Heterodimers beiträgt, den Transport aus dem ER verstärkt und die Peptidbeladung in den MIIC-Kompartimenten fördert. Neben dieser konstanten Eigenschaft des Chaperoneffekts muss jedoch berücksichtigt werden, dass es Unterschiede in der Abhängigkeit von der li gibt. Der Einfluss der li ist für den Isotypen DP stärker einzustufen als bei DR. Gleichzeitig wurde ein differenzierter Einfluss innerhalb eines Isotypens ausgemacht, da DR $\alpha$  / DRB1\*0401 hinsichtlich der Oberflächenexpression stärker von der li abhängig ist als die restlich DR-Allotypen. Eine strikte Abhängigkeit von der li konnte nicht gefunden werden, da alle untersuchten Heterodimere auch in Abwesenheit der li Oberflächenexpression aufwiesen.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung in Abb. 4.3 belegen die Erkenntnisse aus den vorhergehenden Kapiteln. Sowohl für HLA-DR, als auch für HLA-DP gilt, dass eine Oberflächenexpression der Heterodimere sowohl nach Expression der li als auch in Abwesenheit von der li zu erkennen ist.

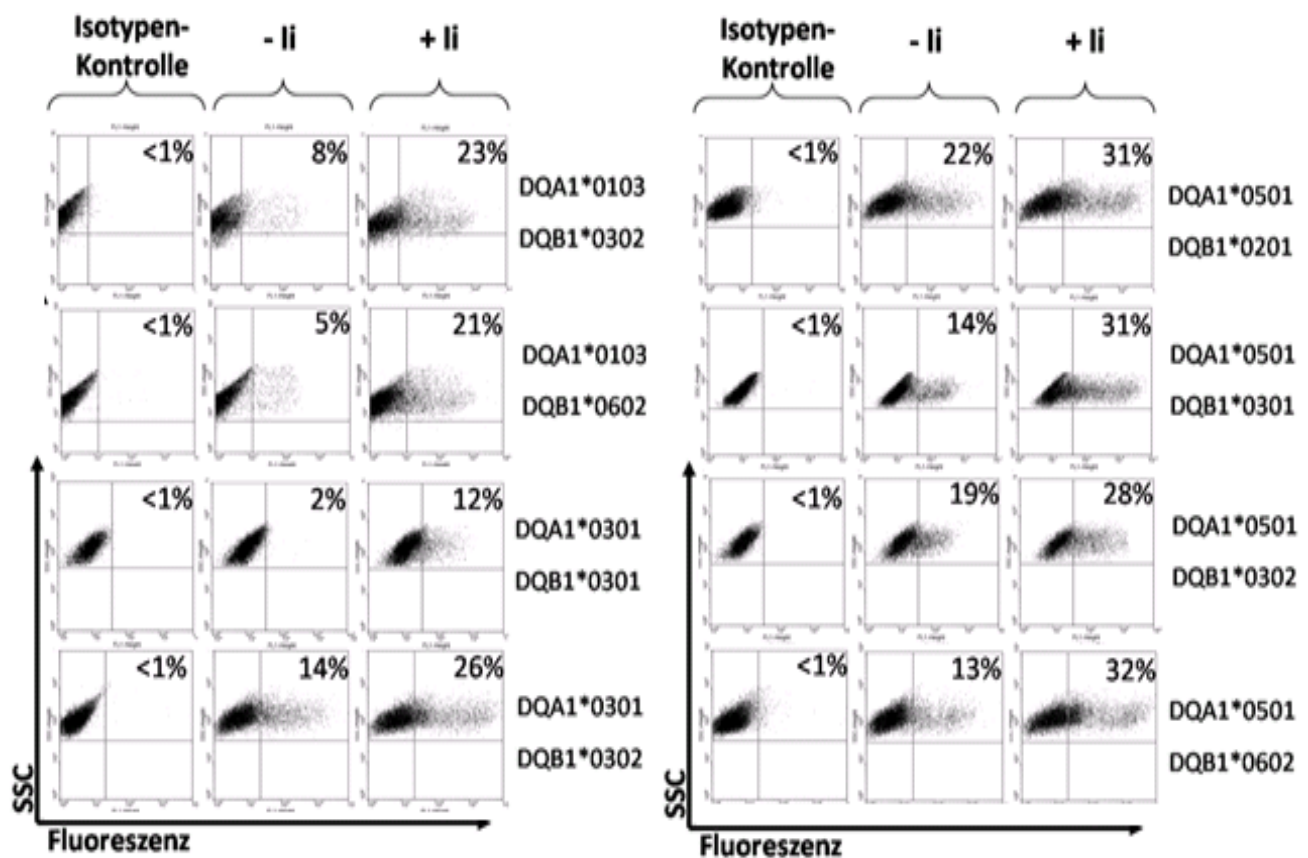
#### 4.2.4 Einfluss der li auf den Zelloberflächentransport von DQ-Molekülen

Die Durchflusszytometrie sollte weiteren Aufschluss über den Transport der DQ-Peptidrezeptoren aus dem ER bis zur Plasmamembran geben. In der FACS-Analyse sollten zelloberflächenlokalisierte DQ-Rezeptoren detektiert werden. Zu diesem Zweck wurden IMR90S-Zellen mit einer Kombination aus  $\alpha$ -Kette (0103, 0301 und 0501) und  $\beta$ -Kette (0201, 0301, 0302 und 0602) transient transfiziert. Nach Ernte der Zellen wurden diese von der Zellkulturflasche gelöst und nach einstündiger Inkubation mit dem Primärantikörper LG-II-612.14 mit einem Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper behandelt. Die Detektion der Oberflächenexpression erfolgte im FACScan. Nach Einstellung der Quadranten anhand eines Kontrollantikörpers (Isotypenkontrolle; Mar18.5) konnten die Klasse-II-oberflächenexprimierten Zellen im oberen rechten Quadranten der Dot Blot-Analyse dargestellt werden.

In Abbildung 4.4 werden die jeweiligen DQ-Allelkombinationen jeweils rechts neben den zugehörigen Dot Blots abgebildet. Die Analysen der DQ-Heterodimere nach Expression der li (+ li) ergaben für die hier gezeigten Allelkombinationen ähnliche Ergebnisse wie für die Isotypen DR und DP (siehe Abschnitt 4.2.3). Für alle DQ-Allotypen gilt, dass in



Anwesenheit der Ii Zellen im oberen rechten Quadranten zu erkennen sind. Somit kann von einer entsprechenden Oberflächenexpression der DQ-Heterodimere nach Ii-Expression ausgegangen werden. In Anwesenheit der Ii belegen die Ergebnisse der EndoH-Inkubation den intrazellulären Transport durch den Golgi Apparat. Anhand der bestätigten Oberflächenexpression zeigt sich, dass der Transport vom Golgi Komplex bis zur Zelloberfläche fortgesetzt wird und eine Antigenpräsentation möglich erscheint. Auffällig ist jedoch, dass in Abhängigkeit der jeweiligen Allelkombination eine stark unterschiedliche Oberflächenexpression zu erkennen ist. Besonders DQA1\*0301 / DQB1\*0301 zeigt im Vergleich zu den anderen Isotypen DR und DP eine reduzierte Anzahl an Zellen im oberen rechten Quadranten. Die übrigen Allotypen von HLA-DQ weisen, in Abhängigkeit des Allotyps, vergleichbare Oberflächentransportraten wie DR- und DP-Allelkombinationen in Anwesenheit der Ii auf.



**Abbildung 4.4:** Ii fördert die Oberflächenexpression von HLA-DQ-Rezeptoren

Die Allelkombinationen DQA1/DQB1 (0103/0302; 0103/0602; 0301/0301; 0301/0302; 0501/0201; 0501/0301; 0501/0302 und 0501/0602) wurden in An- und Abwesenheit von der Invarianten Kette in IMR90S-Zellen exprimiert und nach Inkubation mit dem AK LG-II-612.14 in der Durchflusszytometrie auf Oberflächenexpression untersucht. Dargestellt ist eine Dot Blot-Analyse bei der der Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen das Fluoreszenzsignal (Fluoreszenz = FL-1) aufgetragen wurde. Die Kontrollfärbungen (Mar18.5; Isotypenkontrolle) ist jeweils in der linken Spalte dargestellt. Die mittlere und die rechte Spalte enthält die LG-II-612.14 markierten Zellen. Die mittlere Spalte zeigt die Allotypen in Abwesenheit der Ii, wohingegen die rechte Spalte in Anwesenheit der Ii gemessen wurde. Im rechten oberen Quadranten sind die Zellen dargestellt, die eine Oberflächenexpression der HLA-II-Moleküle aufweisen. Die Zahlenwerte geben den prozentuellen Anteil der Zellen im oberen rechten Quadranten an.

Die Ergebnisse in Abschnitt 4.2.2 zeigen, hinsichtlich der Reifung der N-Glykane, eine strikte Abhängigkeit der DQ-Heterodimere von der Ii. Bei Überprüfung der durchflusszytometrischen Analyse in Abbildung 4.4 zeigt sich für drei der acht DQ-Allotypen eine ähnliche Tendenz, nämlich eine fast absolute Abhängigkeit von der Invarianten Kette. Die Allelkombinationen DQ $\alpha$ /DQ $\beta$  0103/0302, 0103/0602 und 0301/0301 zeigen in Abwesenheit der Ii (- Ii) eine sehr geringe Oberflächenexpression, da nur sehr wenige Zellen im oberen rechten Quadranten identifiziert werden konnten. Erst durch Anwesenheit der Ii steigt der Zellanteil mit erhöhter Fluoreszenz um ein Vielfaches und eine erhöhte Oberflächenexpression kann erreicht werden. Die Abhängigkeit ist jedoch nicht bei allen DQ-Allotypen so stark ausgeprägt. Die übrigen Heterodimere in Abbildung 4.4 zeigen in Abwesenheit der Ii eine wesentlich größere Oberflächenexpression. Die Abhängigkeit von der Ii fällt für diese Allelkombinationen dabei auf den Höchstwert Faktor 2 ab und ist somit vergleichbar mit den Ergebnissen der DP-Moleküle.

Besonders interessant ist jedoch die Tatsache, dass die Schlussfolgerung aus den Ergebnissen des EndoH-Verdau nicht bestätigt werden konnten. Die strikte Abhängigkeit von der Ii hinsichtlich der N-Glykanreifung hat keinen Einfluss auf den Transport zur Zelloberfläche. Auch EndoH-sensitive Moleküle verlassen, in Abwesenheit der Ii, das ER und werden zur Zelloberfläche transportiert. Dabei bleibt die Frage offen, inwiefern ein nicht-kohlenhydratmodifiziertes DQ-Molekül in der Lage ist, Peptide zu binden, zu präsentieren und eine mögliche Immunantwort zu induzieren.

#### **4.2.5 Kohlenhydratmodifikation von Zelloberflächen-assoziierten HLA-DQ-Molekülen**

Ausgehend von den vorangegangenen Ergebnissen aus Abschnitt 4.2.2 und 4.2.4 lag zunächst die Vermutung nahe, dass eine strikte Abhängigkeit von der Ii für DQ-Moleküle vorliegt. In Abwesenheit der Ii sind die vorgestellten DQ-Allotypen als EndoH-sensitiv getestet worden. Die Vermutung, dass diese Heterodimere das ER nicht verlassen, wurde in der Durchflusszytometrie widerlegt. Alle Heterodimere ohne Ii-Expression konnten auf der Zelloberfläche von IMR90S-Zellen detektiert werden.

Dabei bleibt die Frage, ob es sich um HLA-Moleküle mit verändertem Kohlenhydratmuster handelt oder ob diese Moleküle auf einem anderen Weg zur Zelloberfläche gelangen. Desweiteren kann keine Aussage über die funktionelle Peptidpräsentation dieser DQ-Moleküle getroffen werden.

Um die zuvor dargelegten Ergebnisse zu bestätigen, sollte im Folgenden die genaue Glykosylierungsform der zelloberflächenlokalisierten Heterodimere betrachtet werden.

---

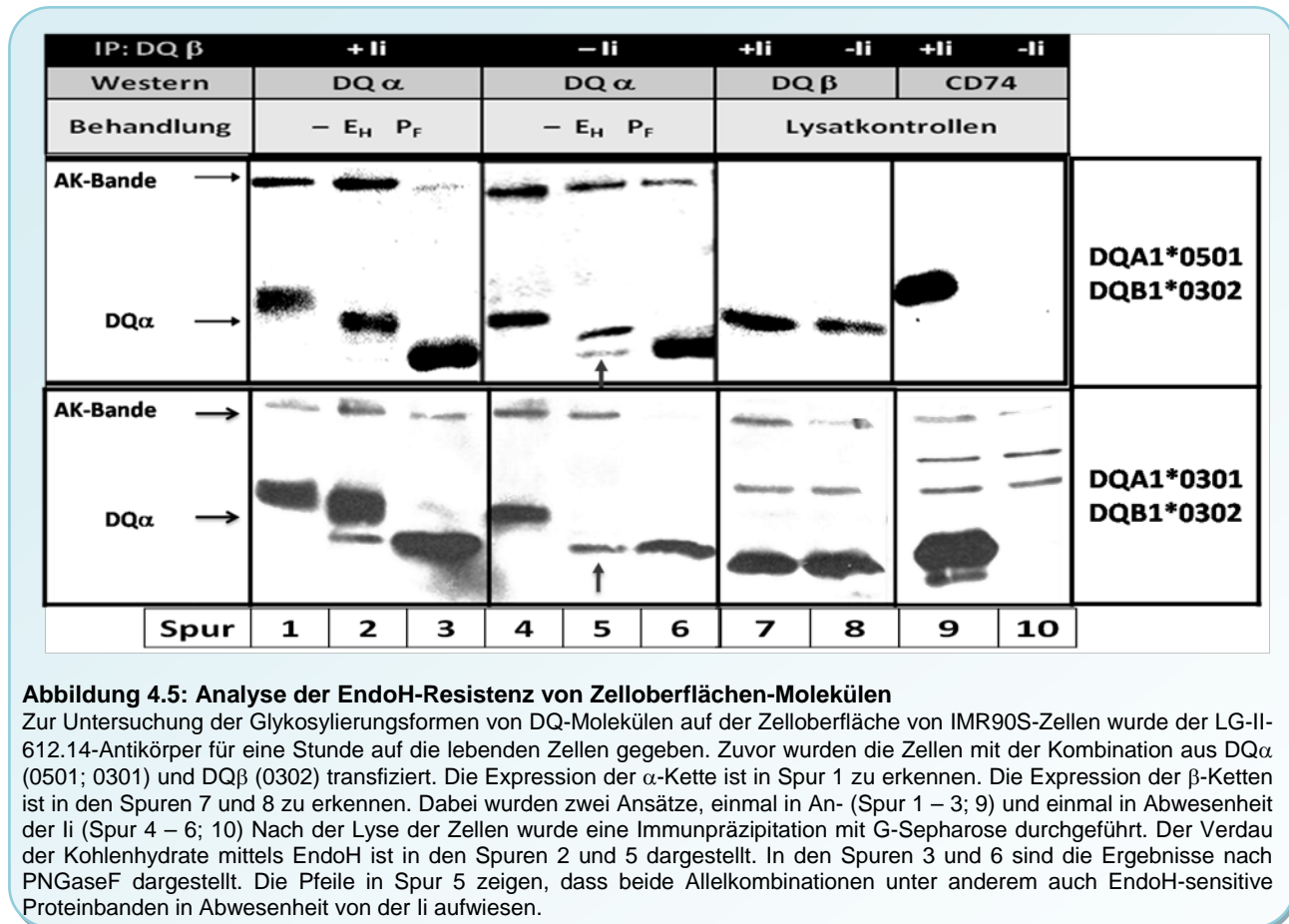
Dazu wurden IMR90S-Zellen mit der DQ-Allelkombination DQA1/DQB1 0501/0302, sowie DQA1/DQB1 0301/0302 transfiziert. Die Klasse-II-Moleküle auf der Zelloberfläche sollten nach Expression auf ihre Glykosylierungsform untersucht werden.

Nach der Transfektion erfolgte die Markierung der oberflächenassoziierten Heterodimere mittels des Primärantikörpers LG-II-612.14, der innerhalb einer einstündigen Inkubation bei 4°C spezifisch an die Beta-Ketten der Heterodimere auf der Zelloberfläche binden konnte. Im Anschluss wurden diese Proteine aus dem Zelllysat über eine Immunpräzipitation mittels Protein G-Sepharose aufgereinigt. Das entstehende Zelllysat wurde mit EndoH behandelt und mit einer unbehandelten und einer PNGaseF-behandelten Probe verglichen. Die erfolgreiche Transfektion wurde spezifisch für jede Kette aus dem Zelllysat nachgewiesen (Abbildung 4.5, Spur 7 - 10).

Die Ergebnisse in Abbildung 4.5 zeigen für die DQ-Allelkombination 0501/0302 nach Expression der li in Spur 1 eine Proteinbande für DQ $\alpha$  von ca. 35 kDa. In Spur 2 zeigt sich die EndoH-behandelte Probe, die zwischen der unbehandelten Probe und der PNGaseF-Probe liegt. Somit kann eine partielle Resistenz gegenüber EndoH für die zelloberflächenlokalisierten DQ-Moleküle festgestellt werden. Dies entspricht den vorhergehenden Ergebnissen, dass in Anwesenheit der li die DQ-Moleküle EndoH-resistent werden und eine starke Oberflächenresistenz anzeigen. In Spur 5 finden sich zwei Proteinbanden der EndoH-behandelten Probe, wobei eine Bande erneut zwischen den Proteinbanden der Spur 4 (unbehandelte Probe) und Spur 6 (PNGaseF-behandelte Probe) liegt. Diese Bande kann erneut als partiell resistent gegenüber EndoH charakterisiert werden. Es zeigt sich, wie auch zuvor in den Abschnitten 4.2.4 beschrieben, dass diese Allelkombination nur eine geringe Abhängigkeit von der li besitzt. Die zweite Proteinbande liegt auf der gleichen Höhe der Proteinbande in Spur 6. Es bleibt erneut festzuhalten, dass DQ-Heterodimere ohne Kohlenhydratmodifikation des Golgi Komplexes die Zelloberfläche erreichen. Ein ähnliches Ergebnis stellte sich auch für die Allelkombination 0301/0302 heraus. Sowohl in An- als auch in Abwesenheit der li ist jeweils eine Bande für die EndoH-behandelten Proben in Spur 2 und 5 erkennbar, die auf Höhe der PNGaseF-behandelten Probe liegen und dem Molekulargewicht eines N-deglykosylierten DQ-Moleküls entsprechen. Dies zeigt erstmals, dass auch in Anwesenheit der li DQ-Moleküle auf der Zelloberfläche identifiziert werden konnten, die keine Kohlenhydratmodifikation erfahren haben. Der Großteil der HLA-II-DQ-Heterodimere ist jedoch in Anwesenheit der li EndoH-resistent. Da in Spur 5 jedoch nur EndoH-sensitive Heterodimere identifiziert werden konnten, bestätigt sich hier erneut die strikte Abhängigkeit von der li bezüglich der N-Glykanreifung.

Zusammenfassend fällt besonders die Abhängigkeit der HLA-II-DQ-Moleküle von der Invarianten Kette auf, die sich je nach Allotyp differenziert darstellt. Eine weitere Auffälligkeit konnte hinsichtlich der Zugehörigkeit eines Heterodimers zu einem Isotypen beschrieben werden. Die Isotypen DR und DP unterscheiden sich in Abwesenheit der Invarianten Kette hinsichtlich der N-Glykanform von den hier untersuchten DQ-Rezeptoren. Dabei konnte in diesem Versuch jedoch gezeigt werden, dass auch nicht-modifizierte Glykoproteine zur Zelloberfläche transportiert werden. Inwiefern die EndoH-

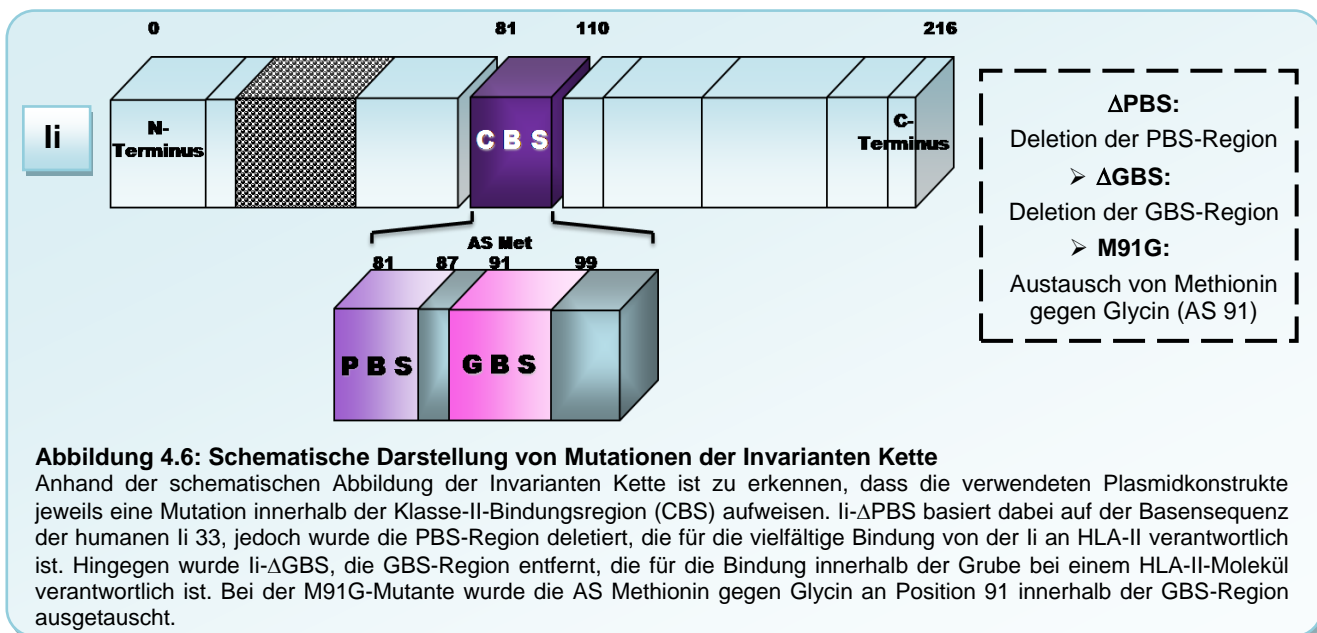
sensitiven DQ-Heterodimere eine erfolgreiche Peptidpräsentation an der Zelloberfläche gewährleisten können, bleibt unbeantwortet. Zur Klärung dieser Fragestellung müssen weitere Versuchsanordnungen getroffen werden, die die Peptidbindung der unterschiedlichen Heterodimere nachweisen können.



#### 4.2.6 Untersuchung des Einflusses von HLA-II-Grube-bindenden Sequenzen der Invarianten Kette

Die in Abschnitt 4.2 beschriebenen Ergebnisse zeigen einen eindeutigen Einfluss der Invarianten Kette auf den Transport von HLA-Klasse-II-Molekülen. Die Abhängigkeit der Heterodimere von der Invarianten Kette hinsichtlich der Oberflächenexpression und der N-Glykanform ist je nach Isotyp, sowie je nach spezifischer Zusammensetzung aus den HLA-II- $\alpha$ - und  $\beta$ -Subeinheiten unterschiedlich. Unter den Isotypen fällt besonders bei HLA-DQ auf, dass bestimmte Allotypen in Abwesenheit der li nur in sehr geringem

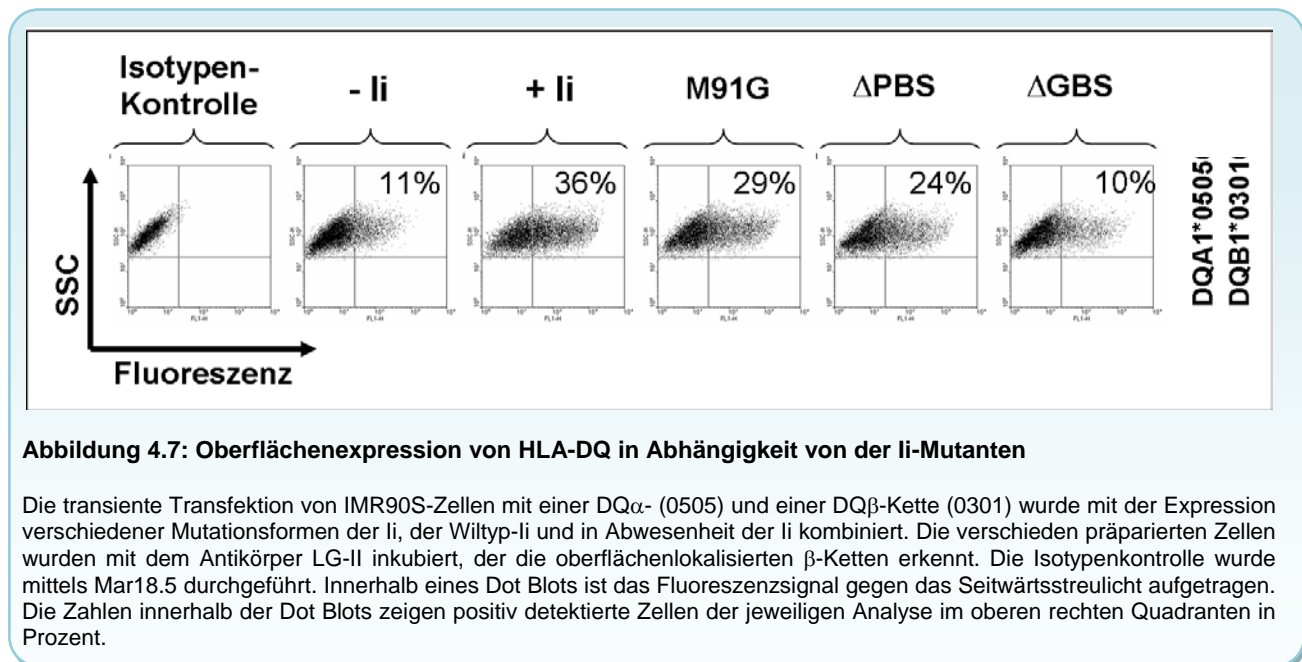
Ausmaß aus dem ER bis zur Zelloberfläche transportiert werden. Beispielhaft für eine starke Abhängigkeit von der li kann die Allelkombination DQA1/DQB1 0501/0301 genannt werden. Anhand dieser Allelkombination soll in der folgenden Versuchsdurchführung ein Hinweis darauf gefunden werden, welche strukturellen Gegebenheiten der li wichtig für die Chaperonfunktion der Invarianten Kette sind. Es wurden drei Mutanten der li getestet, die in Abbildung 4.6 charakterisiert werden: li $\Delta$ PBS zeichnet sich durch Deletion der AS 81 - 87 aus. Dieser Sequenzbereich wurde als wichtige Kontaktstelle für die Stabilisierung eines beliebigen HLA-Klasse-II-Allotyps identifiziert (Neumann, 2006). Auch li $\Delta$ GBS ist eine Deletionsmutante, bei der AS 91 – 99 fehlen. Diese Sequenz wurde als Kontaktstelle der li charakterisiert, die eine bedeutende Interaktion mit der Peptidbindegrube des MHC-II-Heterodimers aufweist. liM91G ist eine li-Mutante, bei der an AS-Position 91 ein Methioninrest zu einem Glycinrest mutiert wurde. M91 bindet in der ersten Tasche von MHC-II-Molekülen, die am stärksten konserviert vorliegt (Neumann & Koch, 2005).



Die Untersuchung der Zelloberflächenexpression in der Durchflusszytometrie wurde für eine DQ $\alpha$ / $\beta$ -Kombination in verschiedenen Ansätzen getestet. Das Heterodimer wurde in einem Ansatz ohne li, sowie in weiteren Ansätzen nach Expression der li33, li-M91G, li $\Delta$ PBS und li $\Delta$ GBS exprimiert. Die Zellen wurden mit dem LG-II-612.14-Antikörper immungefärbt und durch den Farbstoff 7-AAD konnte der Totzellenanteil charakterisiert werden. In Abb. 4.7 sind die Ergebnisse in der Dot Blot-Darstellung abgebildet. Anhand der Isotypenkontrolle wurde ein Quadrant eingestellt, der die Oberflächenexpression der DQ-Moleküle in An- und Abwesenheit der li identifiziert.

Ähnlich den Ergebnissen aus Abschnitt 4.2.4 zeigt sich eine starke Abhängigkeit von der li. Dabei steigert die Anwesenheit von der li (Dot Blot 3) die Oberflächenexpression des DQ-Allotyps um den Faktor 3. Erneut ist jedoch auch ohne die Expression von der li

eine Oberflächenexpression zu erkennen (Dot Blot 2). Eine strikte Abhängigkeit zeigt sich auch in diesem Versuch nicht. Die Ergebnisse für die Oberflächenexpression nach Expression der li-M91G Mutanten sind in Dot Blot 4 dargestellt. Diese Mutante erhöht die Oberflächenexpression um den Faktor 3. Die stabilisierende Wirkung der Mutante für DQ-Moleküle ist somit vergleichbar mit der Wildtypform der Invarianten Kette. Der absolute Wert liegt leicht unter dem Wert für die positiv detektierten Zellen in Dot Blot 3, aber deutlich über den Ergebnissen ohne li-Expression. Auch die Ergebnisse für die Expression von der li $\Delta$ PBS (Dot Blot 5) zeigen, dass die Deletionsmutante die Oberflächenexpression der DQ-Heterodimere erhöht. Weiterhin weist diese Mutante, im Vergleich mit li-Wildtyp, eine geringere Oberflächenexpression auf. In Relation zu den Ergebnissen in Abwesenheit von der li kann die Transportrate zur Zelloberfläche um den Faktor 2,5 erhöht werden. Die Ergebnisse legen somit den Schluss nahe, dass die PBS-Region der Invarianten Kette einen Einfluss auf den Transport zur Zelloberfläche besitzt. Nach Transfektion von der li $\Delta$ GBS (Dot Blot 6) zeigt sich ein weiterer sehr deutlicher Abfall der Oberflächenexpression. In Anwesenheit dieses Konstrukts resultierte keine Steigerung der Transportraten im Vergleich mit DQ $\alpha/\beta$  in Abwesenheit der li. Eine stabilisierende Wirkung, ähnlich der Chaperonwirkung der Wildtypvariante, kann für diese Deletionsmutante nicht belegt werden. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse belegen somit, dass der GBS-Bereich, innerhalb der Klasse-II-Bindungsregion, einen entscheidenden Einfluss auf die Chaperonfunktion der li hat.



---

## 4.3 Sicherstellung der erfolgreichen Peptidpräsentation verschiedener DQ-Allotypen

### 4.3.1 Transportkompetenz von DQ-Heterodimeren in Abhängigkeit der Kombination von $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheiten

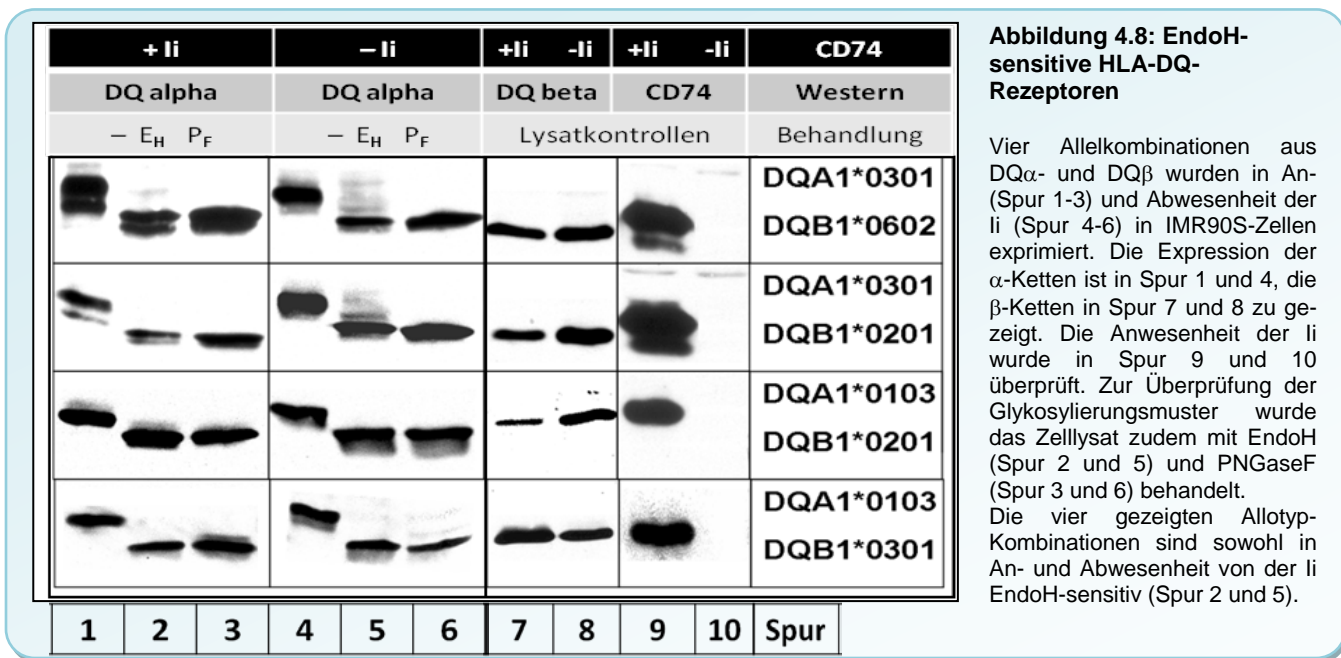
Für die Untersuchungen des Transportes der HLA-DQ-Allelkombinationen konnten insgesamt zwölf unterschiedliche Allelkombinationen, bestehend aus Alpha- und Beta-Kette, getestet werden. In Abschnitt 4.2 wurde für acht DQ-Heterodimere der Transport zur Zelloberfläche gezeigt. Die Reifung der Kohlenhydrate wurde, ebenso wie die Oberflächenexpression, durch Expression der Invarianten Kette gefördert. Unabhängig von der Anwesenheit der Ii war besonders die Kombination aus den spezifischen  $\alpha$ -/ $\beta$ -Untereinheiten für das differenzierte Glykosylierungsmuster und die unterschiedliche Transportrate zur Zelloberfläche entscheidend.

Die Untersuchung der übrigen vier DQ-Heterodimere wird in diesem Kapitel näher beschrieben, um die Sonderstellung dieser Allotypen zu unterstreichen. Zuerst erfolgte die Analyse der Reifung der N-Glykane im Golgi Komplex. Dabei wurden die  $\alpha$ / $\beta$ -Allelkombinationen erneut in IMR90S-Zellen transient exprimiert. Aus dem hergestellten Zelllysate wurde eine unbehandelte Probe ( $\emptyset$ ), eine EndoH ( $E_H$ ) verdaute Probe und eine PNGaseF- ( $P_F$ ) verdaute Probe durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem folgenden Immunblotting wurde die Alpha-Kette durch einen spezifischen Anti-V5-Primärantikörper spezifisch detektiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.8 dargestellt. In den Spuren 1 – 3 ist das Ergebnis für die jeweilige DQ-Allelkombination in Abwesenheit der Ii abgebildet. In den Spuren 4 – 6 sind die Analyseergebnisse nach Expression der Ii dargestellt. Die Spuren 1 und 4 zeigen die unbehandelten DQ $\alpha$ -Ketten, die Spuren 3 und 6 die DQ $\alpha$ -Ketten nach PNGaseF-Verdau. Um eine Aussage über die mögliche Reifung der N-Glykane treffen zu können, müssen die DQ $\alpha$ -Ketten nach EndoH-Verdau in den Spuren 2 und 5 betrachtet werden.

Für die vier Allotypen DQA1/DQB1 (0301/0602; 0301/0201; 0103/0201 und 0103/0301) ergab sich ein einheitliches Analyseergebnis. Ähnlich den Ergebnissen aus Kapitel 4.2 zeigen die detektierten Alpha-Ketten in Abwesenheit der Ii (Spur 5) eine totale EndoH-Sensitivität, was auf die Abspaltung der beiden N-Glykane an der DQ-Subeinheit hindeutet. Eine Reifung der Kohlenhydrate durch Enzyme des Golgi Komplex konnte für diese vier Fälle erneut nicht nachgewiesen werden. Bei Betrachtung des enzymatischen Verdauens nach Expression der Ii, wurde ähnlich den Ergebnissen der zuvor dargestellten DQ-Allotypen, das Auftreten von EndoH-resistenten Molekülen erwartet. Für die in Abbildung 4.8 dargestellten Allelkombinationen veränderte sich dieses Bild. In Spur 2 zeigt sich, dass alle detektierten Alpha-Ketten keine EndoH-Resistenz aufweisen. Alle detektierten Moleküle sind auch in Anwesenheit der Ii sensitiv gegenüber EndoH. Entgegen der in Kapitel 4.2 untersuchten DQ-Allotypen wird somit, unabhängig von der Anwesenheit der Ii, keine Reifung der N-Glykane beobachtet. Zur Festigung der

Resultate, wurden die Experimente in einem veränderten Zellsystem erneut analysiert. Eine Zelllinienabhängigkeit konnte ausgeschlossen werden, indem die Versuche in der HeLa-Zelllinie wiederholt wurden. Als Resultat der Untersuchung der DQ-Allotypen in dem veränderten Zellsystem zeigte sich für diese vier Allelkombinationen aus DQ $\alpha$ / $\beta$  erneut eine totale EndoH-Sensitivität (siehe Anhang, Abbildung 6.5). Auch bei dieser Versuchsanordnung führte die Expression der li zu keinerlei Beeinflussung der Kohlenhydratreifung im Vergleich zur li-Abwesenheit. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich die DQ-Allelkombination DQA1\*0501/DQB1\*0302 in HeLa-Zellen getestet (Abbildung 6.5). Bei diesem Allotypen wurde erneut die Kohlenhydratreifung der Alpha-Ketten (partielle EndoH-Resistenz) nach Expression der li nachgewiesen. Die Ergebnisse aus Abschnitt 4.2 konnten somit auch in einer weiteren Zelllinie nachgewiesen werden. Es ist keine Abweichung zwischen den beiden unterschiedlichen Zelllinien zu erkennen.

Diese erneut bestätigten Ergebnisse lassen zwei mögliche Schlussfolgerungen für die vier EndoH-sensitiven DQ-Allotypen zu. Entweder liegt eine Fehlfaltung der DQ-Heterodimere vor, so dass bei Passage des Golgi Apparates die dortigen Enzyme keine Reifung der N-Glykane herbeiführen können, oder aber diese DQ-Allotypen werden nicht zum Golgi transportiert und verbleiben im ER.

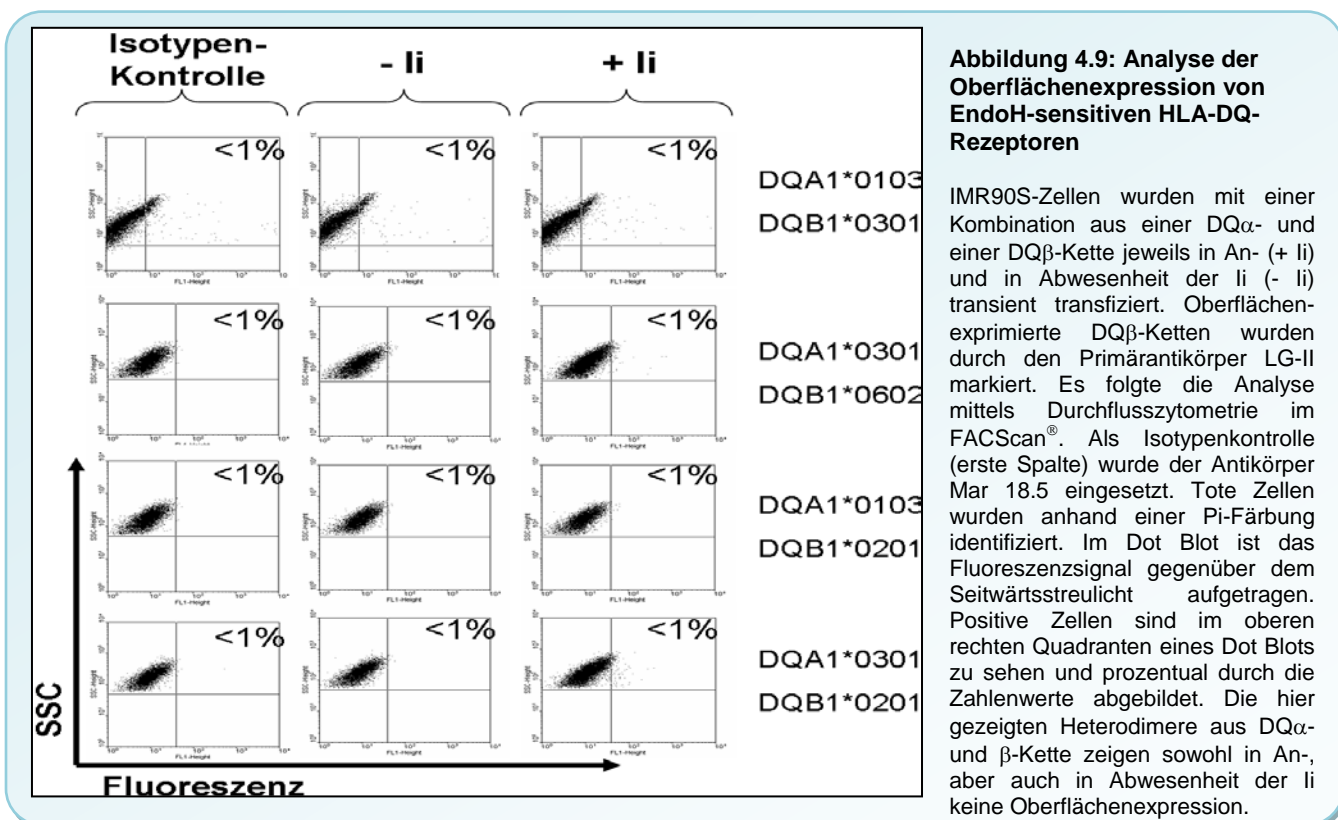


Zur weiteren Überprüfung wurden die auf EndoH-Resistenz getesteten Allotypen DQA1/DQB1 (0301/0602; 0301/0201; 0103/0201 und 0103/0301) weiterhin auf einen Transport zur Zelloberfläche getestet. Die Oberflächenexpression wurde in der Durchflusszytometrie im FACScan nachgewiesen. IMR90S-Zellen wurden transient mit den DQ-Subeinheiten transfiziert. Eine Oberflächenassoziation der DQ-Moleküle konnte nach Bindung des spezifischen Antikörpers LG-II-612.14 in Kombination mit dem Sekundärantikörper Alexa488 nachgewiesen werden. Der Totzellenanteil wurde durch



eine Pi-Färbung kenntlich gemacht und in der durchflusszytometrischen Analyse durch eine entsprechende Ausgrenzung der toten Zellen gefiltert.

Das Ergebnis der FACS-Analyse ist in Abbildung 4.9 zu sehen. Zur Kalibrierung des Messbereichs wurde stets eine Isotypenkontrolle (Mar18.5) vorgenommen, die jeweils im ersten Dot Plot jeder Zeile gezeigt wird. Der jeweils zweite Plot pro Zeile in Abbildung 4.9 dokumentiert die Ergebnisse in Abwesenheit der Ii, der dritte Plot in der Zeile bildet das Ergebnis nach Expression der Invarianten Kette ab. Bei Betrachtung der jeweils mittleren Dot Plots pro Zeile, also ohne Ii-Expression, werden keine Zellen mit erhöhtem Fluoreszenzausschlag detektiert. Entgegen den Ergebnissen der zuvor dargestellten DQ-Allotypen, können also im oberen rechten Quadranten keine Zellen erkannt werden. Nach Expression der Ii ergibt sich ein ganz ähnliches Bild. Es wurde erneut kein Ausschlag der Fluoreszenz gefunden, der auf eine Detektion oberflächenexprimierter DQ-Moleküle hindeuten würde. Dieses Ergebnis wiederholt sich bei den Untersuchungen der übrigen drei DQ-Allotypen (s. Abb. 4.9). Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von den Resultaten der übrigen Allelkombinationen in Abschnitt 4.2. Erwartungsgemäß ist lediglich ein geringer Teil der DQ-Heterodimere in Abwesenheit der Ii transportkompetent, jedoch überraschte die totale Transportinkompetenz nach Expression der Ii. Aufgrund der unreifen Kohlenhydratformen und dem fehlenden Transport zur Zelloberfläche werden die in Abbildung 4.8 und 4.9 abgebildeten DQ-Allotypen zukünftig als „nicht-funktionell“ bezeichnet, da sie nicht in der Lage sind, ein Peptid aufzunehmen und auf der Zelloberfläche zu präsentieren.



Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass vier der zwölf untersuchten HLA-Klasse-II-DQ-Heterodimere, unabhängig vom Einfluss der Invarianten Kette, keine modifizierte N-Glykosylierung aufweisen und zudem nicht zur Zelloberfläche der IMR90S-Zellen transportiert werden. Aufgrund der fehlenden Kohlenhydratmodifikation liegt die Vermutung nahe, dass die DQ-Subeinheiten in diesen hier untersuchten Kombinationen nicht zueinander passen und das ER nicht in Richtung des Golgi Komplexes verlassen. Die Allelkombinationen verbleiben im ER, wobei nicht bekannt ist, ob diese Untereinheiten strukturell erst gar nicht kombiniert werden können, oder ob eine Fehlfaltung erkannt und der Transport blockiert wird.

Bei Betrachtung aller untersuchten HLA-DQ-Allotypen zeigt sich, dass ein Viertel der DQ $\alpha/\beta$ -Peptidrezeptoren nicht funktionsfähig sind und somit vermutlich im Endoplasmatischen Retikulum verbleiben. Eine Übersicht über EndoH-Resistenz und Zelloberflächenlokalisierung wird in Tabelle 4.2 dargestellt, wobei die  $\alpha$ -Ketten in der ersten Spalte und die  $\beta$ -Ketten in der ersten Zeile der Tabelle beschrieben werden. Die Vermutung, dass eine Einzelkette, unabhängig von der Kombination aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, nicht zur Bildung eines funktionellen Rezeptors herangezogen werden kann, wird aufgrund der Resultate dieser Arbeit ausgeschlossen. Jedes Allel wurde in einer bestimmten Allotypenkombination sowohl auf der Oberfläche detektiert, sowie auch als EndoH-resistent bestimmt.

**Tabelle 4.2: Funktionelle und nicht- funktionelle DQ-Peptidrezeptoren**

HLA $\beta$ -Kette HLA $\alpha$ -Kette	DQB1* 0301	DQB1* 0602	DQB1* 0302	DQB1* 0201
DQA1*0103	—	+	+	—
DQA1*0301	+	—	+	—
DQA1*0501 * (DQA1*0505) **	+	+	+	+

Die Tabelle gibt eine Übersicht über HLA-Klasse-II-DQ-Peptidrezeptoren. Anhand der Kombination einer  $\alpha$ - mit einer  $\beta$ -Kette ergibt sich jeweils ein DQ-Heterodimer. Die cDNS der jeweiligen Allele wurde in menschlichen Lungenfibroblasten transfiziert. In Anwesenheit der Invarianten Kette wurden die Heterodimere auf die Reifung der Kohlenhydrate im Golgi Apparat und die Oberflächenexpression getestet.

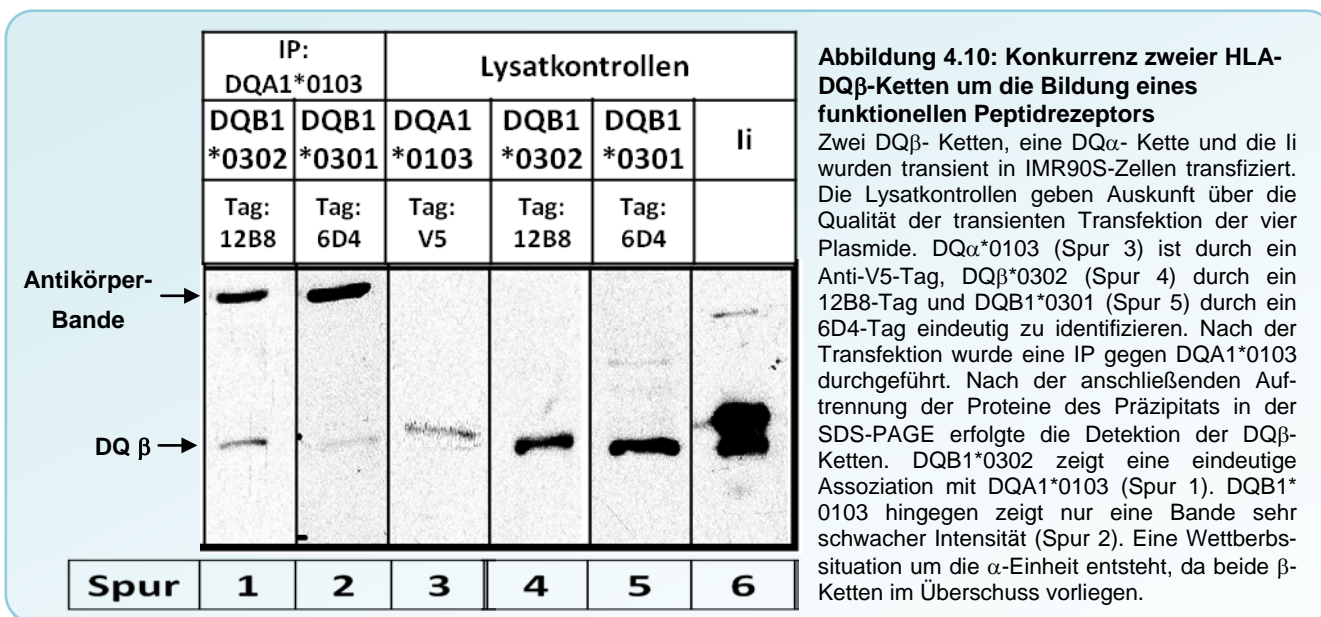
Die mit einem „+“ gekennzeichneten Dimere wurden als EndoH-resistent getestet und zusätzlich auf der Zelloberfläche in der Durchflusszytometrie detektiert. Kombinationen, die mit einem „—“ gekennzeichnet sind, wurden trotz der Anwesenheit von der Invarianten Kette sensitiv gegenüber dem Enzym EndoH getestet und konnten im Durchflusszytometer nicht auf der Zelloberfläche gefunden werden.

\* \*\* Die Allele DQA1\*0501 und \*0505 unterscheiden sich auf Proteinebene nicht. Unterschiede auf AS-Ebene gibt es nur in der Signalsequenz. Beide Allele wurden getestet. Zur vereinfachten Darstellung wird jedoch nur DQA1\*0501 in der Ergebnisbeschreibung genannt.

### 4.3.2 Konkurrenz zweier DQ $\beta$ -Ketten um die Bindung an eine DQ $\alpha$ - Kette

Die Ergebnisse des vorherigen Abschnitts zeigen deutlich, dass es DQ-Allelkombinationen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette gibt, die als Heterodimer nicht transportkompetent sind. Die nicht-funktionsfähigen Allotypen verlassen vermutlich das ER nicht. Dabei soll im Folgenden die Frage geklärt werden, ob nicht-funktionelle DQ-Untereinheiten sich überhaupt zu einem Heterodimer zusammenlagern. Es besteht die Möglichkeit, dass die HLA-Untereinheiten strukturell so verschieden sind, dass beide sich nicht zu einem Dimer zusammenlagern können. Alternativ ist denkbar, dass beide Subeinheiten kurzfristig aggregieren. Nach einer Qualitätskontrolle dissoziieren die Untereinheiten, damit neue DQ-Ketten auf Kompatibilität überprüft werden können.

Um dieser Fragestellung nachzugehen wurde die Konkurrenz zweier  $\beta$ -Ketten untersucht. IMR90S-Zellen wurden mit einer DQ $\alpha$ -Kette (0103), zwei DQ $\beta$ -Ketten (0301 und 0302) und der li transient transfiziert. Dabei wurde die  $\alpha$ -Kette, zuvor mit DQB1\*0301 als nicht-funktionsfähig bestimmt, in Kombination mit  $\beta$ \*0302 als transportkompetent charakterisiert. Unterschiedliche Anhänge der DQ-Subeinheiten ermöglichten eine differenzierte Detektion der einzelnen Ketten durch den Einsatz spezifischer Antikörper. Die Alpha-Kette wurde über einen Anti-V5-Antikörper, DQB1\*0301 über einen Anti-6D4-Antikörper und DQB1\*0302 über einen Anti-12B8-Antikörper spezifisch detektiert. In Abbildung 4.10 zeigt sich die Entstehung einer Konkurrenzsituation um die Alpha-Kettenbindung (Spur 3), da beide  $\beta$ -Ketten (Spur 4 und 5) zwar gleichstark, aber im Vergleich zur  $\alpha$ -Kette im Überschuss vorliegen.



Eine Aussage hinsichtlich der Konkurrenz um die Bindung an die  $\alpha$ -Untereinheit wurde mittels Durchführung einer Ko-Immunitätspräzipitation möglich. Dazu wurden die Zellen mit 0,5% NP-40 lysiert und es folgte eine Immunitätspräzipitation von DQA1\*0103 durch Einsatz von Protein A-Sepharose und dem Primärantikörper Anti-V5 (Invitrogen). Im Anschluss

wurde die Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE und den Western Blot durchgeführt. Nach Immunfärbung von DQB1\*0302 (Spur 1) über den 12B8-Antikörper und DQB1\*0301 (Spur 2) über den 6D4-Primärantikörper wurden diese in zwei unterschiedlichen Gelspuren aufgetrennt und detektiert.

In Spur 1 der Abb. 4.10 wird mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa eine deutlich sichtbare Proteinbande aufgezeigt, die der DQ $\beta$ -Kette (0301 bzw. 0302) entspricht. Aufgrund der vorangegangenen Immunpräzipitation der DQ $\alpha$ -Kette ist die Assoziation des Allotyps DQ $\alpha$ /DQ $\beta$  0103/0302 nachgewiesen. Die Alpha-Kette liegt zum größten Teil an DQB1\*0302 gebunden vor und bildet in dieser Allelkombination einen Peptidrezeptor, der im Anschluss den Golgi Komplex auf dem Transportweg zur Zelloberfläche durchläuft. Diese Kombination ist zuvor sowohl als EndoH-resistent, sowie oberflächen-exprimiert, getestet worden. In Spur 2 hingegen wurde nur eine Bande sehr geringer Intensität sichtbar. Die Aggregation von DQ\*0103 mit DQB1\*0301 ist somit vergleichsweise schwach und wirkt im Vergleich mit der anderen Allelkombination vernachlässigbar. In dieser Konstellation konnte zuvor kein Hinweis auf den Transport zur Zelloberfläche gefunden werden. Ein Hinweis auf die Kohlenhydratmodifikation im Golgi wurde nicht festgestellt.

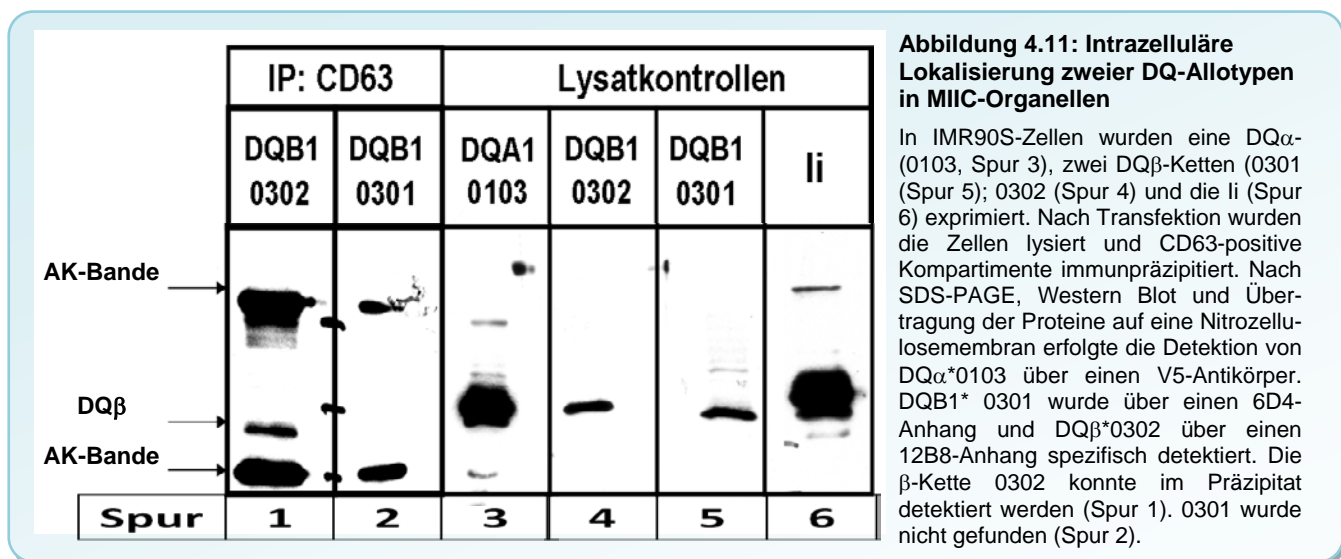
Ausgehend von diesen Ergebnissen liegt die Vermutung nahe, dass die nicht-transportkompetente Allelkombination zwar im ER zu einem Heterodimer aggregiert, jedoch das ER nicht verlässt. Um diese Vermutung zu belegen musste in einer weiteren Versuchsanordnung überprüft werden, ob die Allelkombination 0103/0301 im ER verbleibt oder aus diesem freigesetzt werden kann. Zu diesem Zweck wurde eine Kolokalisierung von DQB1\*0302 bzw. DQB1\*0301 mit CD63-positiven Kompartimenten überprüft. CD63 wird als Lokalisierungsmarker verwendet, um Zellorganellen des Antigenprozessierungsweges der Klasse-II zu identifizieren.

IMR90S-Zellen wurden erneut mit einer DQ $\alpha$ - (DQA1\*0103), zwei DQ $\beta$ -Ketten und der Ii transfiziert. Das Zelllysate wurde der Immunpräzipitation mit Protein G-Sepharose und einem CD63-spezifischen Antikörper zugeführt. Nach der Immunpräzipitation der spezifischen Proteinkomplexe folgte die Auftrennung der aufgereinigten Proteine über die SDS-PAGE und Immunoblotting. Die Immunfärbung der beiden Beta-Ketten erfolgte erneut mittels des Einsatzes zweier spezifischer Primärantikörper (12B8 bzw. 6D4) in Kombination mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper.

Nach der Isolierung von CD63-positiven Kompartimenten zeigt sich in Abbildung 4.11 eine eindeutige Proteinbande mit dem Molekulargewicht der DQ $\alpha$ -Kette in Spur 1 und somit die Kolokalisierung von DQB1\*0302 mit diesen spezifischen Zellorganellen. Der Marker CD63 dient der spezifischen Lokalisierung des lysosomalen Kompartiments, sowie MIIC-Kompartimenten, in denen häufig die Peptidbeladung der HLA-Klasse-II-Moleküle stattfindet. Die hier gezeigte Kolokalisierung ist somit ein Hinweis auf den Transport der Allelkombination DQA1\*0103/DQB1\*0302 als funktioneller Peptidrezeptor aus dem ER bis in das MIIC-Kompartiment. Bei der Analyse des zuvor als nicht funktionsfähig deklarierten DQ $\alpha$ /DQB1\*0301-Dimers zeigte sich keine Assoziation mit

dem CD63-Marker. Nach Immunfärbung konnten keine Proteine mit dem Molekulargewicht von ca. 35 kDa in Spur 2 (Abbildung 4.11) detektiert werden.

Die Ergebnisse der beiden Versuchsanordnungen aus Abbildung 4.10 und 4.11 zeigen, dass, bei Vorliegen einer Konkurrenzsituation, eine funktionelle Allelkombination in Konkurrenz zu einer nicht-funktionsfähigen Kombination steht. Dabei kompetiert eine passende Beta-Kette eine nicht-passende Beta-Kette, so dass die Alpha-Kette nur als funktionelle Untereinheit eines Heterodimers das ER verlässt. Nach Verlassen des ER's erfährt diese transportkompetente Form bei Golgi-Passage die Reifung ihrer N-Glykane und kann mittels des CD63-Markers in MIIC-Kompartimenten detektiert werden. Eine nicht-funktionelle Kombination aus Alpha- und Beta-Kette verlässt das ER nicht und eine Dissoziation beider DQ-Untereinheiten ist sehr wahrscheinlich, so dass neue Allelkombinationen auf Funktionalität geprüft werden können.



### 4.3.3 Berechnung des Kopplungsungleichgewichts von HLA-DQ $\alpha$ und -DQ $\beta$

Zur Untersuchung der klinischen Bedeutung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.3.1 und 4.3.2 wurden Daten zu Allelhäufigkeiten und dem frequentiellen Auftreten von Haplotypen ausgewertet. Der Datenbasissatz wurde dabei aus der Datenbank „Allele-frequencies“ ([www.allele-frequencies.net](http://www.allele-frequencies.net); April 2010) entnommen. In dieser Datenbank befinden sich über 80.000 detaillierte Angaben zur HLA-Verteilung. Insgesamt sind hier 786 verschiedene Populationsstudien zusammengefasst, was eine Gesamtzahl von 777 Allel- und 344 Haplotypen-Datensätzen ergibt. Die Angaben in der Datenbank werden entweder nach ethnischer Population, nach spezifischen HLA-Allel bzw. der Haplotypen-Zugehörigkeit sortiert.

Die Datenbasis dieser Arbeit zeigt, dass die über 2.300 möglichen Kombinationen aus DQ $\alpha$ - und DQ $\beta$ -Ketten in der Praxis in stark limitierter Vielfalt in Form eines Haplotypen auftauchen. Um das Vorkommen von nicht-funktionellen Allelkombinationen besser eingrenzen zu können, sollte anhand von Stichproben aus verschiedenen ethnischen Populationen, die Häufigkeit dieser nicht-funktionellen Allotypen überprüft werden. Da es sich bei den untersuchten Allelkombinationen um einzelne Allele mit unterschiedlicher Frequenz handelt, soll das Kopplungsungleichgewicht eine Aussage vermitteln, inwiefern ein Regulationsmechanismus existiert, der transportinkompetenten Allelkombinationen auf einem Chromosom verhindert. Gleichzeitig soll anhand des Kopplungsungleichgewichts die Verlinkung (Kopplung) von sehr stabilen Allelkombinationen auf einem Chromosom nachgewiesen werden. Diese Kombinationen sollten, gemäß ihrer strukturellen Voraussetzungen, erwartungsgemäß zu einem funktionsfähigen Heterodimer assoziiert werden können.

Aufgrund der Tatsache, dass HLA-Klasse-II-Allele evolutionsbedingt regional unterschiedlich häufig vorkommen, wurde das Augenmerk auf die Auswertung des Kopplungsungleichgewichts innerhalb einzelner Populationen gelegt. Zu diesem Zweck wurden aus der Datenbank „Allele frequencies“ die Datensätze aller ethnischen Gruppen analysiert, die eine Stichprobengröße von über 150 Probanden aufweisen. Weiterhin mussten sowohl die Daten für die Allelhäufigkeit der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette innerhalb der Gruppe, sowie die Haplotypenhäufigkeiten, über die Datenbank einsehbar sein. Nach diesem Ausschlussverfahren blieben 20 ethnische Gruppen mit unterschiedlicher Herkunftsregion übrig. Innerhalb jeder Gruppe wurden alle dargestellten Haplotypen auf den Isotypen DQ reduziert, d.h. alle Haplotypen mit gleichen DQA1- und DQB1-Allelen wurden zusammengefasst und die Häufigkeit für diesen DQ-Haplotypen errechnet. Der Abgleich dieses Wertes erfolgte mit der erwarteten Wahrscheinlichkeit für einen Haplotypen, die sich aus dem Produkt der einzelnen Häufigkeiten für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten errechnet. Die Differenz aus der Häufigkeit des Haplotypen und dem theoretischen Wert (DQA1 x DQB1) ergibt das Kopplungsungleichgewicht  $\Delta$  (Delta).

Um einen vollständigen Abgleich der Datenbank mit den hier untersuchten Allelkombinationen zu gewährleisten, wurden für die nicht-funktionellen DQ-Allotypen DQA1-DQB1 0103/0201, 0103/0301, 0301/0201 und 0301/0602 der Haplotyp mit „0,00%“ beschrieben und mit der errechneten Wahrscheinlichkeit für das Auftauchen des jeweiligen Haplotypen abgeglichen. Voraussetzung war lediglich das Vorkommen der einzelnen Allele innerhalb der Gruppe.

Für alle Haplotypen, die mit einer Häufigkeit von 0,00% beschrieben werden, muss jedoch hinsichtlich der Ergebnisauswertung berücksichtigt werden, dass ein Algorithmus zur Haplotypenbeschreibung sehr seltene Haplotypen nicht berücksichtigt (siehe Abschnitt 2.2.3). In der Datenbank „Allele frequencies“ können lediglich Haplotypenfrequenzen ab einer Häufigkeit von  $> 1\%$  eingetragen werden. Die Häufigkeit von 0,00% beschreibt somit lediglich sehr seltene Allele, die in der zu untersuchenden Stichprobe unter 1% vorkommen.

**Tabelle 4.3: Kopplungsungleichgewicht von HLA-DQ-Haplotypen**

Aus der Datenbank „Allele frequencies“ wurden 20 ethnische Populationen anhand verschiedener Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt und nach dem DQ-Haplotypen ausgewertet. Hier ist ein Auszug dieser Auswertung aus Tabelle 6.4 gezeigt. Beispielfhaft werden ausgewählte DQ-Haplotypen aus den verschiedenen Ethnien, nach Kontinent sortiert, getrennt aufgelistet. Innerhalb einer Population wurden die tatsächlich gefundenen Haplotypen-Kombinationen anhand ihrer Häufigkeit mit den Allelfrequenzen der DQ-Subeinheiten und der daraus errechneten theoretischen Häufigkeit verglichen. Die Differenz dieser Häufigkeitsverteilung ist das Kopplungsungleichgewicht  $\Delta$ . Ein positiver Wert beschreibt eine starke Verlinkung der beiden Gene eines Chromosoms. Ein negativer Wert zeigt, dass sich diese Allelkombinationen sehr selten auf einem Chromosom befinden und sie bei der „en-bloc“-Vererbung keine Rolle spielen. In dieser Tabelle sind die Haplotypen des jeweiligen Kontinents aufgelistet, die eine besonders starke Kopplung innerhalb einer ethnischen Population aufweisen. In der unteren Tabelle sind nicht-funktionelle Allelkombinationen als Haplotyp dargestellt, auch wenn sie nicht als Haplotyp in der Datenbank auftauchten, sondern lediglich als Einzelallele in den Populationen zu finden sind. Blau hinterlegt sind dabei die vier nicht-transportierten Allelkombinationen, die beispielhaft an der Ethnie „India Northeast Kayastha“ dargestellt werden. Zudem sind weitere Beispiele anderer Ethnien aufgeführt.

Haplotyp HLA-DQ	Ethnie	n	Allel-frequenz DQA1 (2n)	Allel-frequenz DQB1 (2n)	Produkt DQ $\alpha$ /DQ $\beta$ (2n)	Haplotypen -frequenz (2n)	Kopplung $\Delta$
<b>Asien</b>							
DQA1*0101-DQB1*0501	South Korea pop 1	324	7,60%	8,80%	0,67%	11,20%	10,53%
DQA1*0103-DQB1*0601	Japan pop2	916	16,90%	16,10%	2,72%	15,60%	12,88%
DQA1*0104-DQB1*0501	India Uttar Pradesh Hindu	202	14,10%	11,90%	1,68%	8,90%	7,22%
DQA1*0201-DQB1*0201	India Northeast Vaish	198	20,90%	17,40%	3,64%	12,60%	8,96%
DQA1*0301-DQB1*0303	China Canton Han	264	26,70%	15,00%	4,01%	13,10%	9,10%
DQA1*0301-DQB1*0401	Japan pop2	916	42,30%	15,10%	6,39%	14,70%	8,31%
DQA1*0501-DQB1*0301	Japan pop2	916	8,70%	13,10%	1,14%	8,10%	6,96%
<b>Amerika</b>							
DQA1*0301-DQB1*0302	Mexico Highlands Mestizos	160	28,80%	26,60%	7,66%	26,00%	18,34%
DQA1*0401-DQB1*0402	Mexico Highlands Mestizos	160	15,00%	15,00%	2,25%	15,40%	13,15%
DQA1*0501-DQB1*0301	Mexico Highlands Mestizos	160	27,20%	24,70%	6,72%	21,00%	14,28%
<b>Europa</b>							
DQA1*0101-DQB1*0501	Russia Northwest Slavic	200	15,50%	13,00%	2,02%	12,00%	9,99%
DQA1*0101-DQB1*0501	England Caucasoid	177	16,10%	13,30%	2,14%	12,50%	10,36%
DQA1*0102-DQB1*0502	Greece pop3	246	25,10%	16,40%	4,12%	15,60%	11,48%
DQA1*0102-DQB1*0602	England Caucasoid	177	18,40%	14,40%	2,65%	14,10%	11,45%
DQA1*0301-DQB1*0302	England Caucasoid	177	23,70%	16,40%	3,89%	15,30%	11,41%
DQA1*0501-DQB1*0301	Russia Northwest Slavic	200	26,50%	20,00%	5,30%	15,50%	10,20%
DQA1*0501-DQB1*0301	Greece pop3	246	38,30%	32,50%	12,45%	28,80%	16,35%
<b>Afrika</b>							
DQA1*0101-DQB1*0501	Gabon Haut-Ogooue Province	167	15,00%	14,70%	2,21%	12,20%	10,00%
DQA1*0102-DQB1*0602	Cameroon Saa	172	36,30%	30,80%	11,18%	30,50%	19,32%
DQA1*0301-DQB1*0303	Cameroon Saa	172	27,30%	24,10%	6,58%	24,10%	17,52%
DQA1*0501-DQB1*0301	Gabon Haut-Ogooue Province	167	17,70%	10,20%	1,81%	10,00%	8,19%

Haplotyp HLA-DQ („nicht-funktionell“)	Ethnie	n	Allel-frequenz DQA1	Allel-frequenz DQB1	Produkt DQ $\alpha$ /DQ $\beta$	Haplotypen -frequenz	Kopplung $\Delta$
DQA1*0103-DQB1*0201	India Northeast Kayastha	190	16,00%	23,90%	3,82%	0,00%	-3,82%
DQA1*0103-DQB1*0301	India Northeast Kayastha	190	16,00%	13,70%	2,19%	0,00%	-2,19%
DQA1*0301-DQB1*0201	India Northeast Kayastha	190	15,50%	23,90%	3,70%	<b>1,80%</b>	-1,90%
DQA1*0301-DQB1*0602	India Northeast Kayastha	190	15,50%	3,90%	0,60%	0,00%	-0,60%
DQA1*0301-DQB1*0201	Mexico Highlands Mestizos	160	28,80%	10,60%	3,05%	0,00%	-3,05%
DQA1*0301-DQB1*0602	Cameroon Saa	172	27,30%	30,80%	8,41%	0,00%	-8,41%
DQA1*0301-DQB1*0201	England Caucasoid	177	23,70%	23,20%	5,50%	0,00%	-5,50%
DQA1*0301-DQB1*0201	Gabon Haut-Ogooue Province	167	7,50%	16,80%	1,26%	<b>4,50%</b>	3,24%
DQA1*0301-DQB1*0201	India Northeast Vaish	198	10,10%	17,40%	1,76%	<b>2,20%</b>	0,44%

---

Das Gesamtergebnis dieser Auswertung ist im Anhang unter Tabelle 6.4 dargestellt, in der alle Kopplungsungleichgewichte für jeden Haplotypen der jeweiligen Ethnie nachzulesen sind. Die Ergebnisse sind dabei nach Kontinenten geordnet, da innerhalb eines Kontinents oftmals ähnliche Häufigkeitsverteilungen zu erkennen sind. Von den insgesamt 20 Ethnien sind elf Gruppen in Asien, zwei Populationen in Afrika, sechs Stichproben in Europa und eine ethnische Population in Amerika lokalisiert.

Bei der Auswertung zeigt sich insgesamt, dass vor allem Haplotypen mit positivem Vorzeichen gefunden werden. Nur wenige Ausnahmen haben ein negatives Vorzeichen. Hintergrund dabei ist, dass seltene Allele mit einer Häufigkeit von <1,00% nicht in der Datenbank „Allele frequencies.net“ erscheinen und die meisten Haplotypen mit einem negativen Vorzeichen nicht aufgelistet werden. Negative Kopplungen aus den aufgeführten Haplotypen zeigt vor allem DQA1\*0301 / DQB1\*0301, dass zwar die 1% Grenze überschreitet, aber dennoch nicht den erwarteten Häufigkeitswert erreicht.

In Tabelle 4.3 ist ein Auszug abgebildet, der in der oberen Tabelle Auskunft über hochfrequente Haplotypen der jeweiligen Ethnien gibt, die ein stark positives Kopplungsungleichgewicht aufweisen. Diese Haplotypen gelten als besonders stabil und werden in der jeweiligen Population positiv selektioniert. In Asien zeigt sich besonders die DQ $\alpha$ / $\beta$ -Kombination 0201/0201 als sehr stabil. In drei unterschiedlichen Ethnien wird ein Kopplungsungleichgewicht von durchschnittlich ca. + 9% ermittelt. Die stärkste positive Kopplung wird in Asien (Southkorea Pop 1; +15,76%) für den Haplotypen 0103/0601 gefunden. In den beiden afrikanischen Ethnien zeigen sich zwei andere Haplotypen als besonders stark gekoppelt. Besonders DQA1\*0102/DQB1\*0602 weist extrem hohe Deltawerte in beiden untersuchten Gruppen auf. Auch DQ $\alpha$ / $\beta$  0301/0303 ist durch sehr hohe Differenzen zwischen Erwartungswert und beobachtetem Wert charakterisiert. Die sechs europäischen Gruppen zeigen sehr homogene Verteilungen hinsichtlich der Haplotypen. Die Allelkombinationen DQ $\alpha$ / $\beta$  0101/0501, 0102/0602 und 0501/0301 sind mit den größten Delta-Werten in Europa belegt. In Amerika konnte nur die Ethnie „Mexico Metizos“ ausgewertet werden. Aus den Berechnungen für diese Stichprobe sind die Haplotypen DQA1/DQB1 0301/0302, 0401/0402 und 0501/0301 als besonders stabil innerhalb der mexikanischen Population gekennzeichnet.

Im unteren Teil der Tabelle 4.3 ist beispielhaft ein Ergebnisauszug für die Haplotypen aufgelistet, die durch die experimentellen Daten dieser Arbeit als transportinkompetent beschrieben wurden. Im Allgemeinen wird deutlich, dass diese Haplotypen sehr selten beobachtet werden. Die nicht-funktionellen Haplotypen DQ $\alpha$ / $\beta$  0103/0201, 0103/0301 und 0301/0602 werden dabei in keiner der untersuchten Ethnien gelistet. Somit sind diese drei Allelkombinationen sehr seltene Haplotypen, die mit einer Häufigkeit unter 1% vorkommen. Lediglich der Haplotyp DQA1\*0301/DQB1\*0201 wird in der Datenbank in den untersuchten Stichproben gelistet. Diese Haplotypen-Allelkombination wird vor allem in Asien in fünf von elf Populationen mit einer jedoch relativ geringen Prävalenz zwischen 1 – 2 % beobachtet. Bei Betrachtung des Kopplungsungleichgewichts zeigt sich aber nicht nur für die sehr seltenen Haplotypen (0,00%) ein negativer Delta-Wert, auch die Allelkombination DQ $\alpha$ /DQ $\beta$  0301/0201 ist in den meisten ethnischen



Populationen mit negativem Vorzeichen belegt. In der Tabelle 4.3 (unten) ist beispielhaft die Population „Kayasta“ aus Indien aufgeführt. Trotz der ermittelten Häufigkeit des Haplotypen von 1,80% wird eine negative Kopplung von – 1,9% errechnet.

Zwei Ausnahmen hinsichtlich der Negativkopplung sind in Tabelle 4.3 innerhalb der Ethnien „Gabon Haut-Ogooue Province“ und „India Northeast Vaish“ zu erkennen. In beiden Populationen resultierte ein positiver Deltawert für diese nicht-funktionelle Allelkombination 0301/0201. In Amerika hingegen ist die stärkste negative Kopplung der transportinkompetenten Haplotypen genau für diese Kombination belegt.

**Tabelle 4.4: Haplotypen und gemittelttes Kopplungsungleichgewicht**

Aus den in Tabelle 4.3 dargestellten Kopplungsungleichgewichten der DQ-Haplotypen wurde in dieser Tabelle das arithmetische Mittel der Kopplungsungleichgewichte über alle 20 ethnischen Populationen dargestellt. Die mit einem negativen Kennzeichen dargestellten Werte zeigen eine negative Kopplung an, d.h. rein rechnerisch sollte diese Allelkombination als DQ-Haplotyp häufiger vorkommen als der tatsächliche Wert. Eine positive Kopplung ist mit positivem Vorzeichen belegt und sagt aus, dass diese Allelkombination als Haplotyp häufiger vorkommt als der rechnerische Wert der Häufigkeit aussagt. Türkis hinterlegt sind die Allelkombinationen, die in dieser Arbeit auf Transportkompetenz untersucht wurden und als „nicht-funktionell“ charakterisiert wurden. Gelb hinterlegte Allele fielen in der Analyse der einzelnen Ethnien als besonders stabil auf, was durch die jetzige Darstellung belegt wird.

Haplotyp HLA-DQ	Kopplungsun- gleichgewicht aus 20 Ethnien	Haplotyp HLA-DQ	Kopplungsun- gleichgewicht aus 20 Ethnien	Haplotyp HLA-DQ	Kopplungsun- gleichgewicht aus 20 Ethnien
DQA1*0102-DQB1*0501	-2,30%	DQA1*0104-DQB1*0503	1,71%	DQA1*0104-DQB1*0502	4,37%
DQA1*0301-DQB1*0201	-1,86%	DQA1*0201-DQB1*0303	2,03%	DQA1*0401-DQB1*0402	4,75%
DQA1*0301-DQB1*0301	-1,78%	DQA1*0103-DQB1*0603	2,13%	DQA1*0101-DQB1*0501	5,02%
DQA1*0103-DQB1*0201	-1,60%	DQA1*0601-DQB1*0301	2,32%	DQA1*0102-DQB1*0605	5,09%
DQA1*0103-DQB1*0301	-1,59%	DQA1*0101-DQB1*0502	2,43%	DQA1*0301-DQB1*0303	5,13%
DQA1*0301-DQB1*0602	-1,50%	DQA1*0101-DQB1*0503	2,48%	DQA1*0201-DQB1*0201	5,28%
DQA1*0101-DQB1*0301	-0,97%	DQA1*0501-DQB1*0201	2,48%	DQA1*0102-DQB1*0502	5,31%
DQA1*0501-DQB1*0601	-0,38%	DQA1*0303-DQB1*0402	2,66%	DQA1*0505-DQB1*0301	5,43%
DQA1*0301-DQB1*0402	-0,12%	DQA1*0102-DQB1*0604	2,86%	DQA1*0301-DQB1*0302	6,10%
DQA1*0103-DQB1*0503	0,51%	DQA1*0103-DQB1*0604	3,25%	DQA1*0501-DQB1*0301	6,23%
DQA1*0102-DQB1*0603	0,74%	DQA1*0104-DQB1*0501	3,44%	DQA1*0303-DQB1*0401	6,32%
DQA1*0103-DQB1*0501	0,99%	DQA1*0401-DQB1*0301	3,62%	DQA1*0102-DQB1*0602	7,86%
DQA1*0105-DQB1*0501	1,04%	DQA1*0201-DQB1*0202	3,99%	DQA1*0302-DQB1*0303	9,75%
DQA1*0102-DQB1*0609	1,24%	DQA1*0301-DQB1*0401	4,00%		
DQA1*0102-DQB1*0601	1,25%	DQA1*0103-DQB1*0601	4,35%		

Allgemein lässt sich feststellen, dass es weltweit, trotz des stark ausgeprägten Polymorphismus, nur wenige Haplotypen gibt, die bevorzugt vererbt werden. Diese Allelkombinationen sind mit einem stark positiven Kopplungsungleichgewicht beschrieben. Hingegen gibt es andere Allelkombinationen, die nur selten in einem Haplotypen vorkommen und somit selten zusammen vererbt werden. Zu diesen Allelkombinationen zählen auch die in dieser Arbeit vorgestellten nicht-funktionellen DQ-Haplotypen, die weder auf der Zelloberfläche detektiert wurden, noch eine reife Glykosylierungsform ihrer N-Glykane aufweisen. Bei einer Zusammenfassung der

Kopplungsungleichgewichte als Durchschnittswerte (arithmetisches Mittel) über alle 20 ethnischen Populationen zeigt sich in Tabelle 4.4 eine ähnliche Tendenz wie in den vorangegangenen Ergebnissen. Die gelb unterlegten Haplotypen wurden zuvor in ihren jeweiligen Gruppen (s. Tabelle 4.3) als besonders stabil erkannt und zeigen auch in dieser Zusammenfassung sehr starke Deltawerte. Hingegen sind die nicht-transportierten Allelkombinationen (s. Abschnitt 4.3.1; türkis unterlegt) auch über die verschiedenen Gruppen durch eine negative Kopplung charakterisiert. Diese vier Haplotypen sind nur selten in direkter Kopplung zu finden, was die Wahrscheinlichkeit eines Vorkommens in einem Individuum stark absenkt. Das Vorkommen von nicht-funktionellen Allelkombinationen in einem Individuum ist somit wohl nur in trans-Kombination möglich. Eine vollkommene Transportinkompetenz aller vier möglichen DQ-Heterodimere in einem Individuum erscheint somit als äußerst unwahrscheinlich. Eine Peptidpräsentation über DQ-Moleküle ist vermutlich stets gewährleistet und ein totaler Ausfall funktioneller DQ-Moleküle würde erstaunen.

## 4.4 Analysen der DR- und DQ-Struktur

### 4.4.1 Herstellung eines HLA-DQ-Moleküls mit HLA-DR-Strukturmerkmalen

Ein Vergleich der dreidimensionalen Struktur von HLA-DQ-Molekülen mit DR-Peptidrezeptoren zeigt, dass es strukturelle Unterschiede zwischen beiden Klasse-II-Ketten gibt, die sich auch in den unterschiedlichen Mustern des Transports und der N-Glykanreifung erkennen lassen. Um diese Unterschiede auf die Primärstruktur zurückführen zu können, wurde ein Sequenzabgleich zwischen DQ $\beta$ - und DR $\beta$ -Ketten durchgeführt. Gesucht wurden die Sequenzbereiche, die innerhalb aller Allele von DQ $\beta$ , sowie auch innerhalb der Gruppe der DR-Moleküle, konserviert vorliegen, sich aber gleichzeitig in den beiden Isotypen unterscheiden.

Als Ergebnis konnten elf Aminosäuren identifiziert werden, welche die genannten Bedingungen erfüllen. Drei dieser spezifischen Aminosäuren wurden, aufgrund ihrer strukturellen Nähe (Sequenzbereich bestehend aus neun Aminosäuren) ausgewählt, um diese mit Hilfe des Overlap-Extension-PCR-Verfahrens von der AS des DQ-Allels zu der entsprechenden AS eines DR-Allels zu mutieren. Mit der Hilfe eines individuell synthetisierten Oligonukleotidpaars (Mutationsprimer; siehe Abschnitt 4.2.10, Pu3 / Pu4) konnten gezielt die Ein-Basen-Mutationen (siehe Tabelle 4.5) eingeführt werden. Die

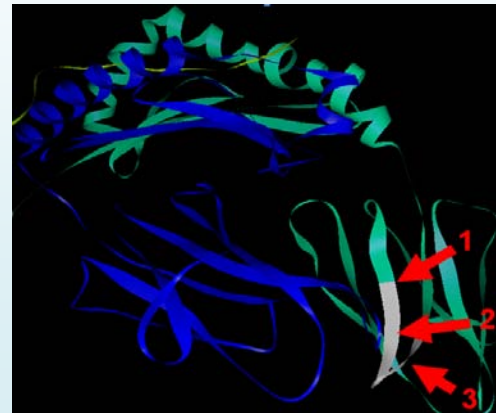
genaue AS-Sequenz der mutierten DQ-Subeinheit ist im Anhang unter Tabelle 6.2 nachzulesen.

Als Ausgangsmaterial für die PCR diente die Plasmid-DNS des Allels DQB1\*0302. Die Kontrolle der Amplifikation der mutierten DNS geschah zunächst durch Auftrennung im Agarosegel. Anschließend erfolgte die Klonierung im pcDNS3.1-Expressionsvektor und die Transformation in TOP10 Bakterien (Invitrogen). Das Klonierungsprodukt wurde nach Restriktionsverdau mit Endonukleasen im Agarosegel auf die richtige Größe der geschnittenen, linearisierten Teilprodukte getestet. Durch die anschließende Transfektion in COS-7-Zellen wurde die Exprimierbarkeit im Zellsystem sicher gestellt. Alle diese Kontrollen konnten als positiv ausgewertet werden (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 4.5: Übersicht über eingeführte Punktmutationen in einer HLA-DQ-Kette**

Die Mutation von drei Aminosäuren einer DQ $\beta$ -Kette sollte die Schlüsselfunktion dieser Aminosäuren für die Transporteigenschaften überprüfen. Die Mutationen wurden mittels des Overlap-Extension-PCR Verfahrens eingeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Mutationsprimer synthetisiert, der den AS-Austausch von Ile133 zu Val, Arg137 zu Lys und Asn142 zu Gln ermöglichte. Alle drei Aminosäuren befinden sich in der  $\beta$ 2-Domäne. Die Positionen der mutierten AS sind anhand des Strukturmodells mit roten Pfeilen angezeigt. Das Strukturmodell zeigt DQ2 (RCSB-Datenbank) und wurde mittels des Invitrogen 3D-Molecule Viewer dargestellt.

Nr.	AS-Position	Basen-paare	Mutation
1	133	397 -399	Austausch eines Ile (ATC) durch Val (GTC)
2	137	409 - 411	Austausch eines Arg (AGG) durch Lys (AAG)
3	142	424 - 426	Austausch eines Asn (AAC) durch Gln (CAG)



#### 4.4.2 Überprüfung der Kohlenhydratreifung einer mutierten DQ $\beta$ -Kette

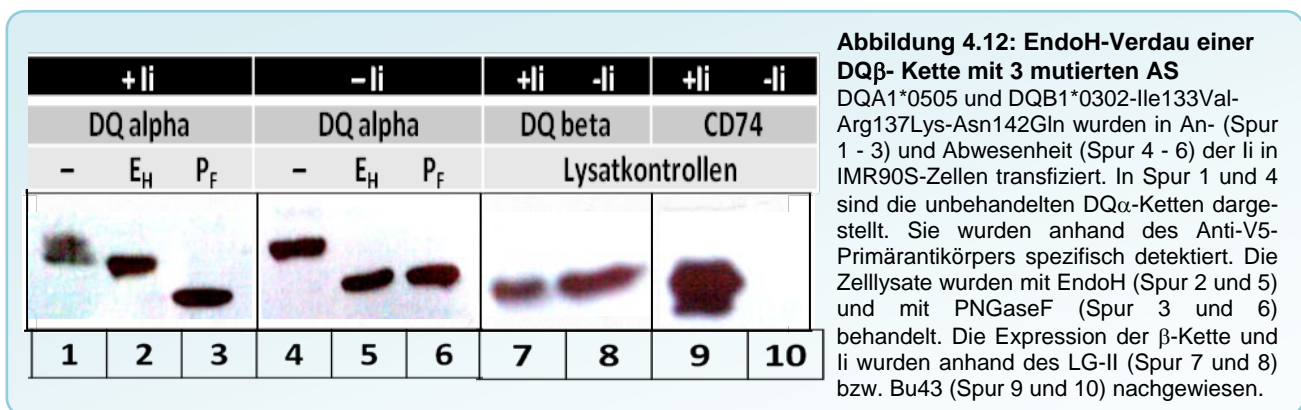
Eine klare Abgrenzung zwischen DR- und DQ-Molekülen war bisher anhand der Analyse der Kohlenhydratstruktur der N-Glykane in Abwesenheit der Ii möglich. Die Ergebnisse aus Kapitel 4.2.1 zeigen für DR-Moleküle eine Reifung der N-Glykane unabhängig von der Anwesenheit der Ii. In Abschnitt 4.2.2 führte die Behandlung von HLA-DQ-Molekülen mit EndoH zu einer N-Deglykosylierung. Diese Sensitivität gegenüber EndoH unterscheidet DQ-Moleküle eindeutig von DR-Rezeptoren in Abwesenheit der Ii.

Anhand dieser Charakteristika für die beiden Isotypen wurde die Behandlung der Proben mit EndoH herangezogen, um die DQB1-Mutante auf die Reifung der Kohlenhydrate zu untersuchen und die Mutante einem bestimmten Isotyp zuordnen zu können. Für die transiente Transfektion wurden erneut IMR90S-Lungenfibroblasten ausgewählt. Die Transfektion der DQ $\beta$ -Mutante und einer DQ $\alpha$ -Kette erfolgte in An- und Abwesenheit der li.

Das Ergebnis ist in Abbildung 4.12 dargestellt. Die Proteinbanden in den Spuren 1 bis 6 zeigen die erfolgreiche Expression der DQ $\alpha$ -Kette. Die  $\beta$ -Kette konnte zudem in den Spuren 7 und 8 sichtbar gemacht werden und Spur 9 zeigt die Anwesenheit von der li. In Spur 10 findet sich der Beleg, dass der Ansatz ohne Berücksichtigung der Invarianten Kette negativ hinsichtlich der Detektion war. Der enzymatische Verdau des Allotyps in Anwesenheit der li ist in den Spuren 1 bis 3 gezeigt. Anschließend folgt der Verdau der gleichen Kombination in Abwesenheit der li in den Spuren 3 bis 6. Dabei zeigen die Spuren 1 und 4 die unverdaute Alpha-Kette, die Spuren 2 und 5 enthalten die EndoH-behandelte Probe. In Spur 3 und 6 sind die Proben nach PNGaseF-Verdau dargestellt.

Nach Expression der li wird deutlich, dass die detektierten Proteine der  $\alpha$ -Kette eine partielle Resistenz gegenüber EndoH aufweisen (Spur 2), da die zugehörige Proteinbande zwischen der unbehandelten Probe in Spur 1 und der PNGaseF-behandelten Probe in Spur 3 liegt. Wurde li nicht exprimiert, so zeigt sich ein eindeutiges Ergebnis. Alle Polypeptide in Spur 5 sind sensitiv gegenüber einer EndoH-Behandlung. Das Molekulargewicht dieser Proteine entspricht der Laufhöhe von PNGaseF-verdauten Proteinen. Es ist keine Bande in Spur 5 zu erkennen, die hinsichtlich des Molekulargewichtes vergleichbar mit der unverdauten Kontrolle (Spur 4) ist.

Die Kombination aus der DQB1-Mutante und der DQA1\*0505-Kette ähnelt somit in ihrer Glykosylierungsform dem bekannten Muster einer DQ $\alpha$ / $\beta$ -Allelkombination. Die aufgezählten Charakteristika des DR-Isotyps konnten nicht wiedergefunden werden. Dies zeigt auf, dass die drei mutierten Aminosäuren an Position 133, 37 und 142 nicht alleine verantwortlich für den Funktionsunterschied zwischen den Isotypen DR und DQ sind. Das Ergebnis ähnelt dem Resultat des enzymatischen Verdau von DQA1\*0505 und DQB1\*0302.



#### 4.4.3 Die HLA-Isotypen DR und DQ dienen als Vorbild zur Herstellung von chimären Klasse-II-Molekülen

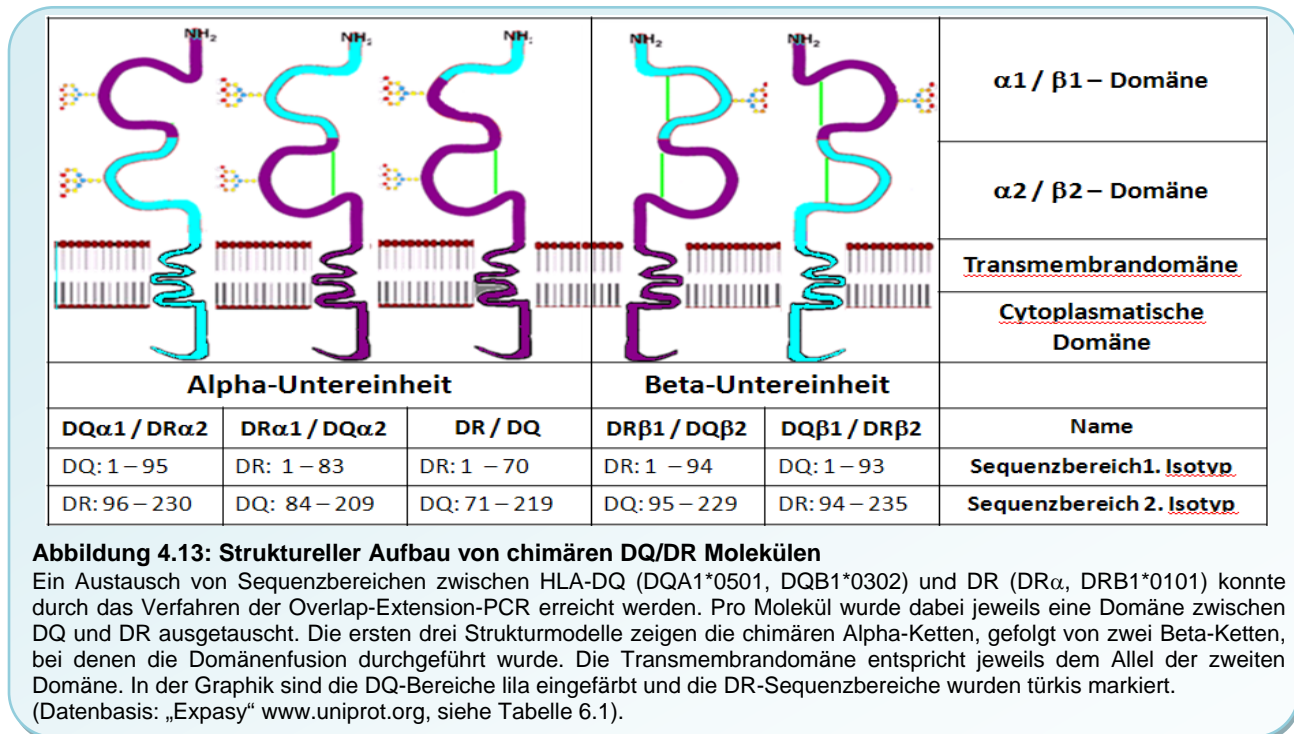
In einer weiteren Bestimmung wurden die Isotypen DR und DQ hinsichtlich der verschiedenen Domänen überprüft. Dabei ist bekannt, dass die zweite Domäne einer HLA-II-Untereinheit einen Sequenzabschnitt enthält, der eine Alpha-Helix formt. Diese Alpha-Helix bildet zusammen mit der gleichen Domäne der zweiten Klasse-II-Subeinheit die seitliche Begrenzung der peptidbindenden Grube. Das restliche Protein zeigt eine  $\beta$ -Faltblattstruktur auf und ist räumlich als Boden der Peptidbindegrube beschrieben. Weiterhin werden diesem Bereich die Transmembrandomäne und der cytosolische Anteil der HLA-II-Heterodimere zugeordnet.

In folgender Versuchsanordnung wurden chimäre Fusionskonstrukte synthetisiert. Die erste Domäne leitet sich von DR (bzw. DQ) ab, wohingegen die Folgedomänen anhand der Vorlage für DQ (bzw. DR) erstellt wurden. Zum Datenabgleich wurde die Proteindatenbank „Expasy“ ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org); siehe Anhang Tabelle 6.1) genutzt. Angaben der Sequenzabschnitte der einzelnen Alpha- und Beta-Ketten konnten somit differenziert dargestellt werden. Die ersten ca. 30 Aminosäuren werden als Signalpeptid beschrieben, wohingegen die folgenden ca. 200 AS als eigentliche HLA-Kette bezeichnet wird. Die Unterteilung der HLA-Klasse-II-Subeinheit in eine  $\alpha$ 1- bzw.  $\beta$ 1- und in eine  $\alpha$ 2- bzw.  $\beta$ 2-Region ist die Basis für die Trennung der Domänenbereiche innerhalb eines Moleküls. Eine genaue Übersicht über die Domänenstruktur der Fusionsmoleküle ist der Abbildung 4.13 zu entnehmen. Dabei wurden die Bereiche, die der AS-Sequenz eines DQ-Moleküls entsprechen, in dem Modell lila hinterlegt. Türkis kennzeichnet die Peptidabschnitte, die sich von einem Allel des DR Isotyps ableiten lassen. Sowohl die Transmembrandomäne als auch der cytosolische Anteil entspricht bei allen hergestellten chimären Konstrukten dem jeweiligen HLA-Klasse-II-Isotypen der zweiten Moleküldomäne.

Ein zusätzliches Fusionsprodukt aus einer DR $\alpha$ - und einer DQ $\alpha$ -Kette wurde synthetisiert. Die AS-Sequenz ähnelt der zuvor beschriebenen chimären DQ/DR-Kette, jedoch liegt im Bereich der  $\alpha$ 1-Domäne ein veränderter Sequenzbereich von 23 AS vor. Die ersten 70 AS der Aminosäuresequenz entsprechen der monomorphen DRA1\*0101 Kette im Vergleich zu 83 Aminosäuren der  $\alpha$ 1-Domäne von DR $\alpha$ 1/DQ $\alpha$ 2. Die restlichen Peptidabschnitte des Peptidkonstruktes werden durch die Aminosäureabfolge des DQ-Allels DQA1\*0501 charakterisiert. Die Fusion zwischen DR und DQ wurde dabei nicht domänenabhängig gestaltet, so dass dieses neue chimäre Fusionskonstrukt um zehn AS länger ist als DR $\alpha$ 1/DQ $\alpha$ 2. Diese zusätzlichen AS sind entsprechend des Sequenzbereiches 84 - 93 der DQ $\alpha$ -Kette gestaltet worden (s. Abb. 4.13).

Für die Synthese der fünf chimären DQ/DR-Moleküle wurde das Verfahren der Overlap-Extension-PCR angewendet. Als Matrize für die PCR wurde Plasmid-DNS der Allele DRA1\*0101, DRB1\*0101, DQA1\*0501 und DQB1\*0302 verwendet. Die Fusionsprimer wurden so konzipiert, dass sie jeweils einen komplementären Abschnitt zu dem

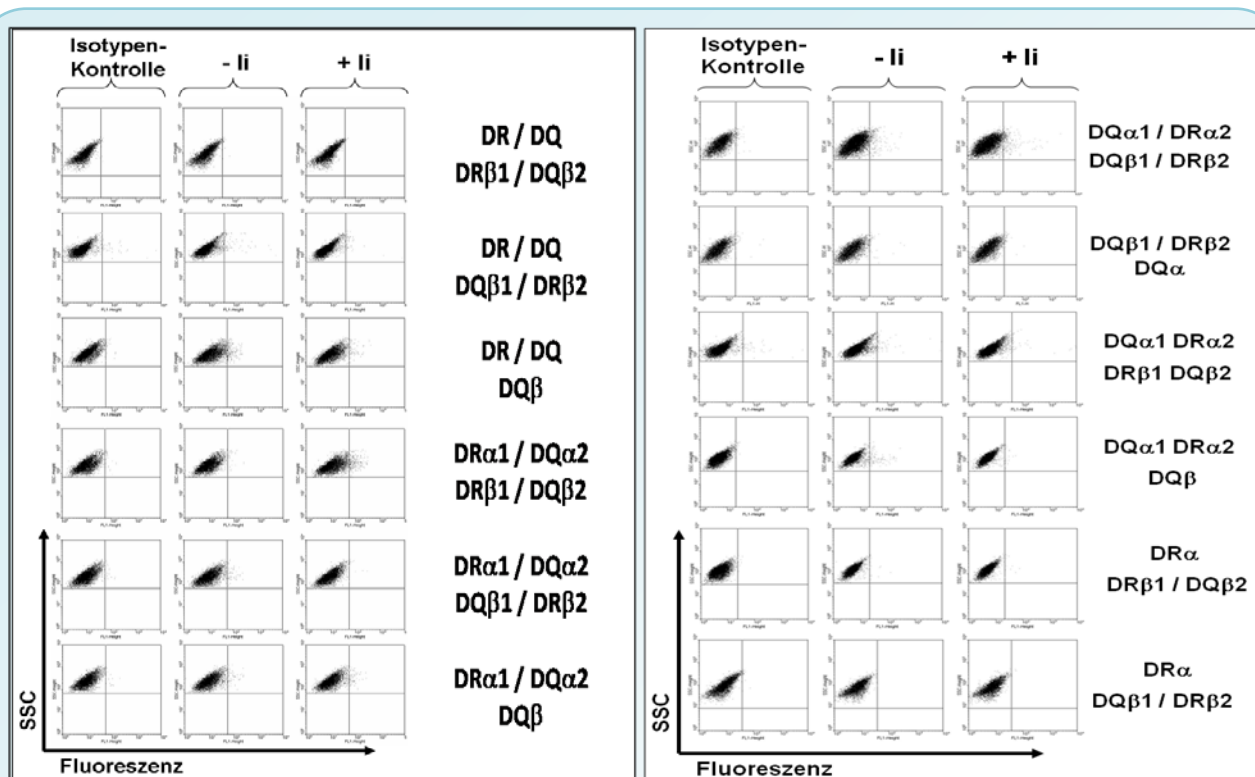
jeweiligen DQ- bzw. DR-Element aufweisen und die einzelnen PCR-Produkte zu einem Fusionsprodukt verbinden konnten. Die Klonierung erfolgte mittels des pcDNS3.1-Expressionsvektors der Firma Invitrogen. Die Transformation wurde mittels TOP10-Bakterien (Invitrogen) durchgeführt. Zu Kontrollzwecken wurden die Produkte der Einzelschritte durch den spezifischen Einsatz von Restriktionsendonukleasen geprüft. Zusätzlich erfolgte eine Kontrolle der möglichen Expression in COS-7-Zellen nach transienter Transfektion. Abschließend wurde die DNS durch die Firma GENterprise (Mainz) sequenziert. Die Ergebnisse zeigen eine 100%ige Übereinstimmung der Plasmid-DNS mit der Versuchsplanung (genaue Sequenzdaten in Tabelle 6.3).



#### 4.4.4 Überprüfung der chimären DQ/DR-Rezeptoren

Um Erkenntnisse hinsichtlich der einzelnen Domänen der Isotypen DQ und DR zu erlangen erfolgte die Prüfung auf Zusammenbau der Einzelketten im ER mit anschließendem Transport in Richtung endosomales Kompartiment. Dabei wurden die chimären Alpha- und Beta-Ketten untereinander getestet, aber auch die Kombination zwischen Wildtyp-Subeinheit und chimären Molekül wurde überprüft. Um eine Aussage darüber fällen zu können, ob diese Fusionskonstrukte eine Peptidpräsentation an der Zelloberfläche gewährleisten können, wurde zunächst die Oberflächenexpression in der Durchflusszytometrie untersucht.

Die transiente Transfektion einer Alpha-Kette und einer Beta-Kette erfolgte erneut in der IMR90S-Zelllinie. Dabei wurden alle Möglichkeiten einer Allelkombination aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der chimären Proteine geprüft. Darüber hinaus wurden die chimären Alpha-Ketten kombiniert mit einer HLA-II-Beta-Subeinheit des Isotypen DR (DRB1\*0101) oder DQ (DQB1\*0302) transfiziert. Auch die chimären Beta-Ketten wurden nach Expression der monomorphen DR $\alpha$ -Kette oder einer DQ $\alpha$ -Kette (DQA1\*0501) geprüft. Aufgrund der Ergebnisse in Kapitel 4.2.4 zeigten sich auch Unterschiede je nach Expression der Ii. Somit wurde jede Allelkombination in An- und Abwesenheit der Ii auf Oberflächenexpression getestet. Zur Sicherstellung der erfolgreichen Transfektion wurden die Einzelketten nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE und Übertragung auf die Nitrozellulosemembran durch spezifische Primärantikörper markiert und detektiert (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.14: Oberflächenexpression von nicht-funktionellen chimären DQ/DR-Peptidrezeptoren**

Die Lungenfibroblasten IMR90S wurden transient mit den chimären Fusionskonstrukten aus HLA-DQ- und DR-Molekülen transfiziert. Die Fusionskonstrukte aus DQ- und DR-Ketten wurden in unterschiedlichen Ansätzen in Ab- und Anwesenheit der Ii auf Funktionalität getestet. Dabei wurden Ansätze generiert, in denen chimäre  $\alpha$ - Ketten mit chimären  $\beta$ - Ketten bzw. ein Fusionsmolekül mit einer Wildtyp-Kette (DR $\alpha$ , DQA1\*00501, DQB1\*0302, DRB1\*0101) kombiniert exprimiert wurden. Die Analyse der transfizierten Zellen auf Oberflächenexpression erfolgte im Durchflusszytometer FACScan. Die Detektion gelang über die spezifische Bindung des LG-II-Antikörpers an die  $\beta$ -Ketten der Heterodimere auf der Zelloberfläche. Jeweils drei Dot Blots zeigen die Analyse für eine Allelkombination: zunächst die Isotypenkontrolle (Mar18.5), dann das HLA-Molekül in Ab- und schließlich in Anwesenheit von der Invarianten Kette (Ii). Zellen mit oberflächenexprimierten Molekülen würden anhand einer erhöhten Fluoreszenz im oberen rechten Quadranten dargestellt sein. Alle hier gezeigten Kombinationen zeigen jedoch keine Oberflächenexpression.

Die transportierten Heterodimere an der Zelloberfläche wurden durch Behandlung mit dem Antikörper LG-II-612.14 spezifisch markiert. Durch den Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper konnte die Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff erreicht

werden. Die Detektion der oberflächenexprimierten Rezeptoren erfolgte im Durchflusszytometer. Der Totzellenanteil wurde durch die Färbung mit 7-AAD ermittelt und konnte bei der späteren Analyse ausgeschlossen werden. Anhand der Isotypenkontrolle (Inkubation mit dem Antikörper Mar18.5) wurde die Zellpopulation ermittelt, die als Negativkontrolle gilt. Die Abgrenzung dieser Zellen erfolgte anhand der Festsetzung eines Quadranten. Zellen mit einem positiven Signal wandern aufgrund der erhöhten Fluoreszenz in der Dot Blot-Darstellung nach rechts. Somit sind die Zellen im oberen rechten Quadranten mit einer Oberflächenexpression der HLA-Heterodimere assoziiert. In Abbildung 4.14 und 4.15 ist zeilenweise die jeweilig getestete Allelkombination rechtsseitig zu sehen. Daneben finden sich die Ergebnisse, dargestellt in Dot Blots, sowohl für die Isotypenkontrolle, als auch in Abwesenheit der Ii und nach Ii-Expression. Die Prozentzahl in den jeweiligen Dot Blots gibt die Anzahl positiver Zellen im oberen rechten Quadranten im Bezug zur Gesamtpopulation an.

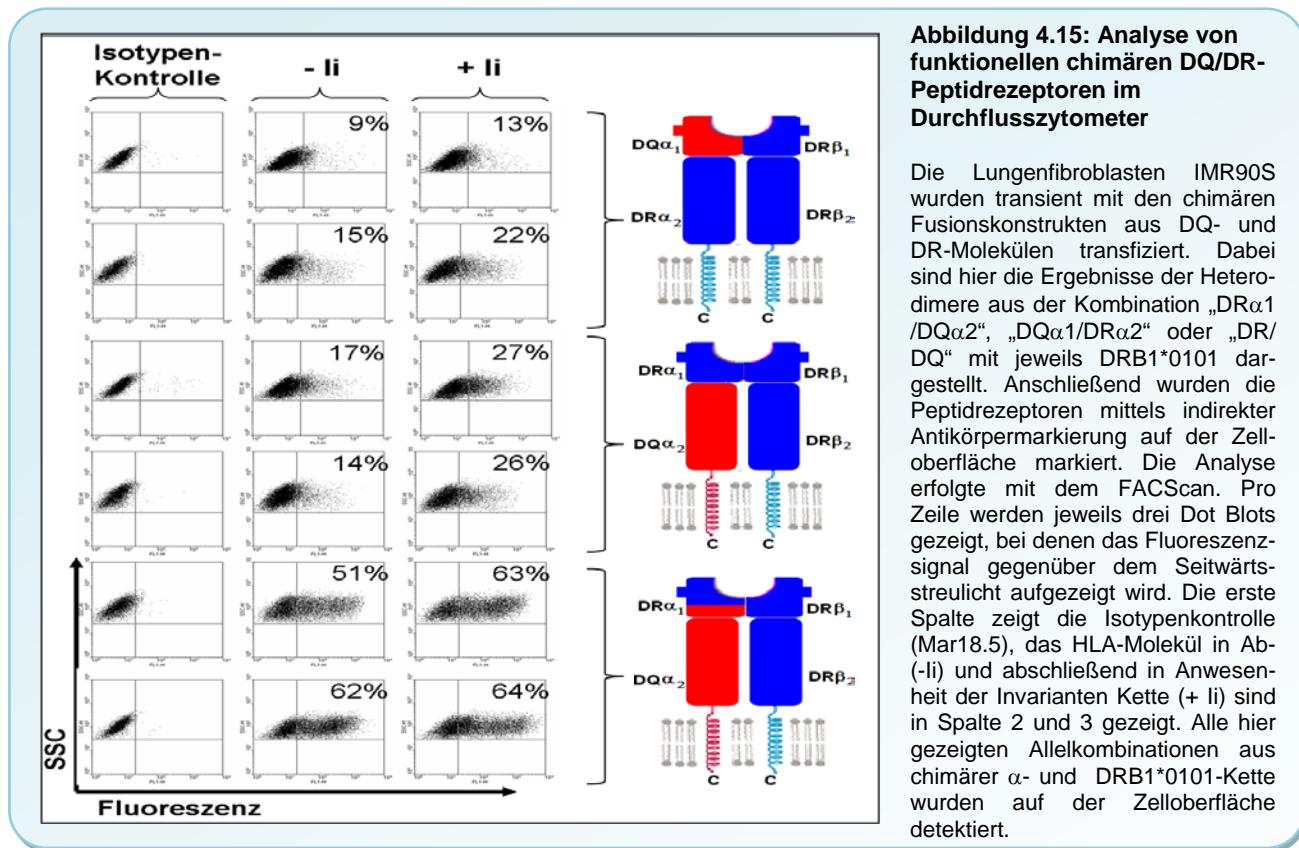
Für 12 der 15 getesteten Allelkombinationen wurde das Resultat erzielt, dass, unabhängig der Anwesenheit der Ii, keine Oberflächenexpression zu erkennen war. In Abbildung 4.14 sind die zugehörigen Dot Blots dargestellt. Sowohl in An- (+ Ii) als auch in Abwesenheit (- Ii) der Invarianten Kette zeigte sich, dass weniger als 1% der Zellen im oberen rechten Quadranten positioniert sind. Eine Abhängigkeit von der Ii kann somit ausgeschlossen werden. Die hier gezeigten Allelkombinationen werden nicht zur Zelloberfläche transportiert und können somit die Funktion der Antigenpräsentation nicht wahrnehmen. Aufgrund der veränderten Struktur der chimären Moleküle ist es wahrscheinlich, dass die einzelnen Subeinheiten nicht zu funktionellen Dimeren im ER zusammengebaut werden und somit das ER nicht verlassen können.

Die Untersuchung der ausstehenden drei Kombinationen ist in Abbildung 4.15 dargestellt. Dabei handelt es sich um die Allelkombination einer chimären Alpha-Kette ( $DQ\alpha 1/DR\alpha 2$ ,  $DR\alpha 1/DQ\alpha 2$  und  $DR/DQ$ ) in Kombination mit der Wildtyp DR-Untereinheit  $DRB1*0101$ . Für alle drei Kombinationen zeigt sich im Vergleich zur Isotypenkontrolle, dass im oberen rechten Quadranten des jeweiligen Dot Blots Zellen detektiert werden konnten. Nach Expression der Ii fällt auf, dass bei allen drei Allelkombinationen eine sehr deutliche Oberflächenexpression nachweisbar ist. Bei dem Vergleich dieser Werte mit den Ergebnissen der Abwesenheit der Ii, zeigt sich der stabilisierende Effekt des Chaperons. Die Anwesenheit der Ii erhöht dabei in allen drei Fällen die Oberflächenexpression der Klasse-II-Moleküle.

Die Kombination aus  $DQ\alpha 1/DR\alpha 2$  und der  $DR\beta$ -Kette zeigt, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit der Ii, die geringste Anzahl an funktionellen Peptidrezeptoren, die auf die Zelloberfläche transportiert werden. Eine Expression der Ii erhöht den Transport zur Zelloberfläche um den Faktor 1,4. Diese relativ geringe Abhängigkeit von der Ii erinnert an die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der HLA-DR-Peptidrezeptoren. Eine weitere Allelkombination, deren Heterodimere auf der Zelloberfläche detektiert wurden, ergibt sich aus  $DR\alpha 1/DQ\alpha 2$  und  $DRB1*0101$ . Für dieses Heterodimer ist die Oberflächenexpression leicht erhöht im Vergleich zu der vorherigen Allelkombination. Auch die Abhängigkeit von der Ii steigt leicht an und wird durch den



Faktor 1,8 beschrieben. Eine Abhängigkeit in diesem Ausmaß erinnert an die erzielten Ergebnisse reiner Wildtyp-DQ-Heterodimere.

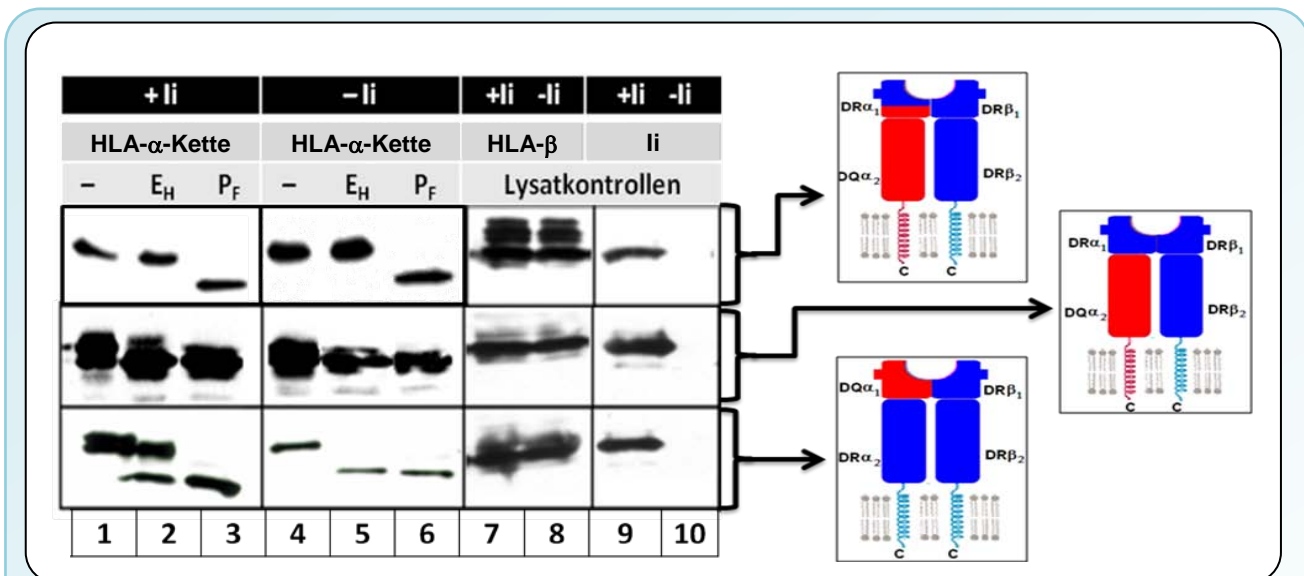


Die besondere Stellung der Allelkombination aus dem chimären Konstrukt DR/DQ und DRB1\*0101 zeigt sich bei Betrachtung der Ergebnisse der beiden letzten Zeilen in Abb. 4.15. Dabei werden außergewöhnlich hohe Werte der Oberflächenexpression ermittelt. In Anwesenheit der li übersteigt die Oberflächenexpression eine durchschnittliche HLA-Klasse-II-Wildtyp-Allelkombination um das Zwei- bis Dreifache. Diese außergewöhnliche Stabilität ist auch in Abwesenheit der li zu beobachten, so dass für diesen Heterodimerrezeptor erneut eine geringe Abhängigkeit von der li gezeigt werden kann. Nach li-Expression kann der Transport zur Oberfläche maximal um den Faktor 1,2 erhöht werden. Für diesen nur sehr geringen Einfluss des Chaperons ist wohl die enorme Stabilität des eigentlichen Heterodimers verantwortlich.

Anhand der Analyse der Kohlenhydratmodifikationen sollte geklärt werden, inwiefern ein DQ- oder DR-spezifisches Glykosylierungsmuster der drei oberflächenexprimierten Allelkombinationen aus chimärem Fusionskonstrukt und DR $\beta$ -Kette zu erkennen ist. Eine Reifung der Kohlenhydrate deutet auf den intrazellulären Transport durch den Golgi Komplex hin, gibt aber zudem einen Hinweis auf die richtige Faltung des HLA-II-Rezeptors.

Die transfizierten IMR90S-Zellen wurden mit NP-40 lysiert. Das Zellysate diente als Basis der Untersuchung der Glykosylierungsformen der  $\alpha$ -Untereinheiten. Das Lysat wurde

teilweise mit EndoH bzw. PNGaseF behandelt, bevor die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wurden. Die Ergebnisse aus dem EndoH-Verdau werden in Abbildung 4.16 dargestellt und wie üblich mit einer unbehandelten Probe und einer PNGaseF-behandelten Probe verglichen. Die erfolgreiche Expression aller Ketten wurde anhand spezifischer Antikörper in den Spuren 7-10 belegt. Die Detektion der DR $\beta$ -Subeinheiten erfolgte über den Antikörper LG-II-612.14. Die  $\alpha$ -Ketten wurden anhand des Anti-V5-Antikörpers (DQ $\alpha$ 1/DR $\alpha$ 2) bzw. Anti-12B8-Antikörpers (DR $\alpha$ /DQ $\alpha$ ; DR $\alpha$ 1/DQ $\alpha$ 2) spezifisch analysiert. Die Spuren 1-3 zeigen die Ergebnisse nach Expression der li, hingegen enthalten die Spuren 4-6 die Resultate der Allelkombinationen in Abwesenheit der li.



**Abbildung 4.16: Modifikation der chimären DQ/DR-Moleküle im Golgi**

IMR90S-Zellen wurden mit den chimären  $\alpha$ -Ketten „DR $\alpha$ 1/DQ $\alpha$ 2“, „DQ $\alpha$ 1/DR $\alpha$ 2“ und „DR/DQ“ in Kombination mit DRB1\*0101 transient transfiziert. Nach der Lyse wurden die Proteine mit EndoH / PNGaseF behandelt und über die SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden die Alpha-Ketten visualisiert. Spur 1 und 4 zeigt die unbehandelten  $\alpha$ -Ketten; Spur 2 und 5 die EndoH-behandelten Proben und Spur 3 und 6 die PNGaseF-behandelten Proteine. Die Lysatkontrollen der der Beta-Ketten wurden mit dem LG-II-Antikörper identifiziert und sind in den Spuren 7 und 8 abgebildet. Die Anwesenheit der li wurde in Spur 9 und 10 mittels des Antikörpers Bu43 überprüft.

In Zeile 2 und 3 der Abbildung 4.16 sind die Ergebnisse für die beiden chimären Ketten DQ $\alpha$ 1/DR $\alpha$ 2 und DR $\alpha$ 1/DQ $\alpha$ 2 in Kombination mit DRB1\*0101 aufgezeigt. Die Alpha-Kette wurde dabei in Spur 1 mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa als Proteinbande vorgefunden. Im Vergleich dazu liegt die PNGaseF-behandelte Probe in Spur 3 mit einem ungefähren Molekulargewicht von ca. 30 kDa deutlich darunter. Spur 2 enthält erneut zwei Proteinbanden. Die untere liegt neben der Proteinbande der PNGaseF-behandelten Probe und ist somit EndoH-sensitiv. Diese Bande kann jedoch aufgrund eines Alpha-Kettenüberschusses vernachlässigt werden. Die schwerere Proteinbande liegt zwischen den Proteinbanden in Spur 1 und 3 und kann als partiell EndoH-resistent eingestuft werden. Nach der Expression der Invarianten Kette werden folglich Proteine mit modifizierten Kohlenhydraten gefunden. Beide Heterodimere verlassen somit das ER und werden während des Transportes durch den Golgi Apparat modifiziert, bevor sie

zur Zelloberfläche transportiert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide chimäre Fusionskonstrukte in der Lage sind, Antigene aufzunehmen und an der Zelloberfläche zu präsentieren.

In Abwesenheit der Ii werden jedoch keine resistenten Proteinbanden in Spur 5 der Zeile 2 und 3 vorgefunden. Die detektierte Proteinbande der Alpha-Kette liegt N-deglykosyliert vor. Ähnlich der Glykosylierungsform von HLA-II-DQ-Wildtyp erfahren diese Heterodimere also keine N-Glykanmodifizierung, obwohl sie eine Oberflächenexpression aufweisen. Dies zeigt, dass der Isotyp der  $\beta$ -Kette des Klasse-II-Moleküls nicht ausschlaggebend ist, ob in Abwesenheit der Ii die EndoH-Resistenz auftritt, da ansonsten eine DR $\beta$ -Kette immer zu einer Resistenz des Heterodimers gegenüber EndoH hätte führen sollen. Somit ist es wahrscheinlich, dass vor allem die Isotypenzugehörigkeit der  $\alpha$ -Kette über die Kohlenhydratmodifikation ohne Ii entscheidet. Die  $\beta$ -Kette und ihre jeweilige Isotypenzugehörigkeit sind dafür verantwortlich, ob ein chimäres Molekül überhaupt transportkompetent wird, da eine DQ $\beta$ -Kette die Peptidrezeptoren nicht entscheidend stabilisieren konnte, um das Verlassen des Endoplasmatischen Retikulums zu erreichen. Die DR $\beta$ -Kette hingegen erreicht genau diese Stabilität des Heterodimers.


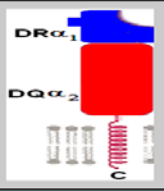
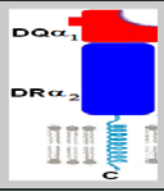


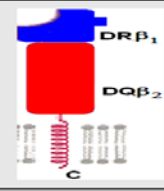


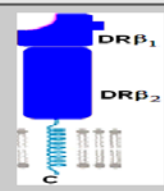
In Zeile 1 der Abbildung 4.16 wurde das Ergebnis der EndoH-Behandlung für die Allelkombination DR/DQ mit DRB1\*0101 dargestellt. Dabei zeigt sich sowohl in Spur 2 (nach Ii-Expression) als auch in Spur 5 (Ii-Abwesenheit), dass beide EndoH-behandelten Proben weder EndoH-sensitiv sind, noch eine partielle Resistenz aufzeigen. Beide Proteinbanden befinden sich auf der Höhe der unbehandelten Probe. Es liegt somit eine totale Resistenz gegenüber EndoH vor. In allen vorhergehenden Ergebnissen wurde lediglich eine partielle Resistenz beschrieben, bei der immer eines von zwei vorhandenen N-Glykanen durch die EndoH-Behandlung entfernt werden konnte. In diesem Fall konnte EndoH keinen der beiden Kohlenhydratreste der  $\alpha$ -Kette entfernen, was auf die besondere Konformation des Moleküls hinweist (Schaiff et al., 1991). Diese Besonderheit hinsichtlich der N-Glykanform zeigt erneut die besondere Stellung dieses chimären Fusionskonstrukts, dass nur in Kombination mit einer DR $\beta$ -Kette und nicht mit einer DQ-Subeinheit zur Zelloberfläche transportiert wurde. Aufgrund der veränderten Konformation ist in diesem Fall zu hinterfragen, inwiefern eine Antigenbindung und somit Präsentation des antigenen Peptids möglich ist.

In Tabelle 4.6 ist das Gesamtergebnis in einer tabellarischen Übersicht dargestellt. Allelkombinationen, deren Heterodimere eine Oberflächenexpression zeigten, wurden mit einem „+“ gekennzeichnet. Diese transportkompetenten Heterodimere konnten in Anwesenheit der Ii als EndoH-resistent und somit N-Glykan-modifiziert identifiziert werden. Die mit einem „-“ gekennzeichneten Allelkombinationen wurden nicht an der Zelloberfläche der IMR90S-Zellen detektiert. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass diese Heterodimere strukturell nicht zusammenpassen und ein Zusammenbau zu einem funktionellen Heterodimer nicht möglich ist. Ein Verbleib dieser HLA-II-Untereinheiten im ER ist aufgrund der Analyseresultate für HLA-II-DQ wahrscheinlich.

Es fällt auf, dass keines der mutierten  $\beta$ -Fusionskonstrukte Teil eines Heterodimers ist, das eine komplexe Glykanform aufweist oder zur Zelloberfläche transportiert wird. Hingegen konnten drei  $\alpha$ -Ketten der Fusionskonstrukte als funktionell hinsichtlich ihres Transports entlang der Antigenprozessierungsrouten getestet werden. Dabei stellte sich heraus, dass jedoch nur in Kombination mit einer DR $\beta$ -Kette diese Funktionalität gewährleistet wird. Dieses Ergebnis zeigt die Abhängigkeit von dem jeweiligen Isotypen, da eine DQ $\beta$ -Kette nicht zu einer Oberflächenexpression dieser chimären Alpha-Ketten führte. Dies kann als Hinweis dafür gesehen werden, dass die unterschiedlichen Isotypen sich strukturell, aber vor allem funktionell entscheidend voneinander abgrenzen.

**Tabelle 4.6: Funktioneller Zusammenbau von chimären DR/DQ-Ketten**

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wird hier eine Übersicht über den funktionellen Zusammenbau der DQ/DR Fusionskonstrukte gegeben. Die Kennzeichnung „+“ bedeutet, dass die jeweilige Kombination Endo<sub>H</sub> resistent ist, aber auch in der Durchflusszytometrie auf der Zelloberfläche detektiert wurde. Die Kennzeichnung „-“ zeigt die Endo<sub>H</sub>- Sensitivität und den negativen Befund auf der Zelloberfläche an.

					
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-		
	*	+	+		

\* Nur die Allelkombination DR/DQ-Alpha mit DR-Beta zeigte eine totale EndoH-Resistenz. Es ist somit von einer Konformationsänderung im Vergleich mit anderen transportkompetenten Allelkombinationen auszugehen.

## 5. Diskussion

### 5.1 Bedeutung des Auftretens nicht funktioneller DQ-Peptidrezeptoren

#### 5.1.1 Einschränkung der Kombinationsvielfalt von DQ-Allelkombinationen

MHC-II-Moleküle präsentieren Peptidantigene auf der Zelloberfläche von professionellen antigenpräsentierenden Zellen, was im Zuge einer Immunantwort zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen führt. Dabei ist die Bindung von Peptidantigenen abhängig von bestimmten Ankerresten, die für jedes MHC-II-Molekül spezifisch sind (Böhm et al., 2005). Beim Menschen existieren drei Isotypen der Klasse-II-Moleküle (HLA-DR, -DP und DQ), die wiederum aus polymorphen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut sind (siehe Einleitung). Um ein möglichst großes Repertoire an Peptiden zu binden und auf der Zelloberfläche präsentieren zu können, gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Allelen der HLA-Genorte (Böhm et al., 2005). Im Gegensatz zum Isotypen DR, von dessen  $\alpha$ -Kette bisher nur ein Allel bekannt ist, sind sowohl die DQ $\alpha$ - als auch die DQ $\beta$ -Kette, ähnlich den Genorten DP $\alpha$  und DP $\beta$ , polymorph (Giles et al., 1985). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind 26 unterschiedliche DQ $\alpha$ - und 89 DQ $\beta$ -Proteinketten des humanen Genoms bekannt ([www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html); Stand 15.10.2010). Angesichts der Tatsache, dass die Kombination aus je einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette zu einem Heterodimer führt, kann von einer enormen Vielfalt an DQ-Heterodimeren ausgegangen werden. In mehreren Studien konnte belegt werden, dass DQ $\alpha$ - und DQ $\beta$ -Subeinheiten, unabhängig von einer cis-Stellung (sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Kette des Heterodimers stammen vom gleichen Chromosom), zu einem transportkompetenten Heterodimer assoziieren (Giles et al., 1995; Nepom et al., 1987; Kwok et al., 1988). Nur Klasse-II-Rezeptoren, die zur Zelloberfläche transportiert werden, können mögliche pathogene Peptide präsentieren und so eine Immunantwort einleiten. Hinsichtlich dieser Studien würde sich rein rechnerisch betrachtet eine Anzahl von über 2.314 (26 x 89) unterschiedlichen allotypischen Heterodimerrezeptoren ergeben.

Dieser Theorie widersprechend konnte erstmals im murinen System eine „Paarungsanomalie“ zwischen A $\alpha$ - und A $\beta$ -Untereinheiten (IA ist das Mausortholog zum humanen HLA-DQ) gezeigt werden. Dabei wies Braunstein et al. (1987) nach, dass A $\alpha$ <sup>k</sup> und A $\beta$ <sup>d</sup> nicht zu einem Heterodimer zusammengebaut werden können. Da jedoch die Subeinheiten A $\alpha$ <sup>k</sup> und A $\beta$ <sup>k</sup> als stabile Oberflächendimere beschrieben wurden und zudem A $\alpha$ <sup>d</sup> und A $\beta$ <sup>k</sup> mit einer geringeren Stabilität an der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnten, generierte Braunstein et al. ein Modell für den erfolgreichen Zusammenbau von Klasse-II-Subeinheiten. Er erklärt in diesem Modell, dass polymorphe Reste im ersten Exon von A $\alpha$  sowie von A $\beta$  besonders wichtig für den erfolgreichen Zusammenbau eines MHC-Rezeptors sind. Ähnliche Daten konnten auch in den Analysen von Sant et al. (1987) gezeigt werden, die sich mit den Kombinationen

aus den Isotypen  $A\beta$  und  $E\alpha$  befassten. Nur  $A_{\beta}^d$ , jedoch nicht  $A_{\beta}^b$  und  $A_{\beta}^k$ , zeigten eine stabile Koexpression an der Zelloberfläche. Die 5 – 7 polymorphen AS-Reste der  $A\beta$ -Kette innerhalb der ersten 50 aminoterminalen Reste sind verantwortlich für die Zelloberflächenexpression in Kombination mit  $E\alpha$  (Sant et al., 1987).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Erkenntnisse von Sant und Braunstein auch auf das humane HLA-DQ-System übertragbar sind. Ausgehend von zwölf unterschiedlichen Allelkombinationen, die hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression und der Kohlenhydratreifung untersucht wurden, zeigten vier der untersuchten Allelkombinationen keinen Transport zur Zelloberfläche. Weitere Belege, dass nicht alle DQ-Untereinheiten zu einem transportkompetenten Dimer zusammengebaut werden können, finden sich in Studien von Kwok et al. (1993). In diesen Arbeiten wurden erste Hinweise auf eine Paarungsanomalität der Alpha- und Beta-Untereinheiten von HLA-DQ nachgewiesen (Kwok et al., 1989). Mittels retroviraler Vektoren wurden DQ2 $\beta$  (DQB1\*0201) und DQ3.2 $\beta$  (DQB1\*0302) in mehrere Zelllinien eingebracht, die homozygot verschiedene DQ $\alpha$ -Allele exprimieren. Anhand durchflusszytometrischer Analysen wurden diese  $\beta$ -Ketten nicht mit DQ $\alpha$ 1-Ketten (\*0101, \*0102 und \*0103) auf der Zelloberfläche nachgewiesen (Kwok et al., 1989). In späteren Arbeiten konnten drei weitere DQ $\alpha$ / $\beta$ -Allelkombinationen (0301/0501; 0401/0501 und 0501/0501) identifiziert werden, die keine Oberflächenexpression zeigen (Kwok et al., 1993).

Ein Vergleich der Ergebnisse von Kwok et al. und den Resultaten der vorliegenden Arbeit wird in Tab. 5.1 zusammenfassend dargestellt. In beiden Fällen wurde der Transport der Heterodimere anhand der Oberflächenexpression in der Durchflusszytometrie untersucht. Die beschriebenen Ergebnisse von Kwok et al. sind türkis und die aktuellen Ergebnisse sind in der Tabelle lila hinterlegt. Transportkompetente Heterodimere wurden mit einem „+“ gekennzeichnet. Ein „-“ steht für transportinkompetente Heterodimere. Die vom jeweiligen Autor nicht untersuchten Allelkombinationen aus DQ $\alpha$  und DQ $\beta$  werden mit einem „ $\emptyset$ “ markiert. Hinsichtlich der Analyse funktioneller und nicht-funktioneller Heterodimere zeigt der Datenabgleich in Tabelle 5.1 sowohl Übereinstimmungen als auch Abweichungen zwischen den Autoren. Die Ergebnisse für DQ $\alpha$ / $\beta$  0501/0201, 0501/0302 und 0301/0302 als funktionelle Heterodimerrezeptoren, sowie 0103/0201 als nicht-transportkompetentes Heterodimer, werden durch beide Arbeiten bestätigt. Die Ergebnisse für die Transportkompetenz von DQA1/DQB1 0301/0201 und 0103/0302 bei Kwok et al. (1993) weichen jedoch zunächst von den Ergebnissen aus Abschnitt 4.3.1 ab.

Die Erkenntnisse für die Allelkombination DQA1\*0103/DQB1\*0302 beschreibt Kwok in seiner Publikation aus dem Jahr 1993. Laut seiner Aussage können die Genprodukte von DQB1\*0302 keine stabilen, oberflächenexprimierten Heterodimere mit den Produkten der Allele DQA1\*0101, \*0102 oder \*0103 ausbilden. Er verweist dabei auf die Untersuchungen aus dem Jahre 1989 (Kwok et al., 1993). Die Publikation von 1989 beschreibt die Untersuchungen anhand der B-lymphoblastoiden Zelllinien HOM-2 und KAS-117. Desweiteren beschreibt Kwok, dass die von ihm genutzten Zelllinien für

DQw1 homozygot sind. Er geht somit davon aus, dass DQw1 für die Allele DQA1\*0101, als auch für DQA1\*0102 und DQA1\*0103 kodiert. Nach heutigem Kenntnisstand kodieren die Zelllinien HOM-2 und KAS-117 nicht für alle drei Allele. Sie sind als homozygot für DQA1\*0101 und DQB1\*0501 in der Literatur beschrieben ([www.ebi.ac.uk/imgt/hla/cell\\_query.html](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/cell_query.html); Stand: 20. Oktober 2010). Dies bedeutet, dass Kwok et al., nach Transfektion der genannten Zelllinien mit DQB1\*0302, lediglich eine Aussage über die Oberflächenexpression der Allelkombination DQA1\*0101/DQB1\*0302 hätte treffen können. Über die Kombinationen DQB1\*0302 mit DQA1\*0102 bzw. 0103 ist folglich keine Aussage möglich. Die verallgemeinerte Aussage von Kwok et al. (1993) ist somit der fehlerhaften Annahme geschuldet, dass DQw1 nicht lediglich für das Suballel 0101, sondern auch für 0102 und 0103 kodiert. Die in Tabelle 4.2 (Abschnitt 4.3.1) beschriebenen Ergebnisse machen klar, dass bereits der Austausch des DQ $\beta$ -Allels 0301 mit dem Suballel 0302 ein nicht transportiertes Heterodimer in einen oberflächen-exprimierten Heterodimerrezeptor umwandeln kann. Es liegt daher nahe, dass der Austausch des Suballels DQB1\*0101 durch 0303 bereits zu einem veränderten Analyseergebnis führt.

Bei Betrachtung der Tab. 5.1 bleiben weiterhin gegensätzliche Daten einer Oberflächenexpression für DQA1\*0301/DQB1\*0201 zwischen beiden Arbeiten bestehen. Jedoch zeigt sich auch in diesem Fall, dass die beschriebenen Ergebnisse von Kwok et al. (1993) detailliert betrachtet werden müssen. Im Material- / Methodenteil der Publikation 1993 listet Kwok die cDNS auf, die für die Experimente zur Verfügung stand. Dabei ist lediglich auf DQA1\*0301 verwiesen; auf die cDNS DQB1\*0201 konnte für die damaligen Versuche nicht zurückgegriffen werden. Er konnte die Untersuchungen des Heterodimers somit lediglich durch Transfektion der cDNS 0301 in eine Zelllinie erreichen, die endogen über das Allel DQB1\*0201 verfügt. Kwok beschreibt in diesem Zusammenhang die Zelllinie MAT, die laut der Veröffentlichung von 1993 homozygot für das Allel DQw2 (DQB1\*0201) sein soll. Anhand eines spezifischen Antikörpers für DQw2 (mAb XIII 358) sollte eine Detektion des gesuchten Heterodimers an der Zelloberfläche per Durchflusszytometrie gelingen. Nach aktuellem Wissensstand der Zelltypisierung enthält die Zelllinie MAT jedoch lediglich die DQ $\beta$ -Allele 0302 bzw. 0306 und nicht DQB1\*0201. Die Arbeitsgruppe Kwok konnte somit lediglich die endogene DQ-Kombination der Zelllinie oder DQA1\*0301 in Kombination mit den endogenen DQ $\beta$ -Ketten 0302 oder 0306 nachweisen. Eine Analyse der Allelkombination DQA1\*0301/DQB1\*0201 war nicht möglich. Insofern sind die Ergebnisse von Kwok et al. (1989, 1993) neu zu bewerten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden zusätzlich durch den Nachweis der EndoH-Sensitivität dieser beiden Allelkombinationen in Abschnitt 4.3.1 gestützt, da in beiden Fällen der Transport durch den Golgi nicht nachweisbar war. Darüber hinaus kompetierte DQB1\*0302 die DQ $\beta$ -Kette 0301, um in Kombination mit DQA1\*0103 aus dem ER heraus transportiert zu werden (siehe Abschnitt 4.3.2). Diese Experimente sind ein weiterer Beleg für die Transportfähigkeit und die Oberflächenexpression des Heterodimers DQA1\*0103/DQB1\*0302 und dienen als Bekräftigung für die Resultate aus Abschnitt 4.3.1 und 4.3.2.

**Tabelle 5.1 Ergebnisvergleich für eine Oberflächenexpression verschiedener DQ-Allotypen**

Diese Tabelle gibt eine Übersicht über die Analyseergebnisse der Oberflächenexpression verschiedener HLA-DQ-Allotypen. Lila hinterlegt sind die Ergebnisse aus dieser Arbeit. Türkis hinterlegt werden die Ergebnisse von Kwok et al. aus dem Jahre 1993 dargestellt (Kwok et al., 1989; Kwok et al., 1993). Mit einem „+“ gekennzeichnete Allelkombinationen wurden positiv hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression getestet, mit einem „-“ gekennzeichnete Kombinationen wurden negativ getestet und mit „∅“ dargestellte Heterodimere konnten nicht überprüft werden. Übereinstimmungen zwischen den verschiedenen Arbeiten sind blau markiert, wohingegen eine rote Hervorhebung eine Abweichung bedeutet.

HLAβ-Kette HLAα-Kette	DQB1*0201		DQB1*0301		DQB1*0302		DQB1*0501		DQB1*0602	
	DQA1*0101	∅	-	∅	∅	∅	-	∅	+	∅
DQA1*0103	-	-	-	∅	+	-	∅	+	+	∅
DQA1*0201	∅	+	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅
DQA1*0301	-	+	+	∅	+	+	∅	-	-	∅
DQA1*0401	∅	+	∅	∅	∅	+	∅	-	∅	∅
DQA1*0501	+	+	+	∅	+	+	∅	-	+	∅

Unabhängig von den Unterschieden, bezüglich einzelner DQ-Allelkombinationen, ergibt sich aus den Resultaten der Untersuchungen von Kwok et al., sowie der vorliegenden Arbeit, die wichtige Erkenntnis, dass ein bedeutender Anteil an DQ-Allelkombinationen nicht zu einem funktionsfähigen Peptidrezeptor führt. Kwok und seine Arbeitsgruppe zeigten, dass 5 von 14 Allelkombinationen (entsprechen 36%) nicht zur Zelloberfläche transportiert werden. Übereinstimmend dazu wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass 4 von 12 (entsprechen 33%) DQ-Allotypen mittels Durchflusszytometrie nicht auf der Zelloberfläche detektiert werden konnten. Somit belegen beide Arbeiten, dass es DQ-Untereinheiten gibt, die nicht zu einem transportkompetenten Heterodimer zusammengebaut werden können. Beachtenswert ist dabei, dass dies nicht die Ausnahme ist, sondern mit ungefähr einem Drittel aller DQ-Allelkombinationen ist eine große Menge an Alpha- und Beta-Ketten nicht funktionell kombinierbar. Dies bedeutet eine erhebliche Einschränkung der Kombinationsvielfalt der DQ-Dimere und kann grundsätzlich eine Neubewertung der genetischen Vielfalt der HLA-Klasse-II-Moleküle erforderlich machen, speziell bezugnehmend auf den Isotyp HLA-II-DQ. Es ist somit anzunehmen, dass die theoretisch erwartete Anzahl von unterschiedlichen DQ-Heterodimeren in der Praxis weit unter dem Wert von 2.300 liegt. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit würden ca. 1.500 (2.300 x 2/3) unterschiedliche DQ-Dimere existieren.



### 5.1.2 Modell eines qualitätskontrollierten Zusammenbaus von DQ-Rezeptoren

Ausgehend von der Tatsache, dass es Allelkombinationen innerhalb des Isotypen DQ gibt, die keine Oberflächenexpression zeigen, ergibt sich die Frage nach dem Verbleib dieser DQ-Kombinationen innerhalb der Zelle. Im murinen System konnte erstmals gezeigt werden, dass IA-Allelkombinationen, die nicht zur Zelloberfläche gelangen, auch keine Modifikation der N-Glykoside im Golgi Apparat erfahren (Sant et al., 1991). Die Reifung der Kohlenhydrate findet im medialen Golgi statt, so dass die Arbeitsgruppe Sant et al. bereits damals vermutete, dass diese nicht transportierten Allelkombinationen im premedialen Golgi Komplex oder im ER verbleiben (Sant et al., 1991).

Diese Daten stimmen mit den hier vorliegenden Ergebnissen insofern überein, dass die vier DQ-Allotypen, die keine Oberflächenexpression aufweisen, auch keine Reifung der Kohlenhydrate zeigen. Kwok et al. (1993) kam für die Kombination aus einer DQ3 $\alpha$ -Kette und einer DQ1 $\beta$ -Kette zu einem ähnlichen Schluss. Zwar wurde nicht die Kohlenhydratreifung untersucht, aber die Arbeitsgruppe zeigte, dass diese Allelkombination nicht zur Zelloberfläche transportiert wurde und darüber hinaus auch nicht intrazellulär als Dimer vorliegt. Es wurde vermutet, dass entweder beide DQ-Untereinheiten im ER nicht zu einem Heterodimer zusammengebaut werden können oder dass, nach Aggregation beider Ketten, eine Detektion aufgrund einer inkorrekten Faltung nicht möglich ist (Kwok et al., 1993).

Die Arbeitsgruppe Kwok erwartete, dass neben der Retention im ER eine weitere Möglichkeit des Verbleibs der Dimere in der Zelle denkbar ist. Dabei konnte die Oberflächenexpression von DQ1 $\alpha$ /3 $\beta$  nicht nachgewiesen werden, jedoch wurde die intrazelluläre Aggregation des Heterodimers mit der Ii beschrieben. Aufgrund der Tatsache, dass die Invariante Kette eine Signalsequenz für den Transport zu dem endosomalen Kompartiment enthält, vermutete Kwok den Transport dieses HLA-Ii-Aggregats bis in die Endosomen (Bakke & Dobberstein, 1990). Der Erklärungsversuch von Kwok et al. gelang, als die fehlende Oberflächenexpression durch eine veränderte Konformation begründet wurde. Diese These würde bedeuten, dass ein Rest der Ii in der Peptidbindungsgrube verbleibt, und so die Peptidbindung und den Transport zur Zelloberfläche, verhindert. Anhand von massenspektroskopischen Untersuchungen konnte 2008 durch Wiesner et al. tatsächlich eine CLIP-Sequenz gefunden werden, die außergewöhnliche Stabilität im Zusammenhang mit DQ2 aufzeigte (Wiesner et al., 2008). Jedoch konnte diese veränderte CLIP-Sequenz bisher nur im Zusammenhang mit bestimmten transportkompetenten DQ-Heterodimeren gezeigt werden, so dass dies keine Erklärung für transportinkompetente Allelkombinationen sein kann. Inwiefern diese fehlgefalteten Dimere in den Endosomen verbleiben oder intrazellulär über die Lysosomen abgebaut werden, konnte durch die Ergebnisse der Studien von Kwok et al. nicht gezeigt werden.

Insgesamt müssen drei alternative Thesen bei der Frage, was mit zwei nicht-passenden DQ-Subeinheiten geschieht, berücksichtigt werden. Eine weitere Möglichkeit, wäre die

---

Aggregation der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, die als Heterodimer zwar aus dem ER ausgeschleust werden, aber die Zelloberfläche aufgrund einer mangelhaften Peptidbindung nicht erreichen. Neben der beschriebenen Theorie, dass beide HLA-Klasse-II-Untereinheiten nicht assoziieren können, ist eine kurzfristige Assoziation denkbar, die jedoch nicht zu einer ER-Ausschleusung führt. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass beide Untereinheiten sich erneut lösen, um als  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette eine weitere Allelkombination auf Funktionalität zu prüfen. Diese Variante erscheint, bei Betrachtung der Ergebnisse in Abschnitt 4.3.2, besonders interessant. Die Tatsache, dass die nicht-oberflächen-exprimierte DQ-Allelkombination 0103/0301 nach einer Ko-Immünpräzipitierung intrazellulär in einem Komplex vorgefunden wird, zeigt, dass es zu einem Zusammenbau beider DQ-Untereinheiten kommen muss, auch wenn dieser nur marginal ist. Somit ist für diese nicht-oberflächen-exprimierte Allelkombination gezeigt, dass, entgegen der Ergebnisse von Kwok et al., eine Zusammenlagerung der Untereinheiten des Allotyps DQ3 $\alpha$ /DQ1 $\beta$  im ER durchaus möglich ist.

Die Ergebnisse in Abschnitt 4.3.2 belegen, dass eine DQ $\beta$ -Kette (0302) eine viel stärkere Assoziation mit der DQ $\alpha$ -Kette besitzt, wenn beide kombiniert ein transportkompetentes Heterodimer bilden. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass die passende Beta-Kette und die nicht-passende Beta-Kette bereits im ER um die Bindung an die DQ $\alpha$ -Kette kompetieren. Weitere Analysen ergaben, dass lediglich die passende DQ $\beta$ -Kette im Komplex mit li-DQ $\alpha$  aus dem ER heraus transportiert wird und in die MIIC-Kompartimente gelangt, in denen die Antigenbeladung stattfindet. Im Gegensatz dazu konnte die nicht-passende DQ $\beta$ -Kette 0301 nicht in MIIC-Kompartimenten nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.3.2). Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass nicht-passende DQ $\alpha$ / $\beta$ -Dimere im ER verbleiben. Nach einer kurzfristigen Aggregation dissoziieren die nicht-passenden DQ-Untereinheiten, so dass eine passende  $\beta$ -Kette mit der DQ $\alpha$ -Untereinheit zu einem transportkompetenten Heterodimer zusammengebaut werden kann.

Diese Theorie wird durch frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe Koch bestätigt. Aufgrund vorangegangener Arbeiten innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe konnte nämlich gezeigt werden, dass nicht-funktionelle Peptidrezeptoren der Klasse-II im ER verbleiben und es zu einer Konkurrenz um einen funktionellen Peptidrezeptor kommen kann (Neumann und Koch, 2006). Dabei wurde durch Neumann et al. nachgewiesen, dass eine mutierte  $\beta$ -Kette durch eine Wildtyp-Kette ersetzt werden kann. Diese Ergebnisse führten zu einem nicht-klassischen Modell des MHC-II-Zusammenbaus im ER, bei dem eine Art Qualitätskontrolle des Peptidrezeptors durchgeführt wird. Nach dieser Theorie bindet die  $\alpha$ -Untereinheit an die Invariante Kette. Erst im Anschluss wird eine  $\beta$ -Subeinheit gesucht, die in dieser Konstellation einen funktionellen Rezeptor ergibt. Nicht passende Beta-Ketten werden in diesem Modell solange ausgetauscht bis eine passende Subeinheit gefunden wird.

Die Konkurrenzexperimente dieser Arbeit wurden unter Berücksichtigung der Expression der li durchgeführt (Abschnitt 4.3.2). Demnach ist, gemäß dem Modell von

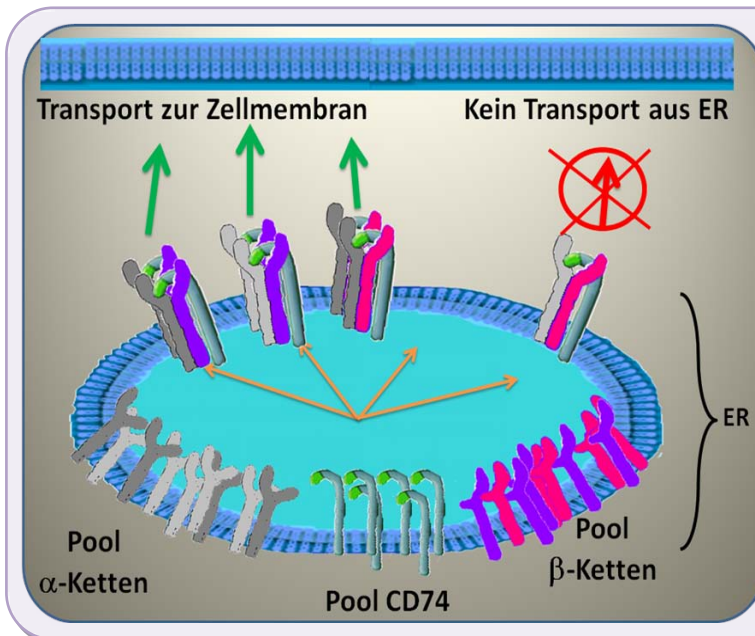
---

Koch et al. (2007), auch für nicht-transportierte DQ-Allelkombinationen denkbar, dass die Ii den Austausch der nicht passenden DQ $\beta$ -Kette gegen eine passende DQ $\beta$ -Untereinheit fördert. Erst diese zwei passenden DQ-Subeinheiten werden im Komplex mit der Ii aus dem ER transportiert.

Ausgehend von den drei unterschiedlichen Theorien des Verbleibs der nicht-passenden DQ-Rezeptoren erscheint der Transport nicht-oberflächenexprimierter Heterodimere in die Endosomen als die unwahrscheinlichste Variante. Dabei wurde weder ein direkter Nachweis dieser Kombinationen in MIIC-Kompartimenten geliefert, noch der Verbleib (z.B. Abbau über Lysosomen) in der Zelle geklärt. Hingegen scheint es je nach Allelkombination des DQ-Isotyps möglich, dass die beiden Untereinheiten aufgrund struktureller Unterschiede entweder gar nicht zu einem Dimer zusammengebaut werden können oder dies nur transient mit anschließender Dissoziation geschieht.

Nun ergibt sich die Frage, inwieweit diese Effekte auch beim Menschen eine Rolle spielen können. Ein Modell, das diese Ergebnisse schematisch zusammenfasst, ist in Abbildung 5.1 aufgezeigt. Ein Individuum besitzt im Normalfall jeweils zwei DQ-Gene für die Alpha- und zwei DQ-Gene für die Beta-Ketten, wobei jeweils eine Alpha- und eine Beta-Kette vom maternalen bzw. paternalen Haplotypen stammen. Durch cis- und trans-Kombination kann es zur Ausbildung von vier allotypischen Heterodimeren kommen. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit und den Arbeiten von Kwok et al. (1993) sind jedoch etwa 1/3 der möglichen DQ $\alpha/\beta$ -Kombinationen als nicht-funktionelle Peptidrezeptoren charakterisiert. Daher besteht, rein rechnerisch betrachtet, die Möglichkeit, dass von den vier möglichen Kombinationen eine oder mehrere DQ $\alpha/\beta$ -Einheiten nicht zusammenpassen und das ER nicht zu Zwecken der Antigenpräsentation verlassen. Eine Allelkombination könnte dabei als nicht-transportkompetent charakterisiert werden, wenn entweder einer der beiden Haplotypen diese Kombination enthält, oder eine der beiden trans-Kombinationen nicht zueinander passt. Zwei DQ-Heterodimere, die das ER nicht verlassen, entstehen, wenn beide cis-Kombinationen nicht zusammen passen, jedoch beide möglichen trans-Kombinationen einen funktionellen Rezeptor ergeben. Das gleiche Ergebnis würde sich einstellen, wenn die cis-Kombinationen funktionell sind, aber die trans-Kombinationen nicht passende Dimere bilden. Wenn beide Haplotypen, sowie eine der trans-Kombinationen, nicht-funktionelle DQ-Heterodimere ergeben, so bleibt nur eine funktionelle Kombination übrig. Die Möglichkeit, dass alle vier Peptidrezeptoren nicht aus dem ER freigesetzt werden, entsteht bei fehlender Assoziation der beiden cis-, sowie der beiden trans-Allelkombinationen. Wahrscheinlicher wäre jedoch, dass ein Individuum homozygot ist. Dann würde bereits eine nicht-transportierte cis-Kombination zum Ausfall aller funktionellen DQ-Moleküle führen.

Sofern mindestens eine der Allelkombinationen transportkompetent ist, kann angenommen werden, dass es kurzfristig zum Zusammenbau der nicht-passenden DQ $\alpha/\beta$ -Ketten kommt, die jedoch anschließend wieder durch die Hilfe der Ii entfernt und durch eine passende DQ-Untereinheit ersetzt werden. Die übrigen Kombinationsmöglichkeiten können als transportkompetente Rezeptoren das ER verlassen und die Antigenpräsentation gewährleisten.



**Abbildung 5.1: Modell des Zusammenbaus von DQ-Untereinheiten zu einem Heterodimer im ER**

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit sind Allel-Kombinationen von HLA-DQ-Ketten bekannt, die nicht aus dem ER transportiert werden.

Es sind 3 Szenarien vorstellbar:

-Bei homozygoter Konstellation wäre es möglich, dass ein nicht funktioneller Peptidrezeptor gebildet wird, der nicht aus dem ER transportiert wird. Für den totalen DQ-Ausfall in einem Individuum muss daher lediglich eine Allelkombination als nicht-passend charakterisiert sein.

-Bei heterozygotem Genotyp ist es möglich, dass nur bestimmte  $\alpha/\beta$ -Dimere nicht-funktionell sind und im ER verbleiben. Die übrigen Kombinationen gelangen aus dem ER und gewährleisten die Antigenpräsentation

-Das heterozygote Modell lässt jedoch auch die Möglichkeit offen, dass alle vier Kombinationsmöglichkeiten keine funktionellen Peptidrezeptoren bilden können.

### 5.1.3 Klinische Relevanz und Selektion bestimmter DQ-Allelkombinationen

Die hohe Diversität im HLA-Bereich des modernen Menschen kann nur durch einen enormen Selektionsdruck erklärt werden, der für die enorme Vielfalt und Diversität verantwortlich ist. Dabei gibt es Hinweise, dass der Polymorphismus der MHC-Allele durch positive Selektion entsteht (Yeager & Hughes, 1999). Die Theorie des sogenannten „Heterozygotenvorteils“ sieht den Vorzug von heterozygoten HLA-Haplotypen in einem breiteren Spektrum der Antigenbindungsspezifität. Somit können mehr Antigene gebunden und präsentiert werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Immunantwort ist höher und somit steigt die Chance infektiöse Erkrankungen zu überleben (Ohta et al., 1999). Es ergibt sich somit die Frage, inwiefern eine Einschränkung der Vielfalt der HLA-DQ-Rezeptoren eine klinische Relevanz besitzt.

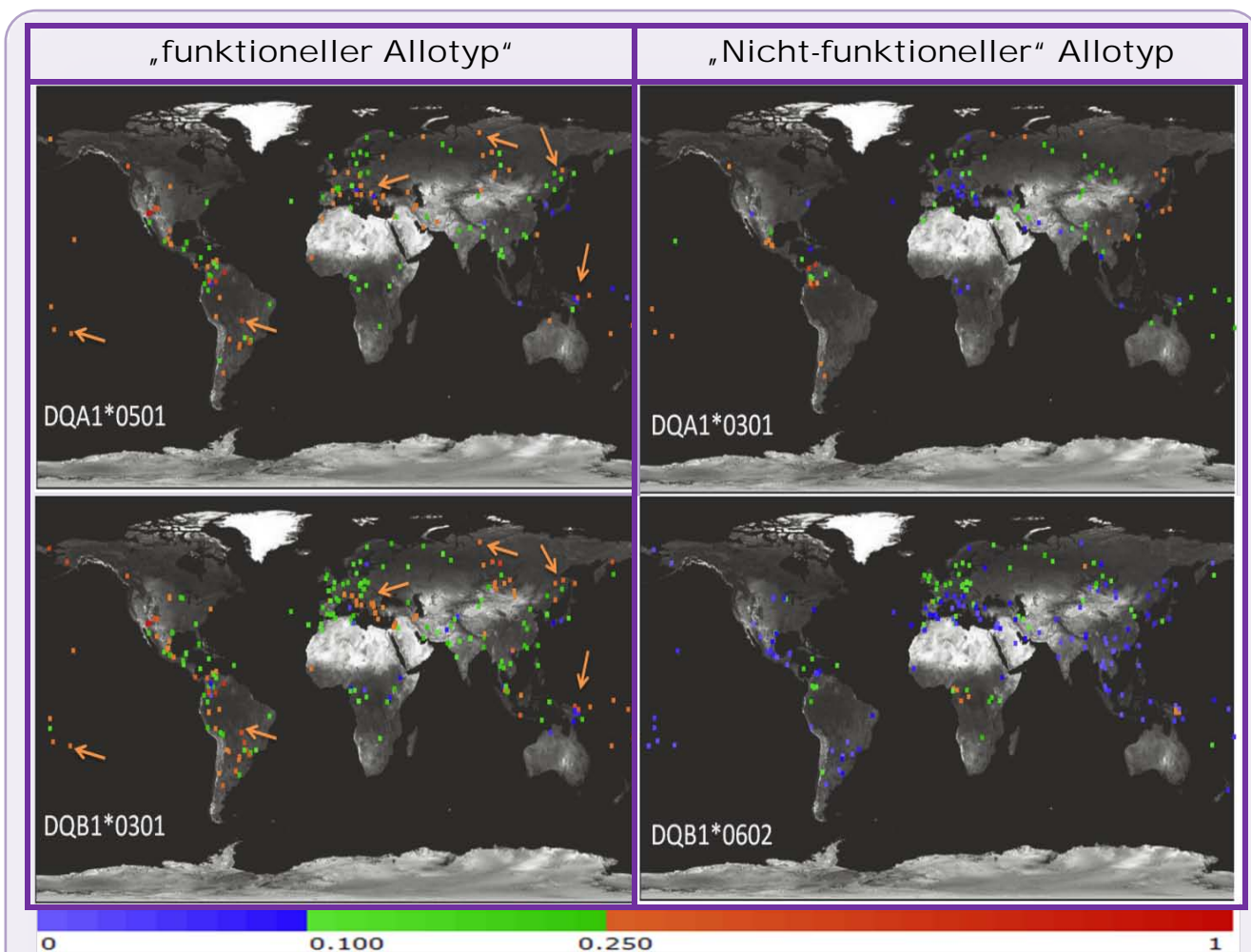
Die Assoziation zwischen HLA-DQ und Autoimmunerkrankungen ist ausführlich in Abschnitt 1 beschrieben worden, wobei DQ direkt an der Auslösung einer Erkrankung beteiligt sein kann oder mit Suszeptibilitätsgenen gekoppelt vererbt wird. Bei einigen Autoimmunerkrankungen (Diabetes mellitus Typ 1 (T1D), Zöliakie) steigt das relative Risiko für bestimmte HLA-DQ-Allelträger im Vergleich zu Nicht-Allelträgern (Stepniak et

al., 2008). Verantwortlich dafür sind zumeist die polymorphen Ankerreste innerhalb der Peptidbindegrube, die zu einer gesonderten Präsentation spezifischer Antigene führen. Möglicherweise sind einige dieser Erkrankungen direkt mit dem Polymorphismus der DQ-Gene verbunden (Wiesner et al., 2008). Es ist weiterhin denkbar, dass aufgrund der verminderten Kombinationsmöglichkeit der DQ-Ketten eine Assoziation mit einer Autoimmunerkrankung zum Tragen kommen kann und es somit zu einer Einschränkung der genetischen Variabilität kommt. Bereits bekannt ist, dass bei Störungen der Expression von Klasse-II-Rezeptoren die antigenspezifische T-Zellreaktion eingeschränkt ist. Die klinischen Symptome dieses sogenannten „Bare Lymphocyte Syndrom“ wurden anhand von 80 Patienten aus 60 Familien beschrieben. Die häufigsten Manifestationen sind rezidivierende schwere Infektionen, protrahierte Durchfälle, Atemwegserkrankungen und Gedeihstörungen (Wahn et al., 2010). Speziell für den Fall des „Bare Lymphocyte Syndrom“ ist jedoch nicht lediglich ein Isotyp betroffen, sondern es handelt sich um den generellen Ausfall bzw. die Verminderung der Antigenpräsentation durch HLA-Klasse-II-Moleküle.

Verschiedene Studien belegen zudem, dass die Kombination aus bestimmten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten entscheidend für das relative Risiko einer Erkrankung sein kann. Eine Erhöhung des Risikos an Zöliakie zu erkranken wird für den DQ-Allotypen DQA1\*0501/DQB1\*02 beschrieben (Cintado et al., 2006). Abhängig von der DQ-Allelkombination konnten veränderte CLIP-Sequenzen im Zusammenhang mit DQ2 und DQ8 nachgewiesen werden, die verstärkt bei Zöliakie-Patienten gefunden wurden. Dabei ist hervorzuheben, dass die besonders starke Bindung von CLIP zu einer veränderten T-Zell-Selektion führt und so Autoimmunerkrankungen entstehen können (Wiesner et al., 2008). Weiterhin zeigte Ettinger et al. (1998), dass SDS-instabile DQ-Heterodimere das relative Risiko für T1D (Diabetes mellitus Typ1) erhöhen, wohingegen SDS-stabile Dimere wie z.B. DQA1\*0102/DQB1\*0602 protektiv wirken. Die Arbeits-gruppe Spurkland konnte zeigen, dass in Abhängigkeit der DQA1- und DQB1- Genkombination eine Prädisposition für Multiple Sklerose genetisch vorbestimmt ist (Spurkland et al., 1991). Aber nicht nur das relative Risiko für Autoimmun- und Stoffwechselerkrankungen ist abhängig von den  $\alpha/\beta$ -Allelkombinationen des Isotyps DQ, sondern auch ein Schwangerschaftsabbruch innerhalb der ersten drei Monate wurde in Verbindung mit diesen HLA-Klasse-II-Molekülen gebracht (Sipak-Szmigiel et al., 2007). Ein erhöhtes Risiko wurde dabei für DQA1\*0105/DQB1\*05, ein geringes Risiko für Schwangere mit der Allelkombination DQA1\*0302/DQB1\*0303 beschrieben.

Für die in dieser Arbeit gefundenen vier transportinkompetenten DQ-Allelkombinationen wurden bisher keine Hinweise für eine direkte Korrelation mit der Entstehung einer Erkrankung beschrieben. Eine Erklärung dafür liegt wohl in der Tatsache begründet, dass diese Kombinationen unter natürlichen Bedingungen gar nicht, bzw. äußerst selten vorkommen. In dieser Arbeit sollte durch Betrachtung einzelner Haplotypen einer ethnischen Population untersucht werden, inwiefern das Auftreten dieser nicht-passenden Allelkombinationen beobachtet werden kann. Ein positives Kopplungsungleichgewicht innerhalb einer Ethnie zeigt dabei, dass eine DQ $\alpha/\beta$ -Kombination zusammenhängend vererbt wird. Eine negative Selektion kann für diese besonderen

Allelkombinationen ausgeschlossen werden. Hingegen zeigt ein negativer Deltawert ( $-\Delta$ ) zwischen tatsächlicher und errechneter Haplotypenhäufigkeit ( $\hat{=}$  Kopplungsungleichgewicht), dass diese Allelkombination sehr selten innerhalb der betrachteten Population vorkommt. Weiterhin müssen für negative  $\Delta$ -Werte populationsgenetische Einflüsse in die Betrachtung einbezogen werden, die ursächlich für die Minimierung des Auftretens auf einem Chromosom sind. Dabei ist sehr interessant, dass zwischen den Genorten DQA1 und DQB1 ein besonders stark ausgeprägtes Kopplungsungleichgewicht herrscht und somit verschiedene Allelkombinationen sehr häufig gekoppelt auf einem Chromosom vorkommen, andere Kombinationen nur selten beobachtet werden (Gyllensten & Erlich, 2002).



**Abbildung 5.2: Regionale Verteilung von nicht-funktionellen HLA-DQ-Allelen**

Die regionale Verteilung und Häufigkeit der HLA-DQ-Allele, die in Kombination von  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette weder als EndoH-resistent, noch auf der Zelloberfläche detektiert werden konnten, sind stellvertretend durch DQA1\*0301 und DQB1\*0602 auf der rechten Seite dargestellt. Es zeigt sich, dass keine der aufgeführten ethnischen Populationen beide Allele mit einer Frequenz von über 25% (rote Farbmarkierung) besitzt. Die linke Hälfte der Abb. 5.2 sind die Allelhäufigkeiten von DQA1\*0501 und DQB1\*0301 gezeigt. Bei Untersuchungen der einzelnen Populationen zeigen sich Überschneidungen der regionalen Verteilung. Durch orange Pfeile werden Populationen markiert, in denen beide Allele mit einer Häufigkeit von > 25% gefunden werden. Das gemeinsame Vorkommen innerhalb von einem Individuum erscheint wahrscheinlich.

Bei der Betrachtung des Vorkommens der einzelnen Allele konnte anhand der Angaben der Datenbank „Allele frequencies“ ein Unterschied zwischen transportkompetenten und nicht-passenden Allelkombinationen aufgezeigt werden. Bei der Auswertung der regionalen Verteilung zeigte sich, dass alle Allelkombinationen, die auf der Zelloberfläche nachzuweisen waren, innerhalb einzelner Populationen sowohl eine sehr hohe Häufigkeit für die  $\alpha$ - als auch für die  $\beta$ -Kette aufwiesen. Dies gilt nicht für transportinkompetente Allelkombinationen. Das häufige Auftreten einer  $DQ\alpha$ -Untereinheit als Teil eines nicht-funktionellen Heterodimers ist durch die gleichzeitig sehr geringe Häufigkeit der zugehörigen  $\beta$ -Kette in der gleichen Ethnie gekennzeichnet. Somit ist für diese nicht-passenden Rezeptoren das gleichzeitig häufige Vorkommen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette bisher nicht gezeigt worden. Ausgehend von den hier analysierten  $DQ\alpha$ -Allelen ist jedoch das gleichzeitige Vorkommen mit einer  $DQ\beta$ -Kette in einer Population wahrscheinlich, die zu einem Heterodimer kombiniert, im Zellmodell zur Zelloberfläche transportiert werden konnten. Beispielhaft ist dies in Abbildung 5.2 für die funktionelle Allelkombination  $DQA1^*0501/DQB1^*0301$  und den transportinkompetenten Allotypen  $DQA1^*0301/DQB1^*0602$  dargestellt. Rote Pfeile markieren dabei die Ethnien, in denen beide  $DQ$ -Subeinheiten mit einer Frequenz von über 25% vorkommen. Die Auswertung aller untersuchten Allele ist im Anhang in Abbildung 6.2 und 6.3 nachzulesen. Das Vorkommen von nicht-funktionellen Allelkombinationen in Populationen ist jedoch auch nach Betrachtung der regionalen Verteilung einzelner Allele möglich.

Die Ergebnisse aus Abschnitt 4.3.3 zeigen, dass es in jeder der 20 untersuchten Ethnien bestimmte Haplotypen aus  $DQ\alpha$  und  $DQ\beta$  gibt, die besonders häufig vorkommen und mit einem hohen positiven Kopplungsungleichgewicht beschrieben werden. Auffällig ist dabei, dass es unabhängig von der Population, oftmals die gleichen Haplotypen sind, die sich auf diese Art hervorheben und auf einem Chromosom gemeinsam vorkommen. Diese stabilen Haplotypen scheinen stark miteinander gekoppelt zu sein und sich unabhängig von der Region und Zeit zu erhalten und an die Nachkommen weitergegeben werden. In verschiedenen Studien werden ähnliche Analyseresultate für die Stabilität von  $DQ$ -Haplotypen beschrieben. Dabei werden bestimmte Allelkombinationen in Form eines Haplotypen als stark konservierte, populationsspezifische Haplotypen beschrieben (Dawkins et al., 1999; Ahmed et al., 2003).

Die Entwicklung eines Kopplungsungleichgewichts ist dabei von verschiedenen Faktoren wie der Rekombinationsrate, der Größe und Migration der Population und der Selektion bestimmter Haplotypen abhängig (Ahmed et al., 2003). Es zeigte sich in verschiedenen Studien, dass die Rekombination eine untergeordnete Rolle für den HLA-DQ-Bereich zu spielen scheint. Die Arbeitsgruppe Carrington charakterisiert die Rekombinationsrate für die Genorte  $DQ$  und  $DR$  als sehr gering (Carrington et al., 1999). Ausgehend von bestimmten Hot Spots für die Rekombination beschreibt auch Ahmed et al. (2003), dass  $DQ$  außerhalb eines Rekombinations-Hot Spots liegt. Nur wenige Rekombinationsereignisse konnten in familienbasierten Studien aufgedeckt werden.

Weiterhin wird von Carrington et al. (1999) jedoch darauf hingewiesen, dass durch eine abgeschwächte oder gar unterdrückte Rekombinationsrate nicht die Möglichkeit einer Selektion bestimmter Haplotypen beeinflusst wird (Carrington et al., 1999). Die natürliche Selektion fördert im HLA-Komplex besonders die Diversität im Bereich der Peptidbindegrube. Der Polymorphismus in diesem Bereich sichert das Überleben der Individuen, da so die Peptidpräsentation eines möglichst großen Spektrums an Peptiden gewährleistet wird (Yeager & Hughes, 1999). Die epistatische Form der Selektion kann dabei eine Allelkombination an zwei oder mehreren Genorten spezifisch fördern, so dass es zur Entstehung von Kopplungsungleichgewichten in der Bevölkerung kommt (Ahmed et al., 2003). Traherne (2008) erklärt diesen positiven Selektionsdruck für bestimmte Allelkombinationen, die über eine lange Zeitperiode während der Evolution nur selten getrennt werden, durch funktionelle cis-Interaktionen zweier Genorte. Dabei ist ein Set von Allelen eines bestimmten Haplotypen dafür ausgerichtet, um zusammen zu funktionieren (Traherne et al., 2008). Diese cis-Assoziation im Zusammenhang mit den Allelen des DQA1- und DQB1-Genortes könnte erklären, dass die Allelkombinationen mit einem Kopplungsungleichgewicht als funktionell in dieser Arbeit charakterisiert werden konnten. Es ist somit anzunehmen, dass alle Allelkombinationen, die in ethnischen Populationen mit einem besonders hohen Kopplungsungleichgewicht gefunden werden, funktionell zueinander passen und somit einen transportkompetenten DQ-Rezeptor ergeben. Diese Theorie muss für die Heterodimere von HLA-DQ jedoch noch weiterhin belegt werden.

Die vier nicht-transportkompetenten Allelkombinationen aus Abschnitt 4.3.1 wurden auch hinsichtlich ihres Vorkommens von Haplotypen und dem zugehörigen Kopplungsungleichgewicht untersucht. Es zeigte sich, dass alle vier Haplotypen zu den sehr seltenen Haplotypen zählen und in fast allen ethnischen Populationen mit einer Frequenz unter 1% beschrieben werden können. Anhand dieser Daten wird deutlich, dass diese Allelkombinationen negativ selektioniert wurden oder noch werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass nicht-transportkompetente Allelkombinationen in cis-Stellung auf einem Chromosom vorkommen ist daher als sehr gering einzuschätzen. Ein totaler Ausfall aller DQ-Heterodimere ist aufgrund der cis-Stellung nicht nur bei heterozygoten, sondern auch bei homozygoten Individuen sehr unwahrscheinlich. Auffällig ist, dass die beiden einzigen nicht-funktionellen Allelkombinationen, die in der Datenbank gelistet waren, nur in sehr kleinen ethnischen Populationen auftauchten, die in sich sehr geschlossen sind. Lediglich die Allelkombination DQA1\*0301/DQB1\*0201 konnte mit einem positiven  $\Delta$ -Wert identifiziert werden, wobei sie sich in ethnischen Populationen zeigte, die keine hohen Migrationsraten erwarten lassen. Es wurden zwei afrikanische Stämme (Cameroon Saa und Gabon Haut Ogooue Province Dienga Village) und vier Populationen in Indien gefunden, in denen dieser Haplotyp auftritt.

Bei einer Untersuchung der HLA-Haplotypen in Sibirien wurden ähnliche Ereignisse hinsichtlich des Auftretens von nicht-funktionellen Allelkombinationen in insich geschlossenen Populationen beobachtet. Blazenka et al. (1998) untersuchte die Allelfrequenzen der fünf polymorphen Klasse-II-Genorte in sieben unterschiedlichen



ethnischen Populationen. Anhand der Genfrequenz wurden die vorkommenden Haplotypen und ihre Häufigkeit beschrieben. Es konnte eine Präferenz für spezielle HLA-DQA1/DQB1-Kombinationen in den sieben untersuchten Subpopulationen aufgezeigt werden. Ein Beispiel für eine sehr häufig vorkommende Allelkombinationen auf einem Chromosom ist die Kombination aus DQA1\*01/DQB1\*03 und DQA1\*03 und DQB1\*05. Das Vorhandensein von Präferenzen der Interaktion zwischen DQA1 und DQB1 legt den Schluss nahe, dass Limitationen für die Formierung von DQ $\alpha$ / $\beta$ -Heterodimeren existieren. (Blazenka et al., 1998). Diese Ergebnisse zeigen erneut, dass es bestimmte Haplotypen gibt, die hochfrequent sind und deren Kopplung auf einem Chromosom positiv selektiert wird.

Weiterhin zeigte Blazenka et al., dass viele der Haplotypen in Sibirien unübliche Allelkombinationen darstellten, die außerhalb von sibirischen Regionen nicht häufig vorkommen. Diese unüblichen DQ-Haplotypen bestehen aus Allelkombinationen, die als nicht-transportkompetent identifiziert wurden (Kwok et al., 1993). Die Entstehung dieser niedrig-frequenten Haplotypen kann in kleinen Populationen mit geringer Migrationsrate nicht mit der Herkunft aus fremden Populationen erklärt werden. Es ist davon auszugehen, dass von Zeit zu Zeit Rekombinationsereignisse diese Allelkombinationen hervorbringen. Aufgrund des genetischen Drifts kann diese zufällige Änderung der Haplotypen in kleinen Populationen besonders auffällig sein. Diese Allelkombinationen existieren als Haplotyp in einer kleinen Population jedoch nur vorübergehend, bevor sie durch negative Selektion eliminiert werden (Blazenka et al., 1998). Das Auftreten von „verbotenen“ Allelkombinationen ist dabei vermutlich nicht auf Sibirien beschränkt. Die geringe Populationsgröße von Sibirien sowie die relativ starke Isolation zu anderen Populationen sind jedoch Bedingungen, unter denen solche Haplotypen eher vorkommen, als in großen, schnell durchmischenden Populationen.

Eine wichtige Erkenntnis ergibt sich aus der Tatsache, dass keine homozygote Person identifiziert werden konnte, die eine nicht-funktionelle DQ-Allelkombination aufweist. Somit ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass einer von zwei Haplotypen bzw. die trans-Kombination aus DQ $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette transportkompetent ist.

#### **5.1.4 Zusammenhang zwischen Partnerwahl und HLA-DQ-Allelkombinationen**

Bei der Ursachenforschung nach dem negativen Selektionsdruck für das Vorkommen bestimmter DQ-Allelkombinationen als Haplotyp sind mehrere Gründe anzuführen. Die große Anzahl an Assoziationen mit Immun- und Stoffwechselerkrankungen scheint dabei eine wichtige Rolle einzunehmen. Die Nachteile, ausgehend vom Beispiel des

„Bare Lymphocyte Syndrom“, bei dem die Klasse-II-Moleküle gar nicht oder nur minder zur Antigenpräsentation zur Verfügung stehen, zeigen den deutlichen Nachteil für betroffene Individuen auf. Die Einschränkung der unterschiedlichen Heterodimere in einem Individuum verringert das Spektrum an Peptiden, die durch DQ präsentiert werden können. Eine mögliche Initiierung einer nötigen Immunantwort kann somit auch ausbleiben und deutliche Nachteile für die Gesundheit des Einzelnen haben.

Ausgehend von diesen Nachteilen kann ein sehr interessanter Zusammenhang zwischen dem Selektionsdruck von Haplotypen und der Entstehung von bestimmten DQ-Allelkombinationen beobachtet werden. Die polymorphen Gene des HLA-Komplexes und Genorte für olfaktorische Rezeptoren sind wiederholt mit verschiedenen Aspekten von Partnerwahl und reproduktivem Erfolg in Verbindung gebracht worden (Ziegler, 2003). Es wurde beschrieben, dass die HLA-Heterozygotie gemäß des „Heterozygotenvorteils“ einen individuellen Nutzen für ein Individuum bringt (Ohta et al., 1999). Die Verschiedenheit der MHC-Gene in einem Individuum führen dabei zu einer verbesserten Anpassungsfähigkeit eines Individuums gegenüber Krankheitserregern, da die Möglichkeit Peptide neuartiger Krankheitserreger zu präsentieren, bei erhöhter HLA-Vielfalt wahrscheinlicher ist. Somit kann eine durch den Geruchssinn beeinflusste Partnerwahl die Auswahl an cis- und vor allem trans-Kombinationen der HLA-Rezeptoren steuern (Ziegler, 2003). Vor allem Peptide aus den MHC-Peptidkomplexen sind an der Entscheidung der Partnerwahl im Zusammenhang mit sexueller Selektion beteiligt. Bei verschiedenen Untersuchungen zeigte sich, dass es auf die Ankerreste der Peptide ankommt, die die Spezifität der Erkennung durch olfaktorisch sensorische Neuronen bestimmen (Böhm, 2005). Anhand synthetischer Peptide konnte, in Abhängigkeit der Sequenz, die Reproduktionsentscheidung von Mäusen beeinflusst werden. In Untersuchungen an Stichlingsfischen wurde durch die Zugabe von synthetischen Peptiden das Wahlverhalten der Fische beeinflusst (Milinski et al., 2005).

Anhand dieses belegten Zusammenhangs zwischen dem Wahlverhalten bzw. der sexuellen Selektion und des „MHC-Heterozygotenvorteils“ ist es denkbar, dass durch die Partnerwahl die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von nicht-funktionellen Allelkombinationen, die durch den maternalen und paternalen Haplotypen entstehen könnten, minimiert wird. Nach dieser Theorie würden, anhand der Auswahl eines spezifischen Partners, Allelkombinationen ausgewählt, die in trans-Stellung zu transportkompetenten Heterodimeren zusammengebaut werden können. Dies würde zudem erklären, warum in kleinen, abgegrenzten Populationen gelegentlich das Auftreten von nicht-funktionellen Allelkombinationen beobachtet werden kann, da in diesen Ethnien die Auswahl hinsichtlich der sexuellen Selektion wesentlich geringer ist als in größeren Populationen.

---

## 5.2 Klasse-II-Abhängigkeit von dem Chaperon Invariante Kette

### 5.2.1 Die Invariante Kette als Chaperon für HLA-DR, -DP und -DQ

Die HLA-II-Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  werden im ER zu Heterodimeren zusammgebaut, die mit der Invarianten Kette in einem Aggregat vorliegen (Anderson & Miller, 1992). Die Invariante Kette bindet dabei an die HLA-Klasse-II-Moleküle innerhalb der Peptidbindegrube, die durch die  $\alpha$ 2- und  $\beta$ 2-Domänen gebildet wird (Gosh et al., 1995).

Die Aggregation mit der Ii verändert die Konformation des Heterodimers (Anderson & Miller, 1992; Verreck et al., 2001). Ausgehend von der veränderten Konformation kann ein funktionsfähiger Klasse-II-Rezeptor das ER verlassen und den Weg zu dem endosomalen Kompartiment antreten (Bakke & Dobberstein, 1990).

Ii wird dabei eine Chaperonfunktion für das Klasse-II-Molekül zugeschrieben (Anderson & Miller, 1992). Die stabilisierende Wirkung auf die HLA-Heterodimere und der Einfluss der Ii auf eine erfolgreiche Antigenpräsentation wurden an Ii-defizienten Mäusen nachgewiesen. Die genveränderten Mäuse zeigten in diesen Versuchen eine deutlich reduzierte MHC-II-Oberflächenexpression, sowie eine fehlende Antigenpräsentation (Elliot et al., 1994; Viville et al., 1993).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigen die Aussage, dass die Ii als Chaperon für Klasse-II-Moleküle fungiert. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigen für alle drei Klasse-II-Isotypen DR, DP und DQ eine verbesserte Oberflächenexpression der Heterodimere in menschlichen Lungenfibroblasten an. Eine vollständige Abhängigkeit, hinsichtlich des Transportes zur Zelloberfläche, konnte dabei aber nicht gezeigt werden. Jedoch erhöhte die Anwesenheit der Invarianten Kette die Oberflächenexpression bis zu dem dreifachen Wert, verglichen mit dem Transport der Heterodimere in Abwesenheit der Invarianten Kette.

Ramagnoli und Germain (1994) beschreiben erstmals, dass die Funktion der Ii auf die CLIP-Sequenz zurückzuführen ist. Das CLIP-Segment reguliert sowohl den Zusammenbau im ER, als auch den intrazellulären Transport zur Zelloberfläche. Damit die Invariante Kette ihre Chaperonfunktion für alle Iso- und Allotypen aufrecht erhalten kann, ist es notwendig, dass sie mit konservierten Aminosäureresten in der  $\alpha$ 2/ $\beta$ 2-Domäne interagiert. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen wurden Ii-Konstrukte verwendet, bei denen eine Deletion in der peptidbindenden Region durchgeführt wurde (Abschnitt 4.2.6). Die Ergebnisse belegen, dass nach Analyse der Oberflächen-expression eines HLA-II-DQ-Allotyps, insbesondere die Grube-bindende Sequenz (AS 91 - 99) der Invarianten Kette wichtig für die Erhöhung der Oberflächen-expression der DQ-Rezeptoren ist. Diese Chaperonwirkung der Ii auf die Heterodimere konnte ebenso durch die Deletion der Aminosäurereste 81 – 87 abgeschwächt werden, jedoch war das Ergebnis nicht signifikant. Die Ii-Sequenz der Aminosäurereste 81 – 90 wird bereits durch Stumptner & Benaroch (1997) als prolinreiche Sequenz beschrieben, die die Bindung zwischen der Ii und dem Klasse-II-Molekül stabilisiert. Dabei konnte die

PBS-Region (AS 81 - 87) als wichtige Kontaktstelle zur Stabilisierung verschiedener Allotypen identifiziert werden (Neumann et al., 2006). Die Ergebnisse aus Kapitel 4.2.6 zeigen somit, dass diese Interaktion nicht die einzige Kontaktstelle ist. Der Austausch von Methionin gegen Glycin an Position 91 der Ii zeigte keinerlei Veränderungen der Chaperonfunktion.

Die Ergebnisse für HLA-DQ, -DR und -DP zusammenfassend, kann die vermeintliche Chaperonfunktion der Invarianten Kette für alle drei Isotypen bestätigt werden. Anhand von drei Ii-Deletionsmutanten wurde der Aminosäurebereich 91 – 99 als entscheidend für die Chaperonfunktion der Invarianten Kette für einen HLA-DQ-Allotyp identifiziert.

### 5.2.2 Die Anwesenheit der Invarianten Kette verändert die DQ-Konformation

Die durch Anderson & Miller (1992) beschriebene Tatsache, dass die Ii zu einer Konformationsänderung der Klasse-II-Moleküle führt bevor der HLA-Rezeptor aus dem ER freigesetzt wird, könnte durchaus einen erheblichen Einfluss auf die erfolgreiche Antigenprozessierung besitzen. Weiterhin wird beschrieben, dass die Ii einen Einfluss auf die Modifikation der Klasse-II-Moleküle bewirkt. Erst nach dem intrazellulären Transport der MHC-Moleküle durch den Golgi ist eine Erhöhung der molekularen Masse der HLA-Untereinheiten erkennbar, wobei diese Zunahme mit einer N-Glykosylierung in Verbindung gebracht wird (Anderson & Miller, 1992). Viele Proteine werden hinsichtlich ihrer Kohlenhydratstruktur modifiziert, was einerseits zur Reifung der Proteine beiträgt, aber auch für den Transport eine entscheidende Rolle spielt (Farquhar & Palade, 1998). Anhand des Einsatzes des Enzyms EndoH konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass HLA-DR und -DP bei Passage des Golgi Komplexes eine N-Glykanreifung erfahren. Untersuchungen dieser Arbeit hinsichtlich einer N-Glykanmodifikation von HLA-DQ-Molekülen im Golgi Komplex zeigten jedoch, dass, in Abwesenheit der Ii, DQ-Heterodimere mit unreifen N-Glykanen zur Zelloberfläche transportiert wurden. Nach Ii-Expression hingegen wurde ein Großteil der zelloberflächenexprimierten DQ-Moleküle mit reifen Kohlenhydraten detektiert. Diese Versuche beweisen eine spezifische Abhängigkeit der DQ-Moleküle von der Invarianten Kette. Die Ii verändert die Konformation der  $\alpha/\beta$ -Heterodimere bei dem Isotypen DQ vermutlich insofern, dass die Enzyme des Golgi Apparats die Kohlenhydratreifung induzieren können. Die Ergebnisse in Abwesenheit der Ii legen die Vermutung nahe, dass aufgrund einer besonderen Konformation des Moleküls keine Kohlenhydratreifung erfolgen kann. Dabei bleibt die Frage offen, inwiefern ein „nicht-klassisch“ gefaltetes DQ-Molekül in der Lage ist, antigene Peptide zu binden und zu präsentieren.

Eine andere Möglichkeit die Ergebnisse von unreifen Kohlenhydraten der HLA-DQ-Moleküle auf der Zelloberfläche zu erklären, ergibt sich bei Betrachtung der

intrazellulären Transportroute. Entgegen dem klassischen Weg vom ER über den Golgi Komplex zum endosomalen Kompartiment bzw. der Zelloberfläche gibt es sogenannte nicht-klassische Transportrouten für Membranproteine. Im ER synthetisierte membran-gebundene Proteine erreichen die Plasmamembran zusätzlich über nicht klassische Pfade, die zum jetzigen Zeitpunkt nicht gänzlich erklärt werden können (Tveit et al., 2008).

Eine wichtige Rolle für den nicht-klassischen Transport von Proteinen über eine Golgi-Bypass-Route spielt das Intermediäre Kompartiment (IC). Eine direkte Route entsteht vom frühen IC zur Plasmamembran und eine weitere Transportmöglichkeit führt vom späten IC über das endosomale Kompartiment zur Plasmamembran. Die beiden Transportwege unterscheiden sich in der Geschwindigkeit und der Sensitivität gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperaturschwankungen. Es ist denkbar, dass Proteine, für die eine BFA-unabhängige Transportstrecke nachgewiesen wurde, sowohl den direkten Weg als auch den Weg über das späte endosomale Kompartiment nehmen (Marie et al., 2008).

Inwiefern ein HLA-Klasse-II-Molekül, das auf direktem Weg zur Zelloberfläche oder über das späte endosomale Kompartiment transportiert wird, in der Lage ist, Antigene aufzunehmen und zu präsentieren, kann aufgrund dieser Ergebnisse jedoch nicht beantwortet werden.

### **5.2.3 Der Polymorphismus beeinflusst die Transporteigenschaften der DQ-Heterodimere unabhängig der Invarianten Kette**

Die ersten Studien, die sich mit der Analyse der verschiedenen Allelkombinationen beschäftigten, wiesen den Transport zur Zelloberfläche von Allelkombinationen in cis- und trans-Stellung nach (Giles et al., 1995; Nepom et al., 1987). Es zeigte sich aber bereits in diesen Arbeiten, dass es zu einer unterschiedlichen Stärke der Oberflächenexpression in Abhängigkeit der jeweiligen Allelkombination kommt. Allele von einem Haplotypen demonstrierten eine stärkere Zelloberflächenexpression als Haplotypen-ungepaarte Allelkombinationen aus Alpha- und Beta-Kette in trans-Stellung (Germain et al., 1985). Die Möglichkeit, dass verschiedene Allelkombinationen unabhängig vom Haplotypen zu einem Heterodimer zusammengebaut werden können, zeigte sich auch beim humanen HLA-Klasse-II-Isotypen DQ (Giles et al., 1985). Auffällig war auch bei diesen Analysen, dass je nach Allelkombination unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Oberflächenexpression erzielt wurden.

Bezugnehmend auf diese Studien konnten in dieser Arbeit besonders für den Isotypen DQ verschiedene Allelkombinationen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, unabhängig einer Haplotypen-

zugehörigkeit, untersucht werden. Die verschiedenen DQ-Allotypen zeigten hinsichtlich der durchflusszytometrischen Auswertung der Oberflächenlokalisierung unterschiedliche Ergebnisse. Eine Abhängigkeit dieser Transportunterschiede von der Anwesenheit der Li konnte ausgeschlossen werden, da sämtliche Ergebnisse sowohl mit und ohne die Li erzielt wurden. Die Untersuchung von zwölf unterschiedlichen Allelkombinationen ergab, dass je nach Allotyp die Abhängigkeit von der Li unterschiedlich ausfiel. Eine besonders deutliche Abhängigkeit konnte für die drei Allotypen DQ $\alpha/\beta$  0103/0302; 0103/0602 und 0301/0301 gefunden werden. Die übrigen Allelkombinationen wiesen zwar eine signifikante, aber dennoch geringere Beeinflussung durch die Invariante Kette hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression auf. Somit spielt auch der Polymorphismus der HLA-DQ-Moleküle eine Rolle, wenn es um die Abhängigkeit von der Li geht.

Hinsichtlich einer unterschiedlich starken Oberflächenexpression konnten auch einzelne Allelkombinationen identifiziert werden, die vergleichsweise sehr starke Fluoreszenzsignale in der Durchflusszytometrie lieferten. Ähnliche allelabhängige Unterschiede des Transportes zur Zelloberfläche für den Isotypen DQ wurden von den Arbeitsgruppen Kwok et al. und Sant et al. beschrieben. Dabei zeigten DQ $\alpha/\beta$  0201/0302, 0401/0302 und 0501/0302 eine höhere Oberflächenexpression als die Allotypen 0201/0201, 0301/0302, 0401/0201 und 0501/0201 (Kwok et al., 1993). Übereinstimmend mit diesen Daten wurde in dieser Arbeit die Allelkombination 0501/0302 in Abwesenheit der Li mit einer höheren Oberflächenexpression getestet als 0301/0302. Allerdings zeigte 0501/0201 eine ähnlich starke Oberflächenexpression wie 0501/0302. Dies beweist, dass, unabhängig des jeweiligen Allotyps, auch Einflüsse wie Transfektionsraten und Analysetechniken entscheidend für die Ergebnisse sind. Die Oberflächenexpressionsraten wurden zwar in beiden Fällen in der Durchflusszytometrie untersucht, jedoch wurde zur Auswertung bei Kwok et al. die relative Fluoreszenzintensität im Gegensatz zur prozentualen Anzahl an positiven Zellen in vorliegender Arbeit herangezogen (Kwok et al., 1989; Kwok et al., 1993).

Innerhalb der verschiedenen Analysemethoden zeigen jedoch beide Studien, dass es in Abhängigkeit des jeweiligen Allotyps zu einer unterschiedlich starken Oberflächenexpression kommen kann.

---

## 5.3 Strukturanalyse von HLA-DQ-Molekülen

### 5.3.1 Sequenzspezifische Abhängigkeit der DQ-Allelkombinationen von der Invarianten Kette

Heterozygote Individuen können bis zu elf unterschiedliche HLA-Allele (jeweils vier mögliche Allele durch DQ und DP und drei Allele durch DR) in ihrem Genotyp besitzen. Jedes HLA-Heterodimer ist darauf ausgelegt, ein bestimmtes Repertoire an antigenen Peptiden zu binden und zu präsentieren. Der existierende evolutionäre Druck, eine möglichst große Bandbreite an Peptiden binden zu können, um für den Fall des Eindringens von Pathogenen eine Immunantwort auszulösen, fördert die Vielfalt der Allele (McFarland & Beeson, 2002). Viele der Aminosäurereste einer Klasse-II-Moleküls, die Wasserstoffbrückenbindungen zu den gebundenen antigenen Peptiden ausbilden, liegen konserviert vor. Andere Sequenzbereiche hingegen sind durch einen stark ausgeprägten Polymorphismus gekennzeichnet. Anhand der Muster der konservierten Bereiche können Unterschiede zwischen den Isotypen DQ und DR beschrieben werden. Während der Polymorphismus sich bei DR vor allem auf die Beta-Kette bezieht, zeigt DQ einen deutlichen Polymorphismus hinsichtlich beider HLA-DQ-Subeinheiten, sowohl bei der Alpha- als auch bei der Beta-Kette (Corte et al., 1981). Die Architektur der Peptidbindegrube der beiden Isotypen DR und DQ ist strukturell ähnlich. Beide Isotypen binden Peptide, die zwischen 12 – 25 AS lang sind.

Innerhalb dieser Arbeit konnte durch die Analyse der Isotypen DQ und DR eindeutige Unterschiede in der Transportkompetenz festgehalten werden. Der Isotyp DR zeigte eine höhere Oberflächenexpression als DQ-Moleküle. Weiterhin unterschieden sich die Isotypen in den Glykosilierungsmustern ihrer N-Glykane. Diese Unterschiede könnten im Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Antigenpräsentation gesehen werden. Weiterhin zeigte sich jedoch im Rahmen der Experimente in Abschnitt 4.2.4, dass nicht nur die Zugehörigkeit zu einem bestimmten Isotypen, sondern auch der jeweilige Allotyp für unterschiedliche Transporteigenschaften des Heterodimers zur Zelloberfläche verantwortlich ist. Die zwei Allelkombinationen DQ $\alpha$ /DQ $\beta$  0103/0302 und 0103/0602 unterscheiden sich von den übrigen Allotypen, da sie eine nahezu strikte Abhängigkeit von der Ii-Expression aufweisen. In Abwesenheit der Ii zeigen diese beiden Heterodimere nur eine schwache Zelloberflächenexpression. Durch die Ii-Anwesenheit wird der Transport dieser DQ-Kombinationen zur Zelloberfläche um ein Vielfaches erhöht. Interessanterweise besteht in beiden Fällen die DQ $\alpha$ -Untereinheit aus dem Allel DQA1\*0103. Die Abhängigkeit von der Ii ist jedoch nicht nur auf DQA1\*0103 zu reduzieren. Tauscht man DQA1\*0103 durch DQA1\*0501 aus, so entstehen in Kombination mit den vorher genannten DQ $\beta$ -Untereinheiten 0302 und 0602 Heterodimere mit einer wesentlich geringeren Abhängigkeit von der Ii. Sowohl DQA1\*0501/DQB10302, als auch DQA1\*0501/DQB1\*0602 zeigen eine starke Oberflächenexpression sowohl in Ab-, als auch in Anwesenheit der Invariante Kette.

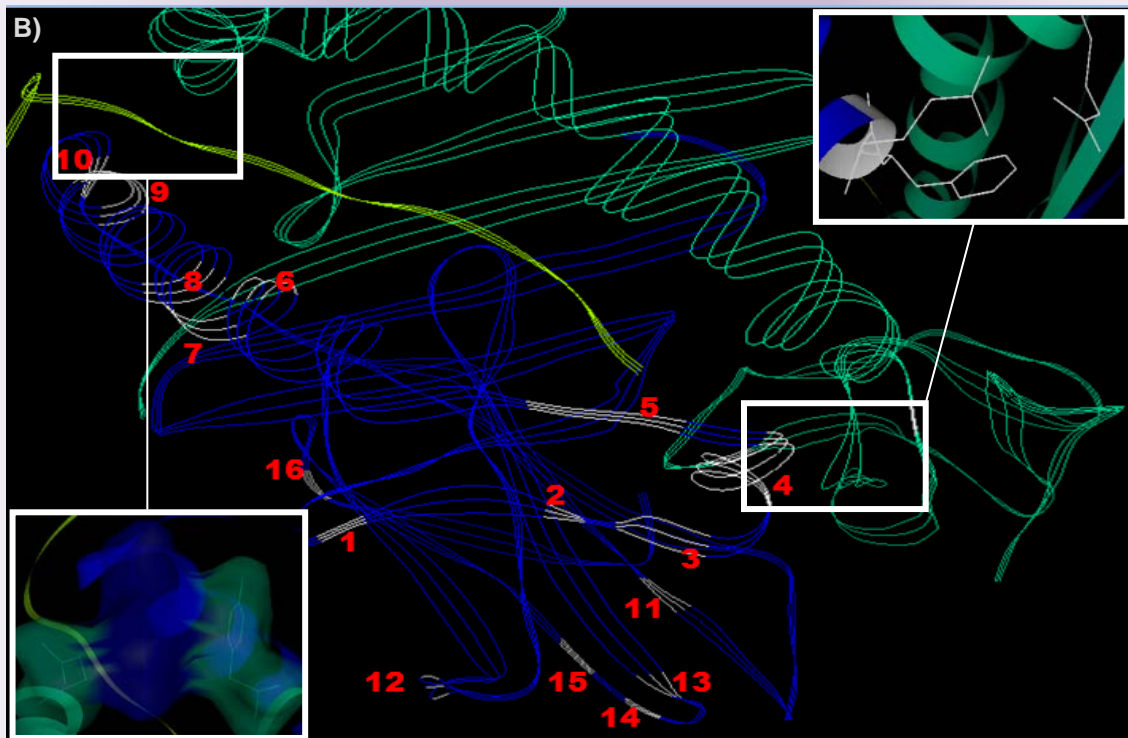
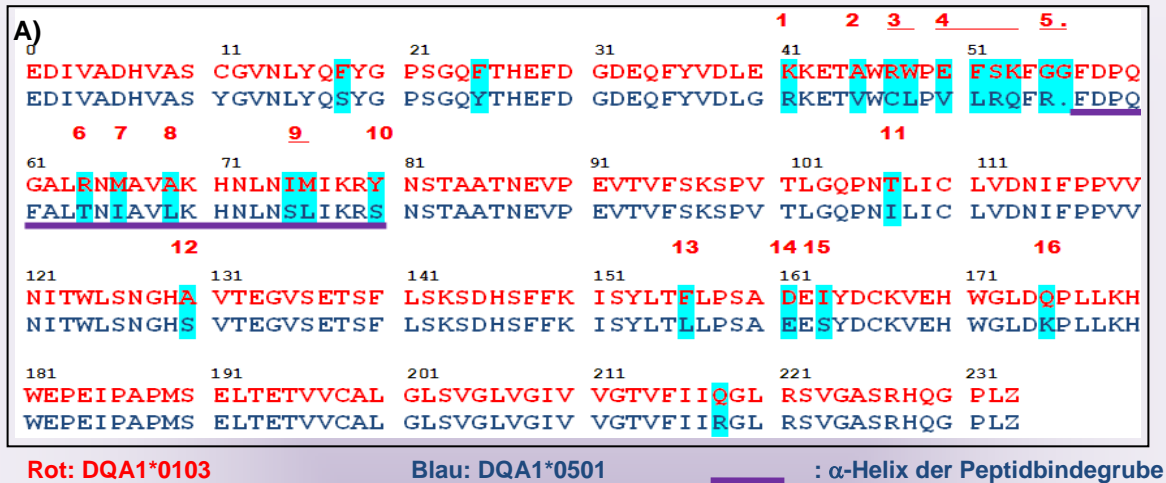


Abbildung 5.3: Sequenzvergleich zwischen DQA1\*0103 und DQA1\*0501

- A) Vergleich der Proteinsequenz zwischen den zwei Alpha-Ketten von HLA-DQ (0103 ist rot und 0501 blau markiert). Die Analyse soll Aufschluss über Unterschiede hinsichtlich der Kombierbarkeit der Ketten mit den Beta-Ketten DQB1\*0302 bzw. 0602 geben. Die Aminosäuren sind über den „Einbuchstabenkode“ abgekürzt. Blau hinterlegte Proteine unterschieden sich zwischen beiden Alpha-Ketten und sind durch die roten Zahlen durchnummeriert.
- B) Das 3D-Strukturmodell eines DQ2-Moleküls (RCSB-Datenbank) wurde mittels dem 3D-Molecule Viewer von Invitrogen dargestellt. DQ $\alpha$  ist blau und DQ $\beta$  grün eingefärbt. Mit gelber Farbe wurde ein gebundenes Peptid markiert. Die weiß markierten Bereiche der DQ $\alpha$ -Kette entsprechen den markierten AS aus A), die dort blau hinterlegt und numeriert sind. Die Zahlen markieren dabei die Sequenzbereiche, die beide Allele unterscheiden. Der weiße Kasten enthält einen vergrößerten Sequenzbereich und stellt die einzelnen Atome der AS dar.



Bei einem Sequenzvergleich zwischen DQA1\*0103 und \*0501 zeigt sich, dass sich beide Allele auf Proteinebene in 23 AS-Positionen unterscheiden (siehe Abb. 5.3.A). Dabei liegen sechs dieser markanten Positionen in der  $\alpha$ -Helix der  $\alpha$ 1-Domäne und somit im Bereich der Peptidbindegrube. Weiterhin fällt im Bereich des Grubeneingangs (AS 46 bis 56) auf, dass sich beide Allele in 8 von 10 AS-Positionen unterscheiden. Bei näherer Betrachtung des 3D-Strukturmodells in Abbildung 5.3.B sticht genau dieser Bereich des Grubeneingangs hervor. Der im Modell markierte Bereich 4 am Grubeneingang, sowie die Bereiche 9 und 10 am Ausgang der Grube weisen eine besondere Nähe zu den entsprechenden Aminosäuren der Beta-Kette auf. Abb. 5.3.B zeigt eine Vergrößerung des Bereichs 4, bei der die Seitenreste der AS 50 – 53 im Strukturmodell mit einzelnen AS dargestellt wurden. Das Allel DQA1\*0103 besitzt an AS-Position 50 einen Glutaminsäurerest und an Position 51 einen Phenylalaninrest. Diese AS der  $\alpha$ -Kette weisen eine besondere Nähe zu AS-Rest 91 (Arginin) der DQ $\beta$ -Kette auf. Arginin 91 ist in allen DQ $\beta$ -Ketten konserviert. Das Allel DQA1\*0501 besitzt an Position 50 einen Valinrest anstelle der Glutaminsäure und an Position 51 einen Leucinrest anstelle des Phenylalanins. Besonders der Austausch der negativ geladenen Glutaminsäure durch die AS Valin könnte die Bindung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette beeinflussen, da die ionische Bindung mit dem positiv geladenen Arginin verloren geht. Es könnte somit sein, dass besonders die Stelle am Grubeneingang einen bedeutenden Einfluss auf die Stabilität des Heterodimers hat und so die Transporteigenschaften der DQ-Moleküle positiv oder negativ beeinflusst.

Die Arbeitsgruppe Kwok et al. (1993) benutzte chimäre Moleküle der DQ $\beta$ -Kette, um den Zusammenbau verschiedener DQ-Untereinheiten zu analysieren. Dabei wurde der AS-Bereich 60 - 91 zwischen den Allelen DQB1\*0101 und \*0302 ausgetauscht. Die Analyse der Oberflächenexpression zeigte, dass dieser Bereich eine besondere Rolle bei der Frage spielt, ob eine DQ $\beta$ -Kette mit einer DQ $\alpha$ -Kette zu einem transportkompetenten Heterodimer zusammengebaut werden kann (Kwok et al., 1993). Bei einem Abgleich dieser Daten im 3D-Strukturmodell ergibt sich, dass dieser Bereich in direkter Nähe zu den hier benannten Aminosäurebereichen 4, 5, 6, 7 und 8 der DQ $\alpha$ -Kette (Abb. 5.3) liegt. Somit deuten auch diese Daten darauf hin, dass der Grubeneingang von besonderer Bedeutung für die Stabilität und die Transporteigenschaften eines Heterodimers sind.

Auch die Position 10 ist in der Abbildung 5.3B) vergrößert dargestellt. Bei Betrachtung der einzelnen Atomradien zeigt sich, dass die AS DQ $\alpha$ 80 (Tyrosin) von zwei AS der DQ $\beta$ -Kette an den Positionen 32 (Tyrosin) und 53 (Glutamin) passgenau umschlossen wird. Dabei liegt lediglich  $\beta$ 32 konserviert vor.  $\alpha$ 80 ist polymorph und entweder mit dem beschriebenen Tyrosin-, oder einem wesentlich kleineren Serinrest, besetzt. Auch die Position  $\beta$ 53 kann entweder mit Glutamin oder der AS Leucin besetzt sein. Durch diese Polymorphismen am Grubenausgang ist eine Veränderung der Stabilität des Heterodimers zu vermuten. Bei dem Vergleich dieser AS-Positionen zwischen DQ-Allelkombinationen mit starker und geringer Abhängigkeit von der Ii zeigt sich die Tendenz, dass die Besetzung von AS  $\alpha$ 80 entscheidend sein kann. Ist diese Position mit Tyrosin

besetzt, so ergibt sich eine starke Abhängigkeit von der li. Im Falle eines Serinrestes an Position 80 verringert sich die Notwendigkeit der li-Expression für eine starke Oberflächenexpression. Die Lage des Tyrosinrestes im 3D-Modell deutet aufgrund seiner Distanz von den AS-Resten des CLIP-Moleküls darauf hin, dass die AS80 keine Interaktion zu li aufweist. Die Veränderung hinsichtlich der Abhängigkeit von der li kann nur durch die Stabilisierung der DQ-Untereinheiten erklärt werden. Eine Stabilisierung der beiden HLA-Untereinheiten könnte die Notwendigkeit eines Chaperons für den Transport herabsetzen.

Welcher Polymorphismus genau für den unterschiedlichen Transport von DQ-Allotypen verantwortlich ist, lässt sich nicht abschließend beantworten. Jedoch scheint die Besetzung einer Kombination mehrerer Schlüsselaminosäuren ausschlaggebend für die Transportfähigkeit zu sein.

### **5.3.2 Die extrazellulären Domänen sind entscheidend für den erfolgreichen Zusammenbau eines Heterodimers**

Die Arbeitsgruppe King führte Ergebnisse zum Zusammenbau der Heterodimere im ER durch und charakterisierte die Transmembranregion als wichtige Domäne für den Zusammenbau von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Subeinheiten (King & Dixon, 2010). Laut King sind die Transmembranregionen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette entscheidend für die Stabilisierung des Heterodimers verantwortlich. In einem überarbeiteten Modell zur Bildung des MHCII-li-Komplexes beschreibt King bedeutsame Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der TM-Domäne, die zusätzlich zur Stabilisierung des Heterodimers auch die Formierung des MHC-li-Komplexes einzuleiten vermögen. MHC-li-Komplexe, die das ER verlassen, bestehen überwiegend aus Untereinheiten eines Isotypens, also entweder DR oder DP oder DQ (Koch et al., 2007). Die Vermischung zweier Isotypen innerhalb eines Heterodimers hingegen ist sehr selten zu beobachten. Unter Berücksichtigung des Modells von King & Dixon würde demnach nahe liegen, dass die Transmembranregionen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette vom gleichen Isotypen stammen, um einen funktionellen Heterodimerrezeptor zu formen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit zu den chimären Fusionskonstrukten aus DR und DQ kann dieses erneuerte Modell von King nicht gestützt werden. Zu den transportkompetenten Rezeptoren der Ergebnisse dieser Arbeit zählte unter anderem die Kombination aus DR $\alpha$ 1/DQ $\alpha$ 2 und DRB1\*0101. DR $\alpha$ 1/DQ $\alpha$ 2 besitzt dabei, im Gegensatz zu der durchgängigen DR-Kette, eine DQ-spezifische TM-Domäne. Dieser Unterschied zwischen den TM-Domänen beider Subeinheiten des

---

Dimers führte trotzdem zu der Formation der li-HLA-Einheit und dem anschließenden Verlassen des ER.

Entgegen der Theorie von King & Dixon zeigten die Analysen der chimären Moleküle, dass es auch Kombinationen mit gleicher TM-Domäne gibt, die nicht transportkompetent sind und als nicht-funktionelle Peptidrezeptoren das ER nicht verlassen können. Auch die Tatsache, dass die DQ $\beta$ -Kette in Kombination mit einem beliebigen chimären Molekül keine Funktionsmerkmale eines intakten Heterodimers aufweist, deutet auf andere Mechanismen hin, die entscheidend für das funktionelle Zusammenlagern von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette sind oder zumindest zusätzlich eine wichtige Rolle bei diesem Auswahlprozess spielen. Die Daten dieser Arbeit bezüglich der chimären DR/DQ-Konstrukte stärken die Theorie, dass die entscheidenden Strukturen in den Domänen  $\alpha 1/\alpha 2$  und  $\beta 1/\beta 2$  vermutet werden können (Sant et al., 1991).

### 5.3.3 Einfluss des Polymorphismus der Aminosäuresequenz 65 bis 87 auf den Transport von Heterodimeren

Aufgrund des besonders stark ausgeprägten Polymorphismus im Bereich der Peptidbindegrube von Klasse-II-Molekülen wurde ein zusätzliches Fusionskonstrukt „DR/DQ“ getestet. Dieses chimäre Molekül wurde anhand der Vorbilder von HLA-DR und HLA-DQ synthetisiert. Im Vergleich zu dem domänenspezifisch Fusionskonstrukt „DR $\alpha 1$ /DQ $\alpha 2$ “ weist es eine unterschiedliche Aminosäuresequenz zwischen AS-Rest 71 bis 93 auf.

Nach der durchflusszytometrischen Analyse von „DR/DQ“ konnte das chimäre Molekül nur in Kombination mit DRB1\*0101 zur Zellmembran transportiert werden. In Kombination mit einem beliebigen chimären  $\beta$ -Molekül oder der DQ $\beta$ -Kette (DQB1\*0302) erfolgte kein erfolgreicher Zusammenbau eines Heterodimers, der mit dem Verlassen des ER einhergeht (siehe Abschnitt 4.4.3). Diesbezüglich konnte kein qualitativer Unterschied zwischen „DR/DQ“ und „DR $\alpha 1$ /DQ $\alpha 2$ “ gefunden werden. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurde jedoch eine bemerkenswerte Oberflächenexpression und nur geringe Abhängigkeit von der li beobachtet, die im Vergleich zu den übrigen getesteten chimären Molekülen und den Wildtypen DQ und DR besonders bemerkenswert ist (siehe Abschnitt 4.4.4). Die Sonderstellung von „DR/DQ“ in Kombination mit DRB1\*0101 zeigte sich auch nach Betrachtung der N-Glykanformen, da unabhängig von der Anwesenheit der li nach EndoH-Verdau total resistente Proteinbanden detektiert wurden. Diese Form des total-resistenten Heterodimers, bei der beide N-Glykane EndoH-resistent sind, beruht vermutlich auf einer veränderten

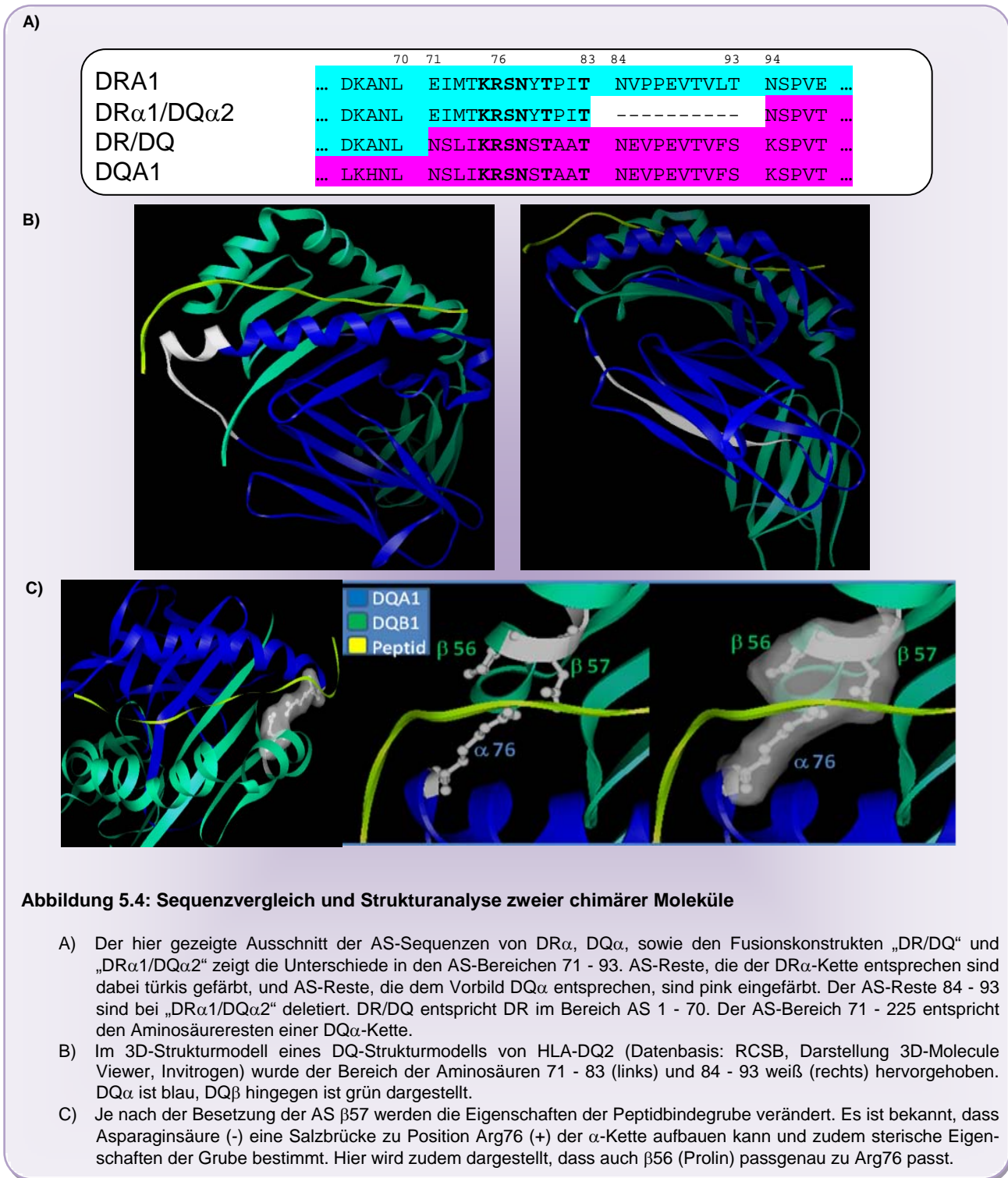
---

Konformation des HLA-Klasse-II-Moleküls und rechtfertigt die Frage nach der Fähigkeit des Dimers, Antigene zu binden und zu präsentieren, (Schaiff et al., 1991; siehe Abschnitt 4.4.4).

Bei einem Sequenzvergleich zwischen den chimären  $\alpha$ -Ketten „DR/DQ“ und „DR $\alpha$ 1 / DQ $\alpha$ 2“ in Abbildung 5.4.A lassen sich die Transportunterschiede der beiden Moleküle auf eine unterschiedliche AS-Sequenz im Sequenzbereich AS-Rest 71 - 93 zurückführen. Innerhalb der AS-Sequenz 71 - 83 sind sieben polymorphe AS-Reste erkennbar, die zwischen DR und DQ unterschiedlich sind. Eine weitere Erklärung ist die Deletion der AS 84 - 93 bei DR $\alpha$ 1/DQ $\alpha$ 2. Sowohl die Mutationen, als auch die Deletion der AS können zu den unterschiedlichen Funktionen führen. Der Aminosäurebereich 71 – 93 ist also für die Abhängigkeit von der Invarianten Kette sowie die Unterschiede hinsichtlich der Oberflächenexpression und Kohlenhydratreifung verantwortlich. Um diesen Bereich detaillierter zu untersuchen und spezifische Schlüsselaminosäuren zu identifizieren erfolgte die Analyse dieses Sequenzbereichs anhand eines 3D-Strukturmodells von HLA-DQ2 in Abbildung 5.4.B. Das linke Bild der Graphik zeigt mit weißer Markierung den Sequenzbereich 71 - 83, der sich durch einzelne Mutationen zwischen den beiden chimären  $\alpha$ -Ketten unterscheidet. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass dieser Bereich am Eingang der Peptidbindegrube liegt. Der Bereich der Deletion (AS 78 - 87) hingegen liegt nicht mehr in der Helixstruktur der Peptidbindegrube, sondern reicht in den Bereich einer Faltblattstruktur, die sich proximal zu der Grube des Dimers befindet. Auf Grund dieser Lokalisierung scheint besonders der mutierte Sequenzbereich eine wichtige Rolle zu spielen.

In Graphik 5.4.C ist dieser Bereich nochmals speziell hervorgehoben. Es bestätigt sich, dass die AS  $\beta$ 57, die eine tragende Rolle sowohl für die Prävention als auch für die Risikoerhöhung für T1D spielt, genau in dem hervorgehobenen Bereich liegt. Der AS-Rest  $\beta$ 57 (Asparaginsäure, Asp) trägt entscheidend für die Stabilität zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette bei (Ettinger et al., 2000). Je nachdem, ob an dieser Stelle in der Primärsequenz ein Asparaginsäurerest vorhanden ist, kann sich eine Salzbrücke zu  $\alpha$ 76 (Arginin, Arg) ausbilden (Stern et al., 1994). Bei Besetzung von  $\beta$ 57 mit einer anderen Aminosäure wie z.B. Alanin kommt die Verbindung zwischen den beiden DQ-Subeinheiten nicht zu stande. Auch die angrenzende Aminosäure  $\beta$ 56 (Prolin; Pro) führt zu einer Taschenbildung, so dass die konservierte AS Arg $\alpha$ 76 exakt eingepasst wird. Darüber hinaus ist die Position am Eingang der Grube im Bereich der Peptidbindetasche P9 entscheidend für die Bindung eines antigenen Peptids. Je nach Größe der Aminosäurereste der DQ $\beta$ -Kette im P9-Bereich, kann es aus sterischen Gründen zu einer Veränderung der Struktur des Grubeneingangs kommen, mit Folgen auch für die Bindung von spezifischen Peptiden (Kelly et al., 2002). Aufgrund der beschriebenen Interaktion in Bereich P9 zwischen der DQ $\alpha$ - und DQ $\beta$ -Untereinheit ist eine Stabilisierung des Heterodimers denkbar. Durch diese Stabilisierung könnte u.a. die erhöhte Oberflächenexpression erklärt werden, als auch die besondere Glykosylierungsform und die damit verbundene Faltung. Gleichzeitig ist dieser Bereich auch an der Interaktion zwischen

CLIP-Molekül bzw. Peptid und HLA-Molekül beteiligt. Dies könnte desweiteren einen Einfluss auf die Abhängigkeit von der Anwesenheit der li bedeuten.



Kwok et al. (1993) entwickelte chimäre Moleküle, die nach der Vorlage von DQB1\*0302 und DQB1\*01 entstanden sind. Eines der Konstrukte wurde nach dem Abbild der AS-Sequenz von DQB1\*0302 gefertigt, jedoch der AS-Bereich 60 - 91 wurde gemäß der DQB1\*01er-Untereinheit gefertigt. Ein zweites Konstrukt enthielt den Sequenzbereich 60 - 91 nach Vorlage von DQB1\*0302 und der restliche AS-Bereich wurde anhand DQB1\*01 hergestellt. Nach Koexpression dieser chimären Ketten mit den DQ $\alpha$ -Ketten 0501 bzw. 0301 (endogene Synthese) zeigte sich, dass nur ein Transport zur Zelloberfläche erfolgte, wenn die AS 60 - 91 der  $\beta$ -Ketten die Sequenz von DQB1\*0302 enthielten. Somit ist der Sequenzbereich 60 - 91 der DQB1\*03er Ketten entscheidend für einen erfolgreichen Zusammenbau der DQ-Heterodimere in Kombination mit DQB1\*0501 bzw. \*0301 (Kwok et al., 1993). Bei dem Abgleich dieser Ergebnisse mit einem 3D-Strukturmodell von HLA-DQ zeigt sich, dass die AS-Sequenz 60 - 91 der DQ $\beta$ -Kette den Großteil der Alpha-Helix der  $\beta$ 1-Domäne umfasst. Jedoch schließt diese Sequenz den Grubeneingang inklusive der DQ $\beta$ 57 nicht in die Analysen mit ein. Die chimären Moleküle, die in der Arbeit von Kwok et al. beschrieben werden, sind an dieser AS-Position identisch. Eine Interaktionen zwischen den Sequenzbereichen AS 60 - 91 der DQ $\beta$ -Kette und 71 - 93 der DQ $\alpha$ -Kette sind bisher nicht beschrieben. In Kombination mit den Ergebnissen dieser Arbeit, dass gerade der Bereich P9 des HLA-Moleküls inklusive der DQ $\beta$ 57 einen wichtigen Einfluss hat, deutet auf verschiedene Schlüssel-aminosäuren hin, die für den Zusammenbau eines DQ-Heterodimers und dessen Transportfähigkeit verantwortlich sind. Sehr wahrscheinlich jedoch ist die Tatsache, dass die entscheidenden AS dabei die polymorphen AS-Reste im peptidbindenden Bereich der Grube sind.

## 5.4 Ausblick

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit, sowie unter Berücksichtigung des aktuellen Kenntnisstandes der Literatur, ist eine erste Darstellung des Einflusses des Polymorphismus auf die Bildung von funktionellen HLA-DQ-Heterodimeren möglich.

Anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen zeigte sich, dass besonders anhand der Oberflächenexpression verschiedene Transporteigenschaften für die einzelnen Isotypen DR, DP und DQ zu erkennen sind. Um diese unterschiedlichen Transportraten zur Oberfläche zu ergänzen, wäre es wichtig, das Repertoire an Peptiden zu testen, das

auf der Zelloberfläche präsentiert werden kann. Erst nachdem eine mögliche Bindung von antigenen Peptiden nachgewiesen ist, kann eine vollständige Aussage hinsichtlich der Antigenpräsentationsfähigkeit abschließend getätigt werden.

Unter den Isotypen fiel vor allem HLA-DQ durch seine besondere Abhängigkeit zur Invarianten Kette auf. In Abwesenheit der Ii konnte gezeigt werden, dass auch nicht-kohlenhydratmodifizierte Heterodimere die Zelloberfläche erreichen. Die Fragestellung, ob diese Rezeptoren eine veränderte Konformation ohne die Ii aufweisen, und somit nicht durch die Enzyme des Golgi eine Reifung der N-Glykane erfahren, muss zukünftig nachgegangen werden.

Durch die Resultate der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass selbst innerhalb eines Isotypen  $\alpha/\beta$ -Allelkombinationen eine unterschiedlich starke Oberflächenexpression aufweisen. Darüber hinaus wird der Unterschied zwischen den verschiedenen Allelkombinationen von HLA-DQ durch die Tatsache belegt, dass ein Drittel der getesteten Allotypen nicht aus dem ER heraus transportiert wurden. Aufgrund der Tatsache, dass auch DR $\beta$ , DP $\alpha$  und DP $\beta$  polymorph sind, sollten gleiche Untersuchungen auch für diese Isotypen durchgeführt werden. Die damit gewonnen Ergebnisse könnten große Bedeutung im Rahmen der Entstehung von Krankheiten, aber auch für Transplantationen und Gewebeabstoßung haben.

Die Berechnungen zu den Häufigkeiten des Auftretens von Kopplungsungleichgewichten bei DQ-Haplotypen bestärken die experimentellen Ergebnisse. Die Analysen dieser Arbeit lassen die Annahme zu, dass alle Allelkombinationen, die in ethnischen Populationen mit einem stark positivem Kopplungsungleichgewicht gefunden werden, einen transportkompetenten DQ-Rezeptor ergeben. Es wäre sehr interessant diese Hypothese anhand weiterführender Untersuchungen zu prüfen. Weiterhin zeigen die negativen Kopplungsungleichgewichte für die nicht-funktionellen Allelkombinationen von HLA-DQ, dass es selektive Mechanismen gibt, die dazu führen, dass diese speziellen Klasse-II-Allelkombinationen in einem Haplotypen nicht dauerhaft in einer Ethnie vorkommen.

Aufgrund der Vielzahl an Erkrankungen, mit denen HLA-DQ assoziiert ist, sollte in Zukunft eine Untersuchung des Auftretens von nicht-funktionellen DQ-Allelkombinationen im Zusammenhang mit einem Risiko für Erkrankungen, intensiv verfolgt werden. Die Tatsache, dass nicht-transportkompetente Allele auf einem Chromosom bei einzelnen Individuen bestimmter ethnischer Populationen auftraten, zeigt die Möglichkeit, dass diese DQ-Defizienz für einzelne Menschen von Bedeutung sein könnte. Es ist notwendig, weiter nach nicht-funktionellen Allelkombinationen in ethnischen Populationen zu suchen. Bei gleichzeitigem Auftreten von spezifischen Erkrankungssymptomen in der gleichen Untersuchungsgruppe, müssten diese ersten Anzeichen einer weiteren Krankheitsassoziation durch HLA-DQ geprüft werden.

Um in Zukunft vorhersagen machen zu können, welche DQ-Untereinheiten assoziieren können, ist es wichtig die strukturellen Gründe für die Assoziation zu einem Dimer

aufzuklären. In den Struktur- und Sequenzanalysen von HLA-DQ und -DR zeigte sich, dass vor allem der Bereich der Peptidbindungsgrube einem starken Polymorphismus unterliegt. Gerade der Bereich, der den distalen Bereich der Alpha-Helix der Grube flankiert, scheint bedeutsam zur Ausbildung eines transportkompetenten Heterodimers zu sein. Um genauere Aussagen hinsichtlich dieser Schlüsselaminosäuren zu treffen sind unbedingt weitere Analysen notwendig.

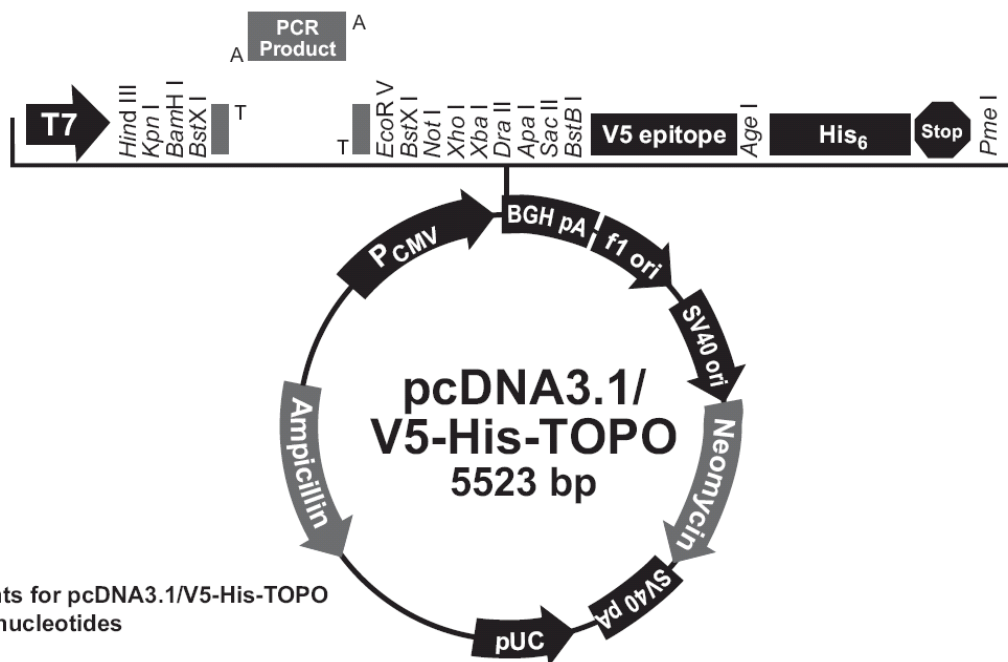


## Anhang

## pcDNA™ 3.1/V5-His-TOPO®

## Map

The figure below summarizes the features of the pcDNA™ 3.1/V5-His-TOPO® vector. The vector is supplied linearized between base pairs 953 and 954. This is the TOPO® Cloning site. The complete nucleotide sequence is available for downloading from [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) or from Technical Support (page 24).



Comments for pcDNA3.1/V5-His-TOPO  
5523 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863  
 T7 promoter/priming site: bases 863-882  
 Multiple cloning site: bases 902-1019  
 TOPO® Cloning site: 953-954  
 V5 epitope: bases 1020-1061  
 Polyhistidine tag: bases 1071-1088  
 BGH reverse priming site: bases 1111-1128  
 BGH polyadenylation signal: bases 1110-1324  
 f1 origin of replication: bases 1387-1800  
 SV40 promoter and origin: bases 1865-2190  
 Neomycin resistance gene: bases 2226-3020  
 SV40 polyadenylation signal: bases 3039-3277  
 pUC origin: bases 3709-4382  
 Ampicillin resistance gene: bases 4527-5387

## Abbildung 6.1: pcDNS 3.1.V5 HIS-Vektor

Quelle: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

Tabelle 6.1: Strukturelle Charakterisierung von HLA-DQ/-DR durch ExPASy.org

## DRA1\*010101

Molecule processing					
<input type="checkbox"/>	Signal peptide	1 – 25	25	<a href="#">Ref.11</a> <a href="#">Ref.12</a> <a href="#">Ref.13</a>	
<input type="checkbox"/>	Chain	26 – 254	229	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	PRO_0000018947
Regions					
<input type="checkbox"/>	Topological domain	26 – 216	191	Extracellular (Potential)	
<input type="checkbox"/>	Transmembrane	217 – 239	23	(Potential)	
<input type="checkbox"/>	Topological domain	240 – 254	15	Cytoplasmic (Potential)	
<input type="checkbox"/>	Domain	112 – 204	93	Ig-like C1-type	
<input type="checkbox"/>	Region	26 – 109	84	Alpha-1	
<input type="checkbox"/>	Region	110 – 203	94	Alpha-2	
<input type="checkbox"/>	Region	204 – 216	13	Connecting peptide	

## DRbeta 010101

Molecule processing					
<input checked="" type="checkbox"/>	Signal peptide	1 – 29	29	<a href="#">Ref.9</a>	
<input type="checkbox"/>	Chain	30 – 266	237	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-1 beta chain	PRO_0000018949
Regions					
<input type="checkbox"/>	Topological domain	30 – 227	198	Extracellular (Potential)	
<input checked="" type="checkbox"/>	Transmembrane	228 – 250	23	(Potential)	
<input type="checkbox"/>	Topological domain	251 – 266	16	Cytoplasmic (Potential)	
<input type="checkbox"/>	Domain	128 – 214	89	Ig-like C1-type	
<input checked="" type="checkbox"/>	Region	30 – 124	95	Beta-1	
<input checked="" type="checkbox"/>	Region	125 – 227	103	Beta-2	

## DQA1\*0501

Molecule processing					
<input type="checkbox"/>	Signal peptide	1 – 23	23	<a href="#">Ref.19</a>	
<input type="checkbox"/>	Chain	24 – 254	231	HLA class II histocompatibility antigen, DQ alpha 1 chain	PRO_0000018970
Regions					
<input type="checkbox"/>	Topological domain	24 – 216	193	Extracellular (Potential)	
<input type="checkbox"/>	Transmembrane	217 – 239	23	(Potential)	
<input type="checkbox"/>	Topological domain	240 – 254	15	Cytoplasmic	
<input type="checkbox"/>	Domain	112 – 204	93	Ig-like C1-type	
<input type="checkbox"/>	Region	24 – 119	96	Alpha-1	
<input type="checkbox"/>	Region	120 – 203	84	Alpha-2	
<input type="checkbox"/>	Region	204 – 216	13	Connecting peptide	

## DQB1\*0602

Molecule processing					
<input type="checkbox"/>	Signal peptide	1 – 32	32	<a href="#">Ref.5</a>	
<input type="checkbox"/>	Chain	33 – 261	229	HLA class II histocompatibility antigen, DQB1*0602 beta chain	PRO_0000018990
Regions					
<input type="checkbox"/>	Topological domain	33 – 230	198	Extracellular (Potential)	
<input type="checkbox"/>	Transmembrane	231 – 251	21	(Potential)	
<input type="checkbox"/>	Topological domain	252 – 261	10	Cytoplasmic (Potential)	
<input type="checkbox"/>	Domain	129 – 217	89	Ig-like C1-type	
<input type="checkbox"/>	Region	33 – 126	94	Beta-1	
<input type="checkbox"/>	Region	127 – 220	94	Beta-2	
<input type="checkbox"/>	Region	221 – 230	10	Connecting peptide	

Tabelle 6.2: Beschreibung einer DQ $\beta$ - Kette mit DR- Strukturmerkmalen

Kennzeichnung	HLA-Subtyp	Klonierungsvektor	„Tag“
DQB1*0302 Ile133Val; Arg137Lys; Asn142Gln	DQB1*030201 mit AS-Austausch (AS 133, 137, 142) von DRB1*010101	pcDNS3.1	12B8
<p>5´ - ATG TCT TGG AAG AAG GCT TTG CGG ATC CCT GGA GGC CTT CGG GTA GCA ACT GTG  ACC TTG ATG CTG GCG ATG CTG AGC ACC CCG GTG GCT GAG GGC AGA GAC TCT CCC GAG  GAT TTC GTG TAC CAG TTT AAG GGC ATG TGC TAC TTC ACC AAC GGG ACG GAG CGC GTG  CGT CTT GTG ACC AGA TAC ATC TAT AAC CGA GAG GAG TAC GCA CGC TTC GAC AGC GAC  GTG GGG GTG TAT CGG GCG GTG ACG CCG CTG GGG CCG CCT GCC GCC GAG TAC TGG AAC  AGC CAG AAG GAA GTC CTG GAG AGG ACC CGG GCG GAG TTG GAC ACG GTG TGC AGA CAC  AAC TAC CAG TTG GAG CTC CGC ACG ACC TTG CAG CGG CGA GTG GAG CCC ACA GTG ACC  <b>GTC</b> TCC CCA TCC <b>AAG</b> ACA GAG GCC CTC <b>CAG</b> CAC CAC AAC CTG CTG GTC TGC TCA GTG  ACA GAT TTC TAT CCA GCC CAG ATC AAA GTC CGG TGG TTT CGG AAT GAC CAG GAG GAG  ACA ACT GGC GTT GTG TCC ACC CCC CTT ATT AGG AAC GGT GAC TGG ACC TTC CAG ATC  CTG GTG ATG CTG GAA ATG ACT CCC CAG CGT GGA GAC GTC TAC ACC TGC CAC GTG GAG  CAC CCC AGC CTC CAG AAC CCC ATC ATC GTG GAG TGG CGG GCT CAG TCT GAA TCT GCC  CAG AGC AAG ATG CTG AGT GGC ATT GGA GGC TTC GTG CTG GGG CTG ATC TTC CTC GGG  CTG GGC CTT ATT ATC CAT CAC AGG AGT CAG AAA GGG CTC CTG CAC TGA - 3´</p> <p>MSWKKALRIPGGLRVATVTLMLAMLSTPVAEGRDSPEDFVYQFKGMCYFTNGTERVRLVTRYIYNREEYARFSDVGV  YRAVTPPLGPPAAEYWN SQKEVLERTRAE LDTVCRHNYQLELR TTTLQRRVEPTVT <b>V</b>SPSK<b>E</b>TEAL<b>Q</b>HHNLLVCSVTDFYP  AQIKVRWFRNDQEETTGVVSTPLIRNGDWT FQILVMLEMTPQRGDVYTCHVEHPSLQNP IIVEWRAQSESAQSKMLSG  IGGFVLGLIFLGLGLIIHRSQKGLLH*</p>			

Tabelle 6.3: Beschreibung der HLA-DQ/DR-Fusionskonstrukte

Kennzeichnung	HLA-Subtyp	Klonierungsvektor	Tag/Anhang
DR $\alpha$ (<95 AS) / DQ $\alpha$ (>96 AS)	DRA1*0101 (rot) + DQA1*0501	pcDNS3.1	12B8 Tag
<p>5' - ATG GCC ATA AGT GGA GTC CCT GTG CTA GGA TTT TTC ATC ATA GCT GTG CTG ATG AGC GCT CAG  GAA TCA TGG GCT ATC AAA GAA GAA CAT GTG ATC ATC CAG GCC GAG TTC TAT CTG AAT CCT GAC CAA  TCA GGC GAG TTT ATG TTT GAC TTT GAT GGT GAT GAG ATT TTC CAT GTG GAT ATG GCA AAG AAG GAG  ACG GTC TGG CGG CTT GAA GAA TTT GGA CGA TTT GCC AGC TTT GAG GCT CAA GGT GCA TTG GCC AAC  ATA GCT GTG GAC AAA GCC AAC CTG AAC AGT CTG ATT AAA CGC TCC AAC TCT ACC GCT ACC AAT  GAG GTT CCT GAG GTC ACA ATG TTT TCC AAG TCT CCC GTG ACA CTG GGT CAG CCC AAC ATC CTC ATC  TGT CTT GTG GAC AAC ATC TTT CCT CCT GTG GTC AAC ATC ACA TGG CTG AGC AAT GGG CAC TCA GTC  ACA GAA GGT GTT TCT GAG ACC AGC TTC CTC TCC AAG AGT GAT CAT TCC TTC AAG ATC AGT TAC  CTC ACC CTC CTC CCT TCT GCT GAG GAG AGT TAT GAC TGC AAG GTG GAG CAC TGG GGC CTG GAC AAG  CCT CTT CTG AAA CAC TGG GAG CCT GAG ATT CCA GCC CCT ATG TCA GAG CTC ACA GAG ACT GTG GTC  TGC GCC CTG GGA TTG TCT GTG GGC CTC GTG GGC ATT GTG GTG GGC ACT GTC TTC ATC ATC CGA GGC  CTG CGT TCA GTT GGT GCT TCC AGA CAC CAA GGG CCC TTG TGA - 3'</p> <p>MAISGVPVVLGFFIIAVLMSAQESWAIKEEHVIIQAEFYLNPDQSGEFMFDFDGDDEIFHVDMAKK  ETVWRLEEFGRFASF EAQ GALANIAVDKANLNSLIKRNSNSTAATNEVPEVTVFVFSKSPVTLGQPN  ILICLVDNIFPPVNVNITWLSNGHSVTEGVSETSFLSKSDHSFFKISYLTLLPSAEESYDCKVEH  WGLDKPLLLKHWEPEIPAPMSELTE TVVCALGLSVGLVGI VVGTVFIIRGLRSV GASR HQGPL*</p>			
DR $\alpha$ 1 / DQ $\alpha$ 2	DRA1*0101 (rot) + DQA1*0501	pcDNS3.1	12B8 Tag
<p>5' - ATG GCC ATA AGT GGA GTC CCT GTG CTA GGA TTT TTC ATC ATA GCT GTG CTG ATG AGC GCT CAG  GAA TCA TGG GCT ATC AAA GAA GAA CAT GTG ATC ATC CAG GCC GAG TTC TAT CTG AAT CCT GAC CAA  TCA GGC GAG TTT ATG TTT GAC TTT GAT GGT GAT GAG ATT TTC CAT GTG GAT ATG GCA AAG AAG GAG  ACG GTC TGG CGG CTT GAA GAA TTT GGA CGA TTT GCC AGC TTT GAG GCT CAA GGT GCA TTG GCC AAC  ATA GCT GTG GAC AAA GCC AAC CTG GAA ATC ATG ACA AAG CGC TCC AAC TAT ACT CCG ATC ACC AAT  TCT CCC GTG ACA CTG GGT CAG CCC AAC ATC CTC ATC TGT CTT GTG GAC AAC ATC TTT CCT CCT GTG  GTC AAC ATC ACA TGG CTG AGC AAT GGG CAC TCA GTC ACA GAA GGT GTT TCT GAG ACC AGC TTC CTC  TCC AAG AGT GAT CAT TCC TTC TCC AAG ATC AGT TAC CTC ACC CTC CTC CCT TCT GCT GAG GAG AGT  TAT GAC TGC AAG GTG GAG CAC TGG GGC CTG GAC AAG CCT CTT CTG AAA CAC TGG GAG CCT GAG ATT  CCA GCC CCT ATG TCA GAG CTC ACA GAG ACT GTG GTC TGC GCC CTG GGA TTG TCT GTG GGC CTC GTG  GGC ATT GTG GTG GGC ACT GTC TTC ATC ATC CGA GGC CTG CGT TCA GTT GGT GCT TCC AGA CAC CAA  GGG CCC TTG TGA - 3'</p> <p>MAISGVPVVLGFFIIAVLMSAQESWAIKEEHVIIQAEFYLNPDQSGEFMFDFDGDDEIFHVDMAKK  ETVWRLEEFGRFASF EAQ GALANIAVDKANLEIMTKRSNYTPITNSPVT LGQPNILICLVDNIF  PPVNVNITWLSNGHSVTEGVSETSFLSKSDHSFFKISYLTLLPSAEESYDCKVEHWGLDKPLLLKH  WEPEIPAPMSELTE TVVCALGLSVGLVGI VVGTVFIIRGLRSV GASR HQGPL*</p>			
DR $\beta$ 1 / DQ $\beta$ 2	DRB1*0101 (rot) + DQB1*0302	pcDNS3.1	Kein Tag
<p>5' - ATG GTG TGT CTG AAG CTC CCT GGA GGC TCC TGC ATG ACA GCG CTG ACA GTG ACA CTG ATG GTG  CTG AGC TCC CCA CTG GCT TTG GCT GGG GAC ACC CGA CCA CGT TTC TTG TGG CAG CTT AAG TTT GAA  TGT CAT TTC TTC AAT GGG ACG GAG GAG CGG GTG CGG TTG CTG GAA AGA TGC ATC TAT AAC CAA GAG GAG  TCC GTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG GAG TAC CGG GCG GTG ACG GAG CTG GGG CGG CCT GAT GCC  GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG GAC CTC CTG GAG CAG AGG CGG GCC GCG GTG GAC ACC TAC TGC AGA  CAC AAC TAC GGG GTT GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG CGG CGA GTT GTG GAG CCC ACA GTG ACC ATC  TCC CCA TCC AGG ACA GAG GCC CTC AAC CAC CAC AAC CTG CTG GTC TGC TCA GTG ACA GAT TTC TAT  CCA GCC CAG ATC AAA GTC CGG TGG TTT CGG AAT GAC CAG GAG GAG ACA ACT GGC GTT GTG TCC ACC  CCC CTT ATT AGG AAC GGT GAC TGG ACC TTC CAG ATC CTG GTG ATG CTG GAA ATG ACT CCC CAG CGT  GGA GAC GTC TAC ACC TGC CAC GTG GAG CAC CCC AGC CTC CAG AAC CCC ATC ATC GTG GAG TGG CGG  GCT CAG TCT GAA TCT GCC CAG AGC AAG ATG CTG AGT GGC ATT GGA GGC TTC GTG CTG GGG CTG ATC  TTC CTC GGG CTG GGC CTT ATT ATC CAT CAC AGG AGT CAG AAA GGG CTC CTG CAC TGA - 3'</p>			

MVCLKLPGGSCMTALTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLWQLKFECHFFNGTERVRLLERCIYNQE  
 ESVRFDSVDVGEYRAVTELRPDAEYWNSSQKDLLEQRRAAVDTYCRHNYGVGESFTVQRRVVEPT  
 VTISPSPRTEALNHHNLLVCSVTDIFYPAQIKVRWFRNDQEEETTGVVSTPLIRNGDWTFFQILVMLE  
 MTPQRGDVYTCHEHPSLQNP I IVEWRAQSESAQSKMLSGIGGFVVLGLIFLGLGLI IHHRSQKGL  
 LLH\*

DQ $\alpha$ 1 / DR $\alpha$ 2	DQA1*0501 + DRA1*0101 (rot)	pcDNS3.1	V5 His Tag
5' - ATG ATC CTA AAC AAA GCT CTG ATG CTG GGG GCC CTT GCC CTG ACC ACC GTG ATG AGC CCC TGT GGA GGT GAA GAC ATT GTG GCT GAC CAC GTC GCC TCT TAT GGT GTA AAC TTG TAC CAG TCT TAC GGT CCC TCT GGC CAG TAC ACC CAT GAA TTT GAT GGA GAT GAG CAG TTC TAC GTG GAC CTG GGG AGG AAG GAG ACT GTC TGG TGT TTG CCT GTT CTC AGA CAA TTT AGA TTT GAC CCG CAA TTT GCA CTG ACA AAC ATC GCT GTC CTA AAA CAT AAC TTG AAC AGT CTG ATT AAA CGC TCC AAC TCT ACC GCT GCT ACC AAT GAG GTT CCT GAG GTC ACA GTG TTT TCC AAG GTA CCT CCA GAG GTA ACT GTG CTC ACG AAC AGC CCT GTG GAA CTG AGA GAG CCC AAC GTC CTC ATC TGT TTC ATC GAC AAG TTC ACC CCA CCA GTG GTC AAT GTC ACG TGG CTT CGA AAT GGA AAA CCT GTC ACC ACA GGA GTG TCA GAG ACA GTC TTC CTG CCC AGG GAA GAC CAC CTT TTC CGC AAG TTC CAC TAT CTC CCC TTC CTG CCC TCA ACT GAG GAC GTT TAC GAC TGC AGG GTG GAG CAC TGG GGC TTG GAT GAG CCT CTT CTC AAG CAC TGG GAG TTT GAT GCT CCA AGC CCT CTC CCA GAG ACT ACA GAG AAC GTG GTG TGT GCC CTG GGC CTG ACT GTG GGT CTG GTG GGC ATC ATT ATT GGG ACC ATC TTC ATC ATC AAG GGA GTG CGC AAA AGC AAT GCA GCA GAA CGC AGG GGG CCT CTG TAA - 3'			

MILNKALMLGALALTTVMSPCGGEDIVADHVASYGVNLYQSYGPSGQYTHEFDGDEQFYVDLGR  
 KETVWCLPVLQRFRFDPPQFALTNIAVLKHNLSLIKRNSNSTAATNEVPEVTVFVSKVPPPEVTVLT  
 NSPVELREPNVLICFIDKFTPPVVNVTWLRNGKPVTTGVSETVFLPREDFHFRKFFHYLPFLPST  
 EDVYDCRVEHWGLDEPLLLKHWEFDAPSPLPETTENVCALGLLTVGLVGI I IGTIFI I KGVKRKSN  
 AAERRGPL\*

DQ $\beta$ 1 / DR $\beta$ 2	DQB1*0302 + DRB1*0101 (rot)	pcDNS3.1	6D4 Tag
5' - ATG TCT TGG AAG AAG GCT TTG CGG ATC CCT GGA GGC CTT CGG GTA GCA ACT GTG ACC TTG ATG CTG GCG ATG CTG AGC ACC CCG GTG GCT GAG GGC AGA GAC TCT CCC GAG GAT TTC GTG TAC CAG TTT AAG GGC ATG TGC TAC TTC ACC AAC GGG ACG GAG CGC GTG CGT CTT GTG ACC AGA TAC ATC TAT AAC CGA GAG GAG TAC GCA CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG GTG TAT CGG GCG GTG ACG CCG CTG GGG CCG CCT GCC GCC GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG GAA GTC CTG GAG AGG ACC CCG GCG GAG TTG GAC ACG GTG TGC AGA CAC AAC TAC CAG TTG GAG CTC CGC ACG ACC TTG CAG CGG CGA GAG CCT AAG GTG ACT GTG TAT CCT TCA AAG ACC CAG CCC CTG CAG CAC CAC AAC CTC CTG GTC TGC TCT GTG AGT GGT TTC TAT CCA GGC AGC ATT GAA GTC AGG TGG TTC CGG AAC GGC CAG GAA GAG AAG GCT GGG GTG GTG TCC ACA GGC CTG ATC CAG AAT GGA GAT TGG ACC TTC CAG ACC CTG GTG ATG CTG GAA ACA GTT CCT CGG AGT GGA GAG GTT TAC ACC TGC CAA GTG GAG CAC CCA AGT GTG ACG AGC CCT CTC ACA GTG GAA TGG AGA GCA CGG TCT GAA TCT GCA CAG AGC AAG ATG CTG AGT GGA GTC GGG GGT TTC GTG CTG GGC CTG CTC TTC CTT GGG GCC GGG CTG TTC ATC TAC TTC AGG AAT CAG AAA GGA CAC TCT GGA CTT CAG CCA ACA GGA TTC CTG AGC TGA - 3'			

MSWKKALRIPGGLRVATVTLMLAMLSTPVAEGRDSDPEDFVYQFKGMCYFTNGTERVRLVTRYIY  
 NREYARFDSVDVGYRAVTPPLGPPAAEYWNSSQKEVLERTRAELDTVCRHNYQLELRTTLQRRREP  
 KVTVPYPSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKAGVVSTGLIQNGDWTFFQTLVML  
 ETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVVLGLLFLGAGLFIYFRNQK  
 GHSGLQPTGFSL\*

Tabelle 6.4: Haplotypen und Kopplungsungleichgewicht innerhalb ethnischer Gruppen

Haplotyp HLA-DQ	Ethnik	n	Allel- frequenz DQA1	Allel- frequenz DQB1	Produkt DQ $\alpha$ /DQ $\beta$	Haplotypen- frequenz	Kopplung $\Delta$
DQA1*0101-DQB1*0501	India Northeast Mathur	155	4,80%	14,50%	0,70%	5,30%	4,60%
DQA1*0103-DQB1*0501	India Northeast Mathur	155	15,20%	14,50%	2,20%	3,30%	1,10%
DQA1*0103-DQB1*0503	India Northeast Mathur	155	15,20%	6,50%	0,99%	1,50%	0,51%
DQA1*0103-DQB1*0601	India Northeast Mathur	155	15,20%	19,30%	2,93%	2,10%	-0,83%
DQA1*0103-DQB1*0603	India Northeast Mathur	155	15,20%	4,80%	0,73%	1,30%	0,57%
DQA1*0104-DQB1*0501	India Northeast Mathur	155	13,60%	14,50%	1,97%	8,10%	6,13%
DQA1*0104-DQB1*0503	India Northeast Mathur	155	13,60%	6,50%	0,88%	2,50%	1,62%
DQA1*0201-DQB1*0201	India Northeast Mathur	155	24,80%	23,80%	5,90%	14,80%	8,90%
DQA1*0201-DQB1*0303	India Northeast Mathur	155	24,80%	8,40%	2,08%	5,10%	3,02%
DQA1*0301-DQB1*0302	India Northeast Mathur	155	12,90%	5,50%	0,71%	2,20%	1,49%
DQA1*0501-DQB1*0201	India Northeast Mathur	155	11,30%	23,80%	2,69%	4,50%	1,81%
DQA1*0501-DQB1*0301	India Northeast Mathur	155	11,30%	9,40%	1,06%	3,20%	2,14%
DQA1*0103-DQB1*0201	India Northeast Mathur	155	15,20%	23,80%	3,62%	0,00%	-3,62%
DQA1*0103-DQB1*0301	India Northeast Mathur	155	15,20%	9,40%	1,43%	0,00%	-1,43%
DQA1*0301-DQB1*0201	India Northeast Mathur	155	12,90%	23,80%	3,07%	1,90%	-1,17%
DQA1*0301-DQB1*0602	India Northeast Mathur	155	12,90%	2,60%	0,34%	0,00%	-0,34%
DQA1*0101-DQB1*0501	India Northeast Sunni	188	9,30%	17,30%	1,61%	1,60%	-0,01%
DQA1*0103-DQB1*0601	India Northeast Sunni	188	12,50%	13,50%	1,69%	2,70%	1,01%
DQA1*0103-DQB1*0603	India Northeast Sunni	188	12,50%	3,50%	0,44%	1,20%	0,76%
DQA1*0104-DQB1*0501	India Northeast Sunni	188	10,30%	17,30%	1,78%	4,20%	2,42%
DQA1*0201-DQB1*0201	India Northeast Sunni	188	18,10%	19,70%	3,57%	6,20%	2,63%
DQA1*0501-DQB1*0201	India Northeast Sunni	188	16,70%	19,70%	3,29%	3,30%	0,01%
DQA1*0501-DQB1*0301	India Northeast Sunni	188	16,70%	13,30%	2,22%	4,00%	1,78%
DQA1*0501-DQB1*0601	India Northeast Sunni	188	16,70%	13,50%	2,25%	1,50%	-0,75%
DQA1*0103-DQB1*0201	India Northeast Sunni	188	12,50%	19,70%	2,46%	0,00%	-2,46%
DQA1*0103-DQB1*0301	India Northeast Sunni	188	12,50%	13,30%	1,66%	0,00%	-1,66%
DQA1*0301-DQB1*0201	India Northeast Sunni	188	11,20%	19,70%	2,21%	1,20%	-1,01%
DQA1*0301-DQB1*0602	India Northeast Sunni	188	11,20%	1,30%	0,15%	0,00%	-0,15%
DQA1*0102-DQB1*0601	India Northeast Kayastha	190	9,20%	15,50%	1,43%	2,00%	0,57%
DQA1*0103-DQB1*0501	India Northeast Kayastha	190	16,00%	9,70%	1,55%	3,10%	1,55%
DQA1*0103-DQB1*0601	India Northeast Kayastha	190	16,00%	15,50%	2,48%	5,60%	3,12%
DQA1*0103-DQB1*0603	India Northeast Kayastha	190	16,00%	7,90%	1,26%	2,60%	1,34%
DQA1*0104-DQB1*0501	India Northeast Kayastha	190	4,60%	9,70%	0,45%	3,40%	2,95%
DQA1*0104-DQB1*0503	India Northeast Kayastha	190	4,60%	6,30%	0,29%	2,20%	1,91%
DQA1*0201-DQB1*0201	India Northeast Kayastha	190	27,60%	23,90%	6,60%	12,00%	5,40%
DQA1*0201-DQB1*0303	India Northeast Kayastha	190	27,60%	10,30%	2,84%	4,20%	1,36%
DQA1*0501-DQB1*0201	India Northeast Kayastha	190	13,90%	23,90%	3,32%	4,90%	1,58%
DQA1*0501-DQB1*0301	India Northeast Kayastha	190	13,90%	13,70%	1,90%	3,60%	1,70%
DQA1*0601-DQB1*0301	India Northeast Kayastha	190	1,60%	13,70%	0,22%	1,50%	1,28%
DQA1*0103-DQB1*0201	India Northeast Kayastha	190	16,00%	23,90%	3,82%	0,00%	-3,82%
DQA1*0103-DQB1*0301	India Northeast Kayastha	190	16,00%	13,70%	2,19%	0,00%	-2,19%
DQA1*0301-DQB1*0201	India Northeast Kayastha	190	15,50%	23,90%	3,70%	1,80%	-1,90%

DQA1*0301-DQB1*0602	India Northeast Kayastha	190	15,50%	3,90%	0,60%	0,00%	-0,60%
DQA1*0101-DQB1*0301	India Northeast Shia	190	16,00%	14,20%	2,27%	1,30%	-0,97%
DQA1*0101-DQB1*0501	India Northeast Shia	190	16,00%	15,20%	2,43%	2,80%	0,37%
DQA1*0103-DQB1*0603	India Northeast Shia	190	14,70%	3,40%	0,50%	1,80%	1,30%
DQA1*0104-DQB1*0501	India Northeast Shia	190	5,50%	15,20%	0,84%	2,60%	1,76%
DQA1*0201-DQB1*0201	India Northeast Shia	190	18,70%	21,30%	3,98%	6,20%	2,22%
DQA1*0201-DQB1*0303	India Northeast Shia	190	18,70%	9,50%	1,78%	1,80%	0,02%
DQA1*0501-DQB1*0201	India Northeast Shia	190	12,90%	21,30%	2,75%	3,30%	0,55%
DQA1*0501-DQB1*0301	India Northeast Shia	190	12,90%	14,20%	1,83%	2,80%	0,97%
DQA1*0501-DQB1*0601	India Northeast Shia	190	12,90%	11,60%	1,50%	1,50%	0,00%
DQA1*0601-DQB1*0301	India Northeast Shia	190	11,30%	14,20%	1,60%	1,50%	-0,10%
DQA1*0103-DQB1*0201	India Northeast Shia	190	14,70%	21,30%	3,13%	0,00%	-3,13%
DQA1*0103-DQB1*0301	India Northeast Shia	190	14,70%	14,20%	2,09%	0,00%	-2,09%
DQA1*0301-DQB1*0201	India Northeast Shia	190	9,50%	21,30%	2,02%	0,00%	-2,02%
DQA1*0301-DQB1*0602	India Northeast Shia	190	9,50%	2,40%	0,23%	0,00%	-0,23%
DQA1*0101-DQB1*0501	India Northeast Rastogi	196	7,40%	12,20%	0,90%	1,70%	0,80%
DQA1*0102-DQB1*0601	India Northeast Rastogi	196	9,70%	16,10%	1,56%	4,60%	3,04%
DQA1*0103-DQB1*0501	India Northeast Rastogi	196	14,80%	12,20%	1,81%	2,30%	0,49%
DQA1*0103-DQB1*0601	India Northeast Rastogi	196	14,80%	16,10%	2,38%	4,00%	1,62%
DQA1*0103-DQB1*0603	India Northeast Rastogi	196	14,80%	4,10%	0,61%	2,10%	1,49%
DQA1*0104-DQB1*0501	India Northeast Rastogi	196	10,20%	12,20%	1,24%	6,80%	5,56%
DQA1*0104-DQB1*0503	India Northeast Rastogi	196	10,20%	8,30%	0,85%	1,00%	0,15%
DQA1*0201-DQB1*0201	India Northeast Rastogi	196	23,70%	26,50%	6,28%	9,40%	3,12%
DQA1*0201-DQB1*0303	India Northeast Rastogi	196	23,70%	10,70%	2,54%	4,00%	1,46%
DQA1*0301-DQB1*0302	India Northeast Rastogi	196	14,80%	3,10%	0,46%	1,00%	0,54%
DQA1*0501-DQB1*0201	India Northeast Rastogi	196	12,20%	26,50%	3,23%	3,80%	0,57%
DQA1*0501-DQB1*0301	India Northeast Rastogi	196	12,20%	9,70%	1,18%	3,30%	2,12%
DQA1*0601-DQB1*0301	India Northeast Rastogi	196	2,80%	9,70%	0,27%	1,70%	1,43%
DQA1*0103-DQB1*0201	India Northeast Rastogi	196	14,80%	26,50%	3,92%	0,00%	-3,92%
DQA1*0103-DQB1*0301	India Northeast Rastogi	196	14,80%	9,70%	1,44%	0,00%	-1,44%
DQA1*0301-DQB1*0201	India Northeast Rastogi	196	14,80%	26,50%	3,92%	1,70%	-2,22%
DQA1*0301-DQB1*0602	India Northeast Rastogi	196	14,80%	3,10%	0,46%	0,00%	-0,46%
DQA1*0101-DQB1*0501	India Northeast Vaish	198	4,80%	17,90%	0,86%	2,00%	1,14%
DQA1*0102-DQB1*0601	India Northeast Vaish	198	15,60%	10,40%	1,62%	2,00%	0,38%
DQA1*0103-DQB1*0501	India Northeast Vaish	198	11,10%	17,90%	1,99%	2,80%	0,81%
DQA1*0103-DQB1*0601	India Northeast Vaish	198	11,10%	10,40%	1,15%	5,60%	4,45%
DQA1*0104-DQB1*0501	India Northeast Vaish	198	15,20%	17,90%	2,72%	3,50%	0,78%
DQA1*0104-DQB1*0503	India Northeast Vaish	198	15,20%	7,60%	1,16%	1,70%	0,54%
DQA1*0201-DQB1*0201	India Northeast Vaish	198	20,90%	17,40%	3,64%	12,60%	8,96%
DQA1*0201-DQB1*0303	India Northeast Vaish	198	20,90%	9,30%	1,94%	6,30%	4,36%
DQA1*0501-DQB1*0201	India Northeast Vaish	198	16,60%	17,40%	2,89%	3,30%	0,41%
DQA1*0501-DQB1*0301	India Northeast Vaish	198	16,60%	15,20%	2,52%	3,70%	1,18%
DQA1*0103-DQB1*0201	India Northeast Vaish	198	11,10%	17,40%	1,93%	0,00%	-1,93%
DQA1*0103-DQB1*0301	India Northeast Vaish	198	11,10%	15,20%	1,69%	0,00%	-1,69%
DQA1*0301-DQB1*0201	India Northeast Vaish	198	10,10%	17,40%	1,76%	2,20%	0,44%
DQA1*0301-DQB1*0602	India Northeast Vaish	198	10,10%	4,00%	0,40%	0,00%	-0,40%

DQA1*0102-DQB1*0601	India Uttar Pradesh Hindu	202	15,30%	15,10%	2,31%	4,10%	1,79%
DQA1*0102-DQB1*0603	India Uttar Pradesh Hindu	202	15,30%	7,60%	1,16%	1,60%	0,44%
DQA1*0102-DQB1*0604	India Uttar Pradesh Hindu	202	15,30%	2,50%	0,38%	1,60%	1,22%
DQA1*0103-DQB1*0601	India Uttar Pradesh Hindu	202	13,80%	15,10%	2,08%	5,60%	3,52%
DQA1*0103-DQB1*0603	India Uttar Pradesh Hindu	202	13,80%	7,60%	1,05%	3,50%	2,45%
DQA1*0104-DQB1*0501	India Uttar Pradesh Hindu	202	14,10%	11,90%	1,68%	8,90%	7,22%
DQA1*0104-DQB1*0503	India Uttar Pradesh Hindu	202	14,10%	6,40%	0,90%	2,20%	1,30%
DQA1*0201-DQB1*0201	India Uttar Pradesh Hindu	202	18,30%	21,50%	3,93%	12,80%	8,87%
DQA1*0201-DQB1*0303	India Uttar Pradesh Hindu	202	18,30%	6,70%	1,23%	5,20%	3,97%
DQA1*0301-DQB1*0302	India Uttar Pradesh Hindu	202	10,60%	5,00%	0,53%	2,00%	1,47%
DQA1*0501-DQB1*0201	India Uttar Pradesh Hindu	202	19,00%	21,50%	4,09%	4,80%	0,72%
DQA1*0501-DQB1*0301	India Uttar Pradesh Hindu	202	19,00%	14,60%	2,77%	8,50%	5,73%
DQA1*0601-DQB1*0301	India Uttar Pradesh Hindu	202	2,70%	14,60%	0,39%	2,00%	1,61%
DQA1*0103-DQB1*0201	India Uttar Pradesh Hindu	202	13,80%	21,50%	2,97%	0,00%	-2,97%
DQA1*0103-DQB1*0301	India Uttar Pradesh Hindu	202	13,80%	14,60%	2,01%	0,00%	-2,01%
DQA1*0301-DQB1*0201	India Uttar Pradesh Hindu	202	10,60%	21,50%	2,28%	0,00%	-2,28%
DQA1*0301-DQB1*0602	India Uttar Pradesh Hindu	202	10,60%	3,20%	0,34%	0,00%	-0,34%
DQA1*0101-DQB1*0501-	South Korea pop 2	207	8,00%	10,10%	0,81%	6,90%	6,09%
DQA1*0102-DQB1*0602-	South Korea pop 2	207	17,60%	8,50%	1,50%	4,70%	3,20%
DQA1*0102-DQB1*0604-	South Korea pop 2	207	17,60%	6,50%	1,14%	5,70%	4,56%
DQA1*0102-DQB1*0609-	South Korea pop 2	207	17,60%	2,40%	0,42%	1,20%	0,78%
DQA1*0103-DQB1*0601	South Korea pop 2	207	9,70%	8,20%	0,80%	6,60%	5,80%
DQA1*0104-DQB1*0503	South Korea pop 2	207	7,20%	5,30%	0,38%	3,00%	2,62%
DQA1*0105-DQB1*0501-	South Korea pop 2	207	2,20%	10,10%	0,22%	1,20%	0,98%
DQA1*0201-DQB1*0202-	South Korea pop 2	207	7,00%	6,50%	0,46%	5,10%	4,65%
DQA1*0301-DQB1*0302-	South Korea pop 2	207	8,70%	9,90%	0,86%	5,20%	4,34%
DQA1*0302-DQB1*0303-	South Korea pop 2	207	9,90%	10,90%	1,08%	6,20%	5,12%
DQA1*0303-DQB1*0401-	South Korea pop 2	207	11,60%	8,50%	0,99%	1,50%	0,51%
DQA1*0303-DQB1*0401-	South Korea pop 2	207	11,60%	8,50%	0,99%	6,20%	5,21%
DQA1*0501-DQB1*0201	South Korea pop 2	207	1,70%	1,70%	0,03%	1,20%	1,17%
DQA1*0505-DQB1*0301-	South Korea pop 2	207	8,70%	14,50%	1,26%	4,70%	3,44%
DQA1*0601-DQB1*0301-	South Korea pop 2	207	8,70%	14,50%	1,26%	2,90%	1,64%
DQA1*0103-DQB1*0201	South Korea pop 2	207	9,70%	1,70%	0,16%	0,00%	-0,16%
DQA1*0103-DQB1*0301	South Korea pop 2	207	9,70%	14,50%	1,41%	0,00%	-1,41%
DQA1*0301-DQB1*0201	South Korea pop 2	207	8,70%	1,70%	0,15%	0,00%	-0,15%
DQA1*0301-DQB1*0602	South Korea pop 2	207	8,70%	8,50%	0,74%	0,00%	-0,74%
DQA1*0101-DQB1*0501	South Korea pop 1	324	7,60%	8,80%	0,67%	11,20%	10,53%
DQA1*0102-DQB1*0502	South Korea pop 1	324	20,20%	5,20%	1,05%	1,50%	0,45%
DQA1*0102-DQB1*0602	South Korea pop 1	324	20,20%	7,40%	1,49%	12,60%	11,11%
DQA1*0102-DQB1*0604	South Korea pop 1	324	20,20%	6,30%	1,27%	9,60%	8,33%
DQA1*0102-DQB1*0605	South Korea pop 1	324	20,20%	4,00%	0,81%	5,90%	5,09%
DQA1*0103-DQB1*0601	South Korea pop 1	324	11,10%	10,30%	1,14%	16,90%	15,76%
DQA1*0103-DQB1*0603	South Korea pop 1	324	11,10%	1,10%	0,12%	1,10%	0,98%
DQA1*0104-DQB1*0502	South Korea pop 1	324	6,30%	5,20%	0,33%	4,70%	4,37%
DQA1*0104-DQB1*0503	South Korea pop 1	324	6,30%	3,10%	0,20%	3,90%	3,70%
DQA1*0105-DQB1*0501	South Korea pop 1	324	1,20%	8,80%	0,11%	1,20%	1,09%



DQA1*0201-DQB1*0202	South Korea pop 1	324	5,60%	5,40%	0,30%	8,00%	7,70%
DQA1*0301-DQB1*0302	South Korea pop 1	324	9,70%	10,20%	0,99%	14,00%	13,01%
DQA1*0302-DQB1*0303	South Korea pop 1	324	9,70%	10,50%	1,02%	15,40%	14,38%
DQA1*0303-DQB1*0401	South Korea pop 1	324	11,30%	7,70%	0,87%	14,10%	13,23%
DQA1*0303-DQB1*0402	South Korea pop 1	324	11,30%	3,90%	0,44%	3,10%	2,66%
DQA1*0501-DQB1*0201	South Korea pop 1	324	3,10%	2,90%	0,09%	3,70%	3,61%
DQA1*0505-DQB1*0301	South Korea pop 1	324	6,80%	12,80%	0,87%	8,30%	7,43%
DQA1*0601-DQB1*0301	South Korea pop 1	324	3,40%	12,80%	0,44%	3,40%	2,96%
DQA1*0103-DQB1*0201	South Korea pop 1	324	11,10%	2,90%	0,32%	0,00%	-0,32%
DQA1*0103-DQB1*0301	South Korea pop 1	324	11,10%	12,80%	1,42%	0,00%	-1,42%
DQA1*0301-DQB1*0201	South Korea pop 1	324	9,70%	2,90%	0,28%	0,00%	-0,28%
DQA1*0301-DQB1*0602	South Korea pop 1	324	9,70%	7,40%	0,72%	0,00%	-0,72%
DQA1*0101-DQB1*0501	Japan pop2	916	12,30%	5,40%	0,66%	4,60%	3,94%
DQA1*0101-DQB1*0502	Japan pop2	916	12,30%	2,30%	0,28%	1,80%	1,52%
DQA1*0101-DQB1*0503	Japan pop2	916	12,30%	5,00%	0,62%	4,80%	4,19%
DQA1*0102-DQB1*0602	Japan pop2	916	12,10%	6,00%	0,73%	5,60%	4,87%
DQA1*0102-DQB1*0604	Japan pop2	916	12,10%	5,00%	0,61%	4,80%	4,20%
DQA1*0103-DQB1*0601	Japan pop2	916	16,90%	16,10%	2,72%	15,60%	12,88%
DQA1*0301-DQB1*0301	Japan pop2	916	42,30%	13,10%	5,54%	1,10%	-4,44%
DQA1*0301-DQB1*0302	Japan pop2	916	42,30%	11,80%	4,99%	14,30%	9,31%
DQA1*0301-DQB1*0303	Japan pop2	916	42,30%	11,20%	4,74%	10,80%	6,06%
DQA1*0301-DQB1*0401	Japan pop2	916	42,30%	15,10%	6,39%	14,70%	8,31%
DQA1*0301-DQB1*0402	Japan pop2	916	42,30%	4,30%	1,82%	1,70%	-0,12%
DQA1*0401-DQB1*0402	Japan pop2	916	3,10%	4,30%	0,13%	2,30%	2,17%
DQA1*0501-DQB1*0301	Japan pop2	916	8,70%	13,10%	1,14%	8,10%	6,96%
DQA1*0601-DQB1*0301	Japan pop2	916	3,10%	13,10%	0,41%	2,30%	1,89%
DQA1*0103-DQB1*0201	Japan pop2	916	16,90%	1,00%	0,17%	0,00%	-0,17%
DQA1*0103-DQB1*0301	Japan pop2	916	16,90%	13,10%	2,21%	0,00%	-2,21%
DQA1*0301-DQB1*0201	Japan pop2	916	42,30%	1,00%	0,42%	0,00%	-0,42%
DQA1*0301-DQB1*0602	Japan pop2	916	42,30%	6,00%	2,54%	0,00%	-2,54%
DQA1*0101-DQB1*0501-	China Canton Han	264	9,80%	3,40%	0,33%	1,30%	0,97%
DQA1*0101-DQB1*0502-	China Canton Han	264	9,80%	11,00%	1,08%	4,90%	3,82%
DQA1*0102-DQB1*0601-	China Canton Han	264	20,10%	11,20%	2,25%	2,70%	0,45%
DQA1*0102-DQB1*0602-	China Canton Han	264	20,10%	3,80%	0,76%	2,50%	1,74%
DQA1*0102-DQB1*0609-	China Canton Han	264	20,10%	1,90%	0,38%	1,10%	0,72%
DQA1*0103-DQB1*0601	China Canton Han	264	6,60%	11,20%	0,74%	3,70%	2,96%
DQA1*0201-DQB1*0201-	China Canton Han	264	5,70%	12,10%	0,69%	4,40%	3,71%
DQA1*0301-DQB1*0302-	China Canton Han	264	26,70%	7,00%	1,87%	3,60%	1,73%
DQA1*0301-DQB1*0303-	China Canton Han	264	26,70%	15,00%	4,01%	13,10%	9,10%
DQA1*0301-DQB1*0401-	China Canton Han	264	26,70%	4,00%	1,07%	2,20%	1,13%
DQA1*0501-DQB1*0201-	China Canton Han	264	18,40%	12,10%	2,23%	4,50%	2,27%
DQA1*0501-DQB1*0301-	China Canton Han	264	18,40%	24,20%	4,45%	6,70%	2,25%
DQA1*0601-DQB1*0301-	China Canton Han	264	12,10%	24,20%	2,93%	10,80%	7,87%
DQA1*0103-DQB1*0201	China Canton Han	264	6,60%	12,10%	0,80%	0,00%	-0,80%
DQA1*0103-DQB1*0301	China Canton Han	264	6,60%	24,20%	1,60%	0,00%	-1,60%
DQA1*0301-DQB1*0201	China Canton Han	264	26,70%	12,10%	3,23%	0,00%	-3,23%

DQA1*0301-DQB1*0602	China Canton Han	264	26,70%	3,80%	1,01%	0,00%	-1,01%
Haplotyp HLA-DQ	Ethnik	n	Allel- frequenz DQA1	Allel- frequenz DQB1	Produkt DQ $\alpha$ /DQ $\beta$	Haplotypen- frequenz	Kopplung $\Delta$
DQA1*0101-DQB1*0501	Mexico Highlands Mestizos	160	9,40%	8,10%	0,76%	6,60%	5,84%
DQA1*0101-DQB1*0503	Mexico Highlands Mestizos	160	9,40%	1,60%	0,15%	1,30%	1,15%
DQA1*0102-DQB1*0602	Mexico Highlands Mestizos	160	9,40%	6,90%	0,65%	5,30%	4,65%
DQA1*0102-DQB1*0604	Mexico Highlands Mestizos	160	9,40%	1,60%	0,15%	1,60%	1,45%
DQA1*0103-DQB1*0603	Mexico Highlands Mestizos	160	3,10%	1,90%	0,06%	1,60%	1,54%
DQA1*0201-DQB1*0201	Mexico Highlands Mestizos	160	7,20%	10,60%	0,76%	5,90%	5,14%
DQA1*0201-DQB1*0303	Mexico Highlands Mestizos	160	7,20%	1,30%	0,09%	1,30%	1,21%
DQA1*0301-DQB1*0301	Mexico Highlands Mestizos	160	28,80%	24,70%	7,11%	1,30%	-5,81%
DQA1*0301-DQB1*0302	Mexico Highlands Mestizos	160	28,80%	26,60%	7,66%	26,00%	18,34%
DQA1*0401-DQB1*0402	Mexico Highlands Mestizos	160	15,00%	15,00%	2,25%	15,40%	13,15%
DQA1*0501-DQB1*0201	Mexico Highlands Mestizos	160	15,00%	10,60%	1,59%	4,10%	2,51%
DQA1*0501-DQB1*0301	Mexico Highlands Mestizos	160	27,20%	24,70%	6,72%	21,00%	14,28%
DQA1*0103-DQB1*0201	Mexico Highlands Mestizos	160	3,10%	10,60%	0,33%	0,00%	-0,33%
DQA1*0103-DQB1*0301	Mexico Highlands Mestizos	160	3,10%	24,70%	0,77%	0,00%	-0,77%
DQA1*0301-DQB1*0201	Mexico Highlands Mestizos	160	28,80%	10,60%	3,05%	0,00%	-3,05%
DQA1*0301-DQB1*0602	Mexico Highlands Mestizos	160	28,80%	6,90%	1,99%	0,00%	-1,99%
Haplotyp HLA-DQ	Ethnik	n	Allel- frequenz DQA1	Allel- frequenz DQB1	Produkt DQ $\alpha$ /DQ $\beta$	Haplotypen- frequenz	Kopplung $\Delta$
DQA1*0101-DQB1*0501	Russia Northwest Slavic	200	15,50%	13,00%	2,02%	12,00%	9,99%
DQA1*0102-DQB1*0502	Russia Northwest Slavic	200	18,50%	6,50%	1,20%	5,50%	4,30%
DQA1*0102-DQB1*0602	Russia Northwest Slavic	200	18,50%	9,50%	1,76%	9,00%	7,24%
DQA1*0102-DQB1*0604	Russia Northwest Slavic	200	18,50%	3,50%	0,65%	3,00%	2,35%
DQA1*0103-DQB1*0601	Russia Northwest Slavic	200	8,50%	1,50%	0,13%	1,00%	0,87%
DQA1*0103-DQB1*0603	Russia Northwest Slavic	200	8,50%	6,00%	0,51%	5,50%	4,99%
DQA1*0201-DQB1*0201	Russia Northwest Slavic	200	10,50%	17,50%	1,84%	8,00%	6,16%
DQA1*0201-DQB1*0303	Russia Northwest Slavic	200	10,50%	5,00%	0,53%	2,50%	1,98%
DQA1*0301-DQB1*0301	Russia Northwest Slavic	200	16,00%	20,00%	3,20%	2,00%	-1,20%
DQA1*0301-DQB1*0302	Russia Northwest Slavic	200	16,00%	11,00%	1,76%	9,00%	7,24%
DQA1*0301-DQB1*0303	Russia Northwest Slavic	200	16,00%	5,00%	0,80%	2,00%	1,20%
DQA1*0401-DQB1*0402	Russia Northwest Slavic	200	4,50%	4,00%	0,18%	4,00%	3,82%
DQA1*0501-DQB1*0201	Russia Northwest Slavic	200	26,50%	17,50%	4,64%	9,00%	4,36%
DQA1*0501-DQB1*0301	Russia Northwest Slavic	200	26,50%	20,00%	5,30%	15,50%	10,20%
DQA1*0103-DQB1*0201	Russia Northwest Slavic	200	8,50%	17,50%	1,49%	0,00%	-1,49%

DQA1*0103-DQB1*0301	Russia Northwest Slavic	200	8,50%	20,00%	1,70%	0,00%	-1,70%
DQA1*0301-DQB1*0201	Russia Northwest Slavic	200	16,00%	17,50%	2,80%	0,00%	-2,80%
DQA1*0301-DQB1*0602	Russia Northwest Slavic	200	16,00%	9,50%	1,52%	0,00%	-1,52%
DQA1*0101-DQB1*0501	Russia Tuva pop 2	169	11,60%	6,20%	0,72%	6,20%	5,48%
DQA1*0101-DQB1*0502	Russia Tuva pop 2	169	11,60%	3,00%	0,35%	2,30%	1,95%
DQA1*0101-DQB1*0503	Russia Tuva pop 2	169	11,60%	3,00%	0,35%	3,00%	2,65%
DQA1*0102-DQB1*0602	Russia Tuva pop 2	169	18,00%	11,50%	2,07%	11,50%	9,43%
DQA1*0102-DQB1*0604	Russia Tuva pop 2	169	18,00%	1,80%	0,32%	1,80%	1,48%
DQA1*0103-DQB1*0601	Russia Tuva pop 2	169	10,10%	4,70%	0,47%	4,70%	4,23%
DQA1*0103-DQB1*0603	Russia Tuva pop 2	169	10,10%	5,30%	0,54%	5,30%	4,76%
DQA1*0201-DQB1*0201	Russia Tuva pop 2	169	8,90%	13,00%	1,16%	6,80%	5,64%
DQA1*0201-DQB1*0303	Russia Tuva pop 2	169	8,90%	8,00%	0,71%	2,10%	1,39%
DQA1*0301-DQB1*0301	Russia Tuva pop 2	169	20,10%	26,60%	5,35%	6,00%	0,65%
DQA1*0301-DQB1*0302	Russia Tuva pop 2	169	20,10%	4,40%	0,88%	4,40%	3,52%
DQA1*0301-DQB1*0303	Russia Tuva pop 2	169	20,10%	8,00%	1,61%	5,00%	3,39%
DQA1*0301-DQB1*0401	Russia Tuva pop 2	169	20,10%	3,20%	0,64%	3,20%	2,56%
DQA1*0401-DQB1*0402	Russia Tuva pop 2	169	4,40%	4,70%	0,21%	4,40%	4,19%
DQA1*0501-DQB1*0201	Russia Tuva pop 2	169	26,00%	13,00%	3,38%	5,20%	1,82%
DQA1*0501-DQB1*0301	Russia Tuva pop 2	169	26,00%	26,60%	6,92%	20,20%	13,28%
DQA1*0103-DQB1*0201	Russia Tuva pop 2	169	10,10%	13,00%	1,31%	0,00%	-1,31%
DQA1*0103-DQB1*0301	Russia Tuva pop 2	169	10,10%	26,60%	2,69%	0,00%	-2,69%
DQA1*0301-DQB1*0201	Russia Tuva pop 2	169	20,10%	13,00%	2,61%	0,00%	-2,61%
DQA1*0301-DQB1*0602	Russia Tuva pop 2	169	20,10%	11,50%	2,31%	0,00%	-2,31%
DQA1*0101-DQB1*0501	Spain Murcia	173	15,50%	15,90%	2,46%	1,50%	-0,96%
DQA1*0102-DQB1*0602	Spain Murcia	173	12,00%	4,80%	0,58%	1,90%	1,32%
DQA1*0103-DQB1*0603	Spain Murcia	173	10,70%	8,70%	0,93%	1,90%	0,97%
DQA1*0201-DQB1*0202	Spain Murcia	173	17,50%	17,50%	3,06%	6,60%	3,54%
DQA1*0301-DQB1*0302	Spain Murcia	173	11,10%	11,10%	1,23%	1,50%	0,27%
DQA1*0501-DQB1*0201	Spain Murcia	173	28,20%	12,30%	3,47%	5,80%	2,33%
DQA1*0103-DQB1*0201	Spain Murcia	173	10,70%	12,30%	1,32%	0,00%	-1,32%
DQA1*0103-DQB1*0301	Spain Murcia	173	10,70%	16,70%	1,79%	0,00%	-1,79%
DQA1*0301-DQB1*0201	Spain Murcia	173	11,10%	12,30%	1,37%	0,00%	-1,37%
DQA1*0301-DQB1*0602	Spain Murcia	173	11,10%	4,80%	0,53%	0,00%	-0,53%
DQA1*0101-DQB1*0501	England Caucasoid	177	16,10%	13,30%	2,14%	12,50%	10,36%
DQA1*0101-DQB1*0503	England Caucasoid	177	16,10%	2,50%	0,40%	2,30%	1,90%
DQA1*0102-DQB1*0602	England Caucasoid	177	18,40%	14,40%	2,65%	14,10%	11,45%
DQA1*0102-DQB1*0604	England Caucasoid	177	18,40%	3,10%	0,57%	2,50%	1,93%
DQA1*0103-DQB1*0603	England Caucasoid	177	4,20%	3,10%	0,13%	2,00%	1,87%
DQA1*0201-DQB1*0201	England Caucasoid	177	13,30%	23,20%	3,09%	10,50%	7,41%
DQA1*0201-DQB1*0303	England Caucasoid	177	13,30%	3,70%	0,49%	2,30%	1,81%
DQA1*0301-DQB1*0301	England Caucasoid	177	23,70%	16,10%	3,82%	5,70%	1,88%
DQA1*0301-DQB1*0302	England Caucasoid	177	23,70%	16,40%	3,89%	15,30%	11,41%
DQA1*0301-DQB1*0303	England Caucasoid	177	23,70%	3,70%	0,88%	1,40%	0,52%
DQA1*0401-DQB1*0402	England Caucasoid	177	1,70%	1,70%	0,03%	1,70%	1,67%
DQA1*0501-DQB1*0201	England Caucasoid	177	22,00%	23,20%	5,10%	12,70%	7,60%
DQA1*0501-DQB1*0301	England Caucasoid	177	22,00%	16,10%	3,54%	5,40%	1,86%



DQA1*0102-DQB1*0603	Gabon Haut-Ogooue Province Dienga Village	167	50,00%	2,10%	1,05%	2,10%	1,05%
DQA1*0102-DQB1*0604	Gabon Haut-Ogooue Province Dienga Village	167	50,00%	9,00%	4,50%	5,20%	0,70%
DQA1*0103-DQB1*0604	Gabon Haut-Ogooue Province Dienga Village	167	3,90%	9,00%	0,35%	3,60%	3,25%
DQA1*0201-DQB1*0201	Gabon Haut-Ogooue Province Dienga Village	167	5,10%	16,80%	0,86%	4,90%	4,04%
DQA1*0301-DQB1*0303	Gabon Haut-Ogooue Province Dienga Village	167	7,50%	3,00%	0,23%	2,70%	2,48%
DQA1*0501-DQB1*0201	Gabon Haut-Ogooue Province Dienga Village	167	17,70%	16,80%	2,97%	6,70%	3,73%
DQA1*0501-DQB1*0301	Gabon Haut-Ogooue Province Dienga Village	167	17,70%	10,20%	1,81%	10,00%	8,19%
DQA1*0103-DQB1*0201	Gabon Haut-Ogooue Province Dienga Village	167	3,90%	16,80%	0,66%	0,00%	-0,66%
DQA1*0103-DQB1*0301	Gabon Haut-Ogooue Province Dienga Village	167	3,90%	10,20%	0,40%	0,00%	-0,40%
DQA1*0301-DQB1*0201	Gabon Haut-Ogooue Province Dienga Village	167	7,50%	16,80%	1,26%	4,50%	<b>3,24%</b>
DQA1*0301-DQB1*0602	Gabon Haut-Ogooue Province Dienga Village	167	7,50%	42,20%	3,17%	0,00%	-3,17%
DQA1*0101-DQB1*0501	Cameroon Saa	172	9,90%	11,30%	1,12%	9,60%	8,48%
DQA1*0102-DQB1*0501	Cameroon Saa	172	36,30%	11,30%	4,10%	1,80%	-2,30%
DQA1*0102-DQB1*0602	Cameroon Saa	172	36,30%	30,80%	11,18%	30,50%	19,32%
DQA1*0102-DQB1*0609	Cameroon Saa	172	36,30%	3,50%	1,27%	3,50%	2,23%
DQA1*0201-DQB1*0201	Cameroon Saa	172	2,90%	14,50%	0,42%	2,90%	2,48%
DQA1*0301-DQB1*0303	Cameroon Saa	172	27,30%	24,10%	6,58%	24,10%	17,52%
DQA1*0401-DQB1*0301	Cameroon Saa	172	8,10%	9,60%	0,78%	4,40%	3,62%
DQA1*0401-DQB1*0402	Cameroon Saa	172	8,10%	3,80%	0,31%	3,80%	3,49%
DQA1*0501-DQB1*0201	Cameroon Saa	172	13,70%	14,50%	1,99%	9,00%	7,01%
DQA1*0501-DQB1*0301	Cameroon Saa	172	13,70%	9,60%	1,32%	4,60%	3,28%
DQA1*0103-DQB1*0201	Cameroon Saa	172	1,20%	14,50%	0,17%	0,00%	-0,17%
DQA1*0103-DQB1*0301	Cameroon Saa	172	1,20%	9,60%	0,12%	0,00%	-0,12%
DQA1*0301-DQB1*0201	Cameroon Saa	172	27,30%	14,50%	3,96%	2,60%	-1,36%
DQA1*0301-DQB1*0602	Cameroon Saa	172	27,30%	30,80%	8,41%	0,00%	-8,41%

Tabelle 6.5: weltweite Frequenz von HLA-DQ-Allelen

HLA-DQ $\alpha$	Stichprobe aus versch. ethn. Gruppen	Weltweite beobachtete Häufigkeit	HLA-DQ $\beta$	Stichprobe aus versch. ethn. Gruppen	Weltweite beobachtete Häufigkeit
0101	19706	11,78 %	0201	24346	13,29 %
0102	19065	16,11 %	0202	8033	8,21 %
0103	19147	8,34 %	0301	34175	25,35 %
0104	6255	5,11 %	0302	36233	13,31 %
0105	2084	2,68 %	0303	34029	6,45 %
0201	19750	10,75 %	0304	10477	0,95 %
0301	13058	19,73 %	0305	8966	1,08 %
0302	4878	3,84 %	0401	14245	3,74 %
0303	2971	4,36 %	0402	38044	7,41 %
0401	21020	7,59 %	0501	38143	9,59 %
0501	19746	26,16 %	0502	31205	5,86 %
0502	1938	3,1 %	0503	30779	4,28 %
0503	1804	0,9 %	0601	29844	7,21 %
0505	2191	15,4 %	0602	38284	8,27 %
0601	10928	4,28 %	0603	34959	4,06 %
			0604	31793	2,95 %
			0605	8950	1,76 %
			0609	17566	1,99 %
			0612	4236	0,00 %

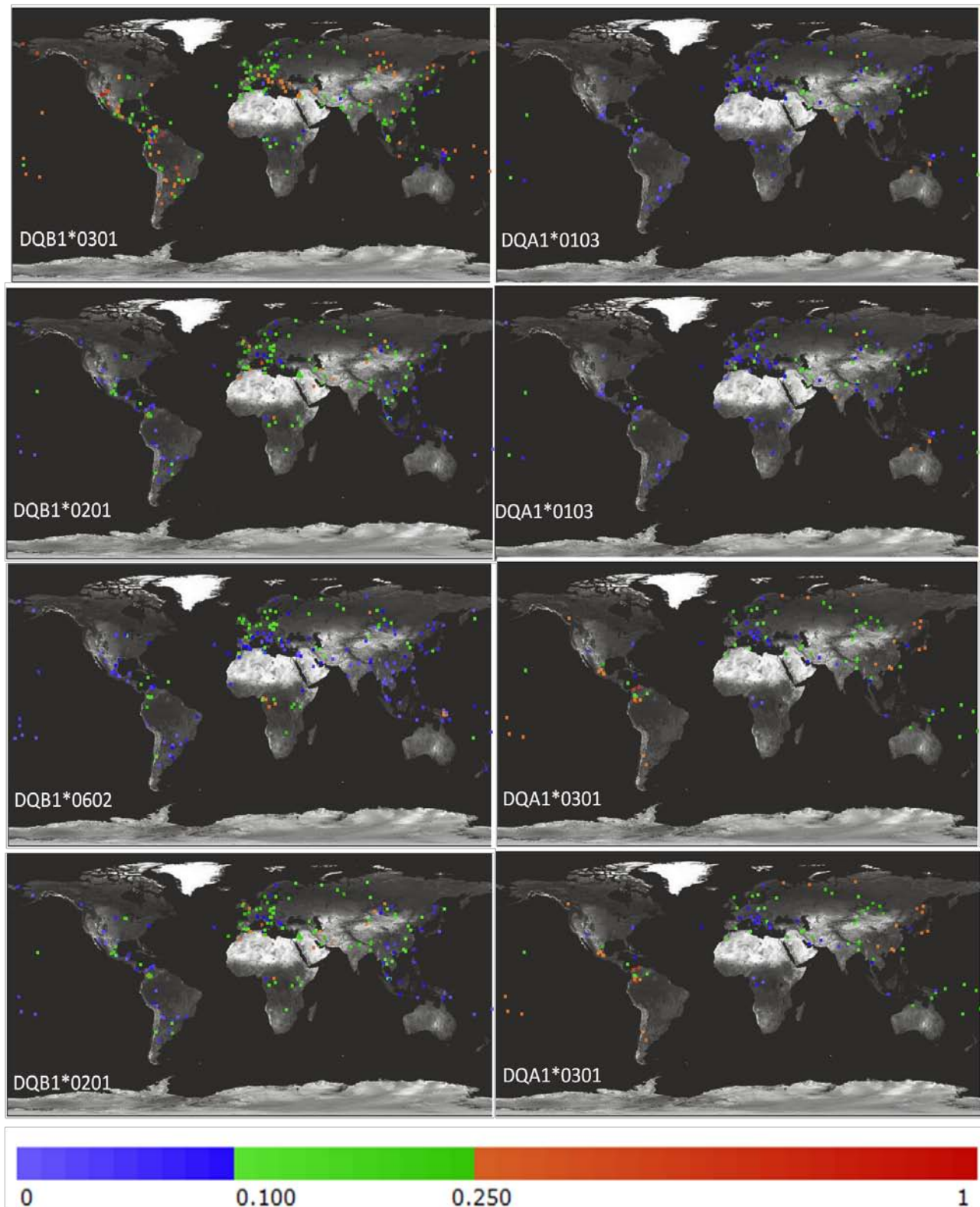
Tabelle 6.6: Frequenz von HLA-DQA1 / B1-Haplotypen und deren Kopplungsungleichgewicht

DQA1	DQB1	Gesamte Stichprobe	Absolute Haplotyp-Häufigkeit weltweit	Prozentuale Haplotyp-Häufigkeit weltweit	Theoretische Haplotyp-Wahrscheinlichkeit weltweit	Kopplungsungleichgewicht $\Delta$	Endo <sub>H</sub> -Resistenz + Oberflächenexpression
0101	0301	11.788	5	0,04%	2,99%	-2,95%	
	0302	11.788	2	0,02%	1,57%	-1,55%	
	0303	11.788	1	0,01%	0,76%	-0,75%	
	0501	11.788	1.086	9,21%	1,13%	+8,08%	
	0502	11.788	58	0,49%	0,69%	-0,20%	
	0503	11.788	211	1,79%	0,50%	+1,29%	
	05	11.788	19	0,16%	-	-	
	0601	11.788	3	0,03%	0,85%	-0,82%	
	0602	11.788	16	0,14%	0,97%	-0,83%	
	0603	11.788	2	0,02%	0,45%	-0,43%	
	0604	11.788	4	0,03%	0,35%	-0,32%	
0102	0201	10.814	4	0,04%	2,14%	-2,10%	
	0501	10.814	46	0,43%	1,54%	-1,11%	
	0502	10.814	339	3,13%	0,94%	+2,19%	
	0601	10.814	46	0,43%	1,16%	-0,73%	

	<b>0602</b>	10.814	1.090	10,08%	1,33%	+8,75%	
	<b>0603</b>	10.814	54	0,50%	0,65%	-0,15%	
	<b>0604</b>	10.814	341	3,15%	0,48%	+2,67%	
	<b>0605</b>	10.814	68	0,63%	0,28%	+0,35%	
<b>0103</b>	<b>0301</b>	10.741	2	0,02%	2,11%	-2,09%	-
	<b>0501</b>	10.741	23	0,21%	0,80%	-0,59%	
	<b>0503</b>	10.741	8	0,07%	0,36%	-0,29%	
	<b>0601</b>	10.741	729	6,79%	0,60%	+6,19%	
	<b>0602</b>	10.741	120	1,12%	0,69%	+0,43%	+
	<b>0603</b>	10.741	419	3,90%	0,34%	+3,56%	
	<b>0604</b>	10.741	8	0,07%	0,25%	-0,18%	
	<b>0605</b>	10.741	5	0,05%	0,15%	-0,10%	
	<b>0609</b>	10.741	5	0,05%	0,17%	-0,12%	
	<b>0612</b>	10.741	1	0,01%	-	-	
<b>0104</b>	<b>0501</b>	5.218	94	1,80%	0,49%	+1,31%	
	<b>0502</b>	5.218	26	0,50%	0,30%	+0,20%	
	<b>0503</b>	5.218	116	2,22%	0,22%	+2,00%	
<b>0105</b>	<b>0501</b>	784	15	1,91%	0,26%	+1,65%	
<b>0201</b>	<b>0201</b>	10.186	655	6,43%	1,43%	+5,00%	+
	<b>0202</b>	10.186	309	3,03%	0,88%	+2,15%	
	<b>02</b>	10.186	181	1,78%	-	-	
	<b>0301</b>	10.186	5	0,05%	2,73%	-2,68%	-
	<b>0302</b>	10.186	5	0,05%	1,43%	-1,38%	-
	<b>0303</b>	10.186	227	2,23%	0,69%	+1,54%	
	<b>0402</b>	10.186	1	0,01%	0,80%	-0,79%	
	<b>0501</b>	10.186	6	0,06%	1,03%	-0,97%	
<b>0301</b>	<b>0201</b>	9.246	30	0,32%	2,62%	-2,30%	-
	<b>02</b>	9.246	5	0,05%	-	-	
	<b>0301</b>	9.246	89	0,96%	5,00%	-4,04%	+
	<b>0302</b>	9.246	854	9,24%	2,63%	+6,61%	+
	<b>0303</b>	9.246	227	2,46%	1,27%	+1,19%	
	<b>0304</b>	9.246	17	0,18%	0,19%	-0,01%	
	<b>0305</b>	9.246	5	0,06%	0,21%	-0,15%	
	<b>0401</b>	9.246	150	1,62%	0,74%	+0,88%	
	<b>0402</b>	9.246	31	0,34%	1,46%	-1,12%	
	<b>0501</b>	9.246	5	0,05%	1,89%	-1,84%	
	<b>0601</b>	9.246	1	0,01%	1,42%	-1,41%	
<b>0302</b>	<b>0301</b>	3.110	122	3,92%	0,97%	+2,95%	
	<b>0302</b>	3.110	19	0,61%	0,51%	+0,10%	
	<b>0303</b>	3.110	241	7,75%	0,25%	+7,50%	
	<b>0401</b>	3.110	139	4,47%	0,14%	+4,33%	
	<b>0402</b>	3.110	20	0,64%	0,28%	+0,36%	
<b>0303</b>	<b>02</b>	621	5	0,81%	-	-	
	<b>0401</b>	621	61	9,82%	0,16%	+9,66%	

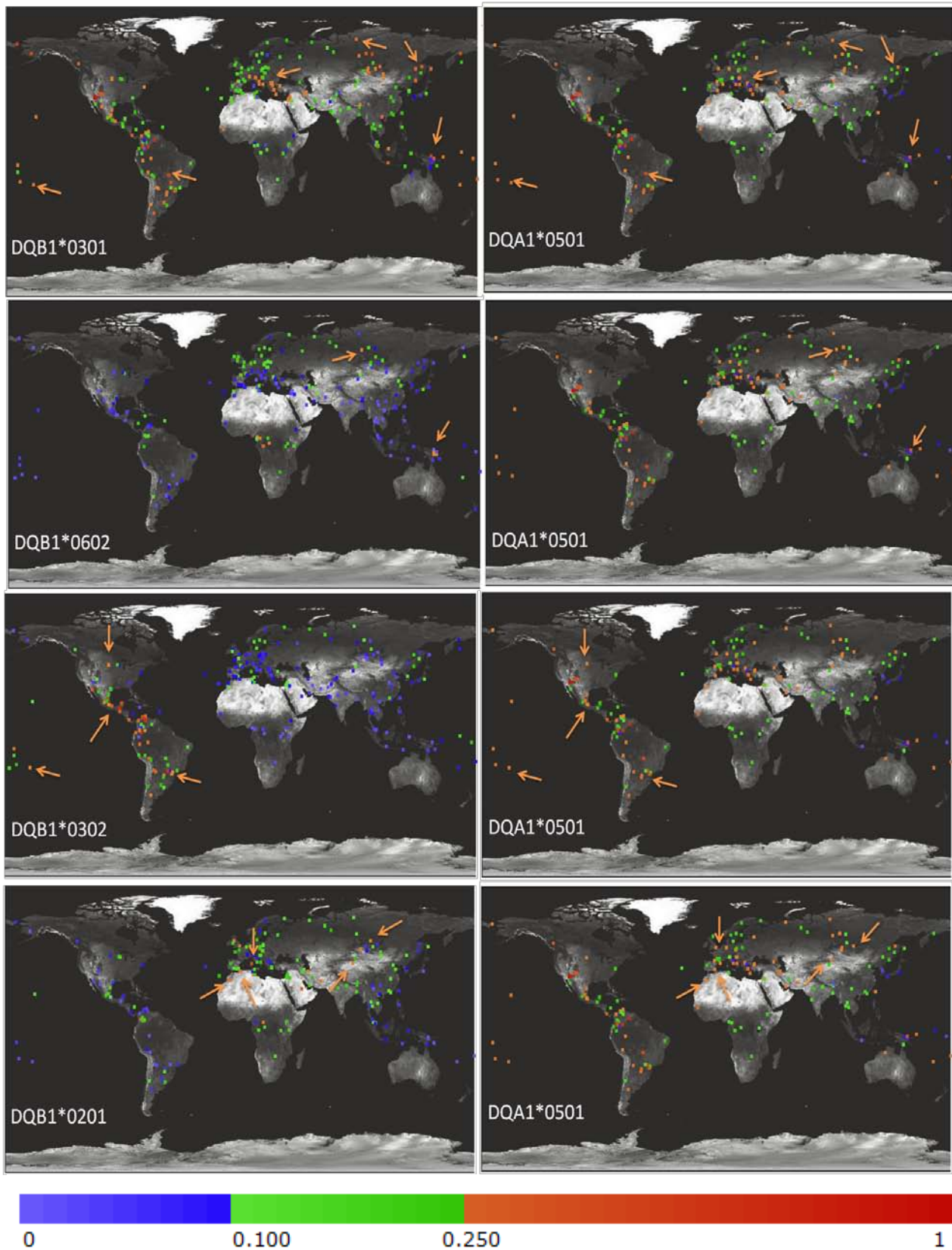
	<b>0402</b>	621	11	1,77%	0,32%	+1,45%	
<b>0401</b>	<b>0201</b>	8.471	1	0,01%	0,86%	-0,85%	
	<b>0301</b>	8.471	69	0,81%	1,92%	-1,11%	
	<b>0302</b>	8.471	17	0,20%	1,01%	-0,81%	
	<b>0303</b>	8.471	2	0,02%	0,49%	-0,47%	
	<b>0401</b>	8.471	32	0,38%	0,28%	+0,10%	
	<b>0402</b>	8.471	322	3,80%	0,56%	+3,24%	
<b>0501</b>	<b>0201</b>	12.259	948	7,73%	3,48%	+4,25%	+
	<b>0202</b>	12.259	13	0,11%	2,15%	-2,04%	
	<b>0301</b>	12.259	1.696	13,83%	6,63%	+7,20%	+
	<b>0302</b>	12.259	4	0,03%	3,48%	-3,45%	+
	<b>0303</b>	12.259	89	0,73%	1,69%	-0,96%	
	<b>0402</b>	12.259	12	0,10%	1,94%	-1,84%	
	<b>0501</b>	12.259	1	0,01%	2,51%	-2,50%	
	<b>0502</b>	12.259	1	0,01%	1,53%	-1,52%	
	<b>0601</b>	12.259	6	0,05%	1,89%	-1,84%	
	<b>0602</b>	12.259	1	0,01%	2,16%	-2,15%	+
<b>0502</b>	<b>0201</b>	85	5	5,88%	0,41%	+5,47%	
<b>0503</b>	<b>0301</b>	525	14	2,67%	0,23%	+2,44%	
<b>0505</b>	<b>0301</b>	779	84	10,78%	3,90%	+6,88%	+
	<b>0303</b>	779	4	0,51%	0,99%	-0,48%	
<b>0601</b>	<b>0201</b>	5.701	3	0,05%	0,57%	-0,52%	
	<b>0301</b>	5.701	106	1,86%	1,08%	+0,78%	

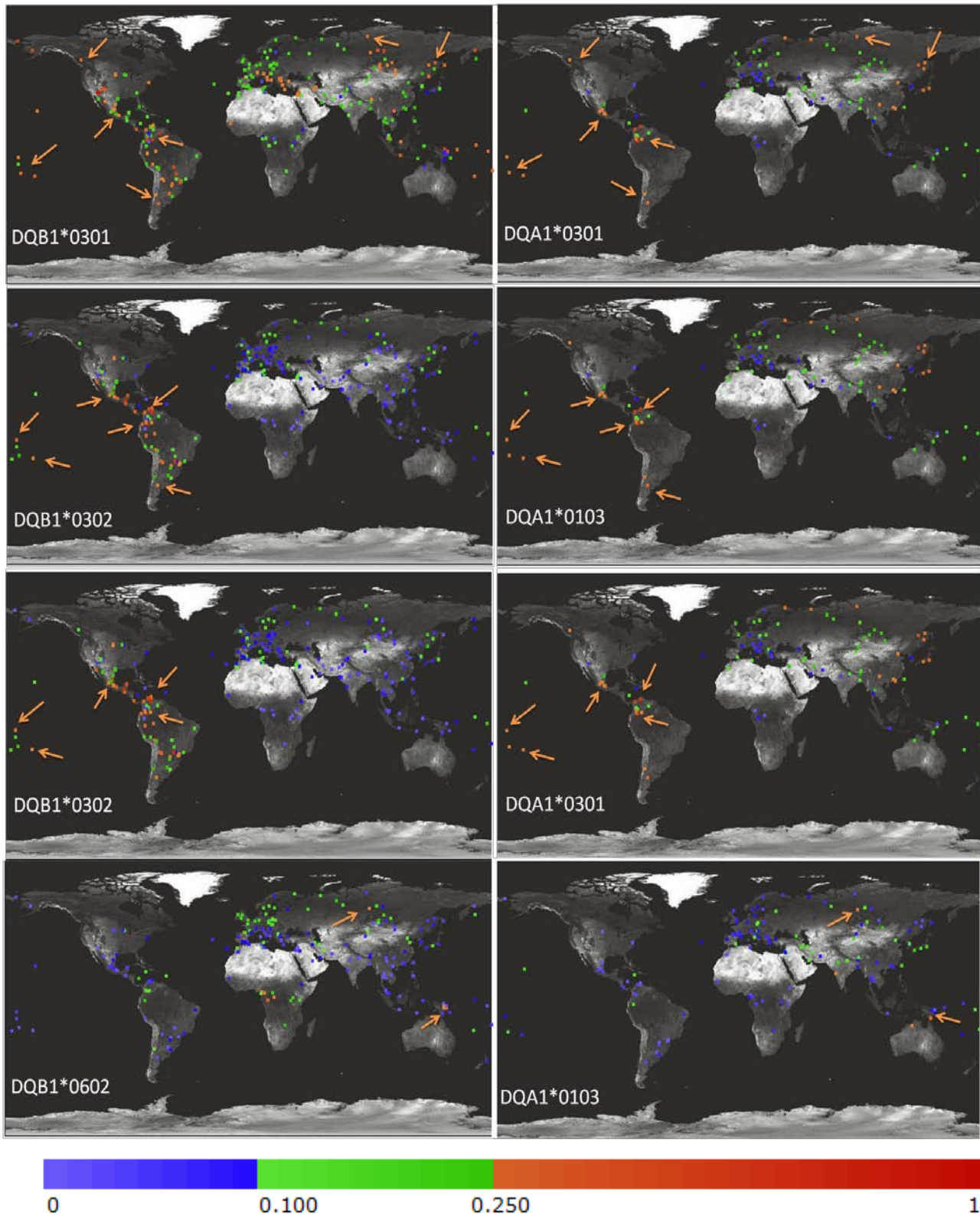




**Abbildung 6.2: Bildliche Darstellung der Allelverteilung von „nicht passenden“ HLA-DQA1 und -DQB1**

Die weltweite Verteilung des Allels in den ethnischen Populationen der Datenbank wird durch durch Punkte unterschiedlicher Farbe dargestellt. In einer Zeile sind jeweils die Allelkombinationen aus HLA-Klasse-II-DQ Alpha- und Beta-Ketten, die sich in dieser Arbeit als „nicht passende“ herauskristallisiert haben. (Quelle: Allele frequencies.net Stand 23.04.2010)





**Abbildung 6.3: Bildliche Darstellung der Allelverteilung von „passenden“ HLA-DQA1 und -DQB1**

Die weltweite Verteilung des Allels in den ethnischen Populationen der Datenbank wird durch Punkte unterschiedlicher Farbe dargestellt. In einer Zeile sind jeweils die Allelkombinationen aus HLA-Klasse-II-DQ $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten, die sich in dieser Arbeit als „passend“ herauskristallisiert haben. (Quelle: Allele frequencies.net Stand 23.04.2010)

+ li			- li			+ li	- li	+ li	- li	CD74
DQ alpha			DQ alpha			DQ beta		CD74		Western
-	E <sub>H</sub>	P <sub>F</sub>	-	E <sub>H</sub>	P <sub>F</sub>	Lysatkontrollen				Behandlung
										DQA1*0103 DQB1*0301
										DQA1*0301 DQB1*0602
										DQA1*0501 DQB1*0302
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

#### Abbildung 6.4: Funktionelle DQ-Rezeptoren in Abhängigkeit der Zelllinie

Um eine Zelllinienabhängigkeit der bisherigen Ergebnisse auszuschließen wurden HeLa-Zellen mit jeweils einer DQ $\alpha$ - und DQ $\beta$ - Kette transfiziert. Die Allelkombinationen wurden in An- (+li; Spur 1-3) und Abwesenheit von der li (-li, Spur 4-6), geprüft. Die Inkubation mit EndoH diente dem Nachweis einer Kohlenhydratreifung im Golgi Apparat (Spur 2 und 5). Als Kontrolle wurde eine Inkubation der Probe mit PNGaseF zusätzlich durchgeführt (Spur 3 und 6). Nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE und Western Blot erfolgte die Detektion der DQ-Alpha-Ketten (Spur 1). Als Kontrolle der erfolgreichen Expression wurden die DQ-Beta-Ketten zusätzlich detektiert (Spur 7 und 8). Die An- bzw. Abwesenheit der li ist in Spur 9 und 10 dargestellt. Die Ergebnisse der EndoH-Verdaus ähneln dem Muster nach Versuchsdurchführung in IMR90S-Zellen.

---

---

## Literaturverzeichnis

### Wissenschaftliche Artikel:

#### A

Ahmad, T., Neville M., Marshall, S. E., Armuzzi, A., Mulcahy-Hawes, K., Crawshaw, J., Sato, H., Ling, K., Barnardo, M., Goldthorpe, S., Walton, R., Bunce, M., Jewell, D.P. and Welsh, K.I. 2003. Haplotype-specific linkage disequilibrium patterns define the genetic topography of the human MHC. **Human Molecular Genetics 12: 647–656**

Anderson, M.S. and Miller J. 1992. Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. **Proc Natl Acad Sci 89, 2282-2286**

#### B

Bakke, O. and Dobberstein, B. 1990. MHC class II associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. **Cell 63:707.**

Begovich, A. B., McClure, G. R., Suraj, V. C., Helmuth, R. C. 1992. Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. **J.Immunol. 148: 249 – 258**

Bénaroch P., Yilla, M., Raposo, G., Ito, K., Miwa, K., Geuze, H.J. and Ploegh, H.L. 1995. How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. **EMBO J. 14: 37–49.**

Berger, A. C. and Roche, P. A. 2009. MHC class II transport at a glance. **Journal Cell Science 122, 1 - 4**

Bevec, T., Stoka, V., Pungercic, G., Dolenc, I. and Turk, V. 1996. Major histocompatibility complex class II associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. **J Exp Med 183: 1331 - 1338**

Bodmer, J. G., Marsh, S. G. E., Albert, E. D., Bodmer, W.F. 2003. Nomenclature for the factors of the HLA-System. **Eur.J.Immunogenet. 26: 81 – 116**

Boehm, T. 2005. Qualitätskontrolle im Immunsystem. **Max-Planck-Gesellschaft; Tätigkeitsbericht 2005 unter [www.Max-Planck-Gesellschaft.de](http://www.Max-Planck-Gesellschaft.de) (Stand 29.09.2010)**

Boes, M., Armelle, C. and Ploegh, H. 2004. Membrane specializations and endosome maturation in dendritic cells and B cells. **Trends in Cell Biology 14: 175-183**

Braunstein, N. S., and Germain, R. N. 1987. Allele-specific control of Ia molecule surface expression and conformation: implication for a general model of Ia structure-function relationships. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 2921 - 2932.**

Bryant, P., Ploegh, H. 2004. Class II MHC peptide loading by the professionals. **Curr Opin Immunol. 16: 96 - 102.**

---

**C**

**Caillat-Zucman, S. 2008.** Molecular mechanism of HLA association with autoimmune diseases. **Tissue Antigens ISSN 0001-2815, 73, 1 - 8**

**Carrington, M. 1999.** Recombination within the human MHC. **Immunological Reviews. 167: 245 - 256**

**Cintado, A., Sorell, L., Galván, J.A., Martínez, L., Castañeda, C., Fragoso, T., Camacho, H., Ferrer, A., Companioni, O., Benitez, J., Nazábal, M., Novoa, L.I. and Dueñas, M. 2006.** HLA DQA1\*0501 and DQB1\*02 in Cuban celiac patients. **Hum Immunol. 67:639 - 642.**

**CORTE, G., CALABI, F., DAMIANI, G., BARGELLES, A., Tosi, R. and SORRENTINO, R. 1981.** Human lamolecules carrying DC 1 determinants differ in both  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits from Ia molecules carrying DR determinants. **Nature 292: 357 - 365**

**Crawford, D.C. and Nickerson, D.A. 2005.** Definition and clinical importance of haplotypes. **Annu. Rev. Med. 56: 303 - 20**

**Cresswell, P. 1994.** Assembly, Transport, and Function of MHC class II molecules. **Annu Rev. Immunol. 12: 259 - 293**

**D**

**Dawkins, R., Leelayuwat, C., Gaudieri, S., Tay, G., Hui, J., Cattley, S., Martinez, P. and Kulski, J. 1999.** Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. **Immunol. Rev. 167: 275 – 304.**

**De Bakker, P.I., McVean, G., Sabeti, P.C., Miretti, M.M., Green, T., Marchini, J., et al. 2006.** A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. **Nature Genetics 38: 1166 - 1178**

**De Lerma Barbro, A., Sartoris, S., Tosi, G., Nicolis, M. and Accolla, R.S. 1994.** Evidence for a specific post-transcriptional mechanism controlling the expression of HLA-DQ, but not -DR and -DP molecules. **J. Immunol. 153: 4530 - 4538.**

**Demotz, S., Grey, H.M., and Sette, A. 1990.** The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. **Science 249: 1028-1030**

**E**

**Ettinger, R. A., Liu, A. W., Nepom, G. T., Kwok, W. W. 2000.**  $\beta$ 57-ASP plays an essential role in the unique stability of HLA-DQA1\*0102/DQB1\*0602  $\alpha\beta$  protein dimer, the class II MHC Allele associated with the protection from insulin-dependent diabetes mellitus. **The Journal of Immunology, 165: 3238 – 3238**

**Elliott, E. A., Drake, J.R., Amigorena, S., Elsemore, J., Webster, P., Mellman, I. and Flavell, R.A. 1994.** The Invariant Chain Is Required for Intracellular Transport and Function of Major Histocompatibility Complex Class II Molecules. **J. Exp. Med. 179: 681-694**

**F**

**Farquhar, M. G. and Palade, G. E. 1998.** The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. **Trends Cell Biol. 8: 2 – 10**

**Freisewinkel, I.M., Schenck, K., Koch, N. (1993).** The segment of invariant chain that is critical for association with major histocompatibility complex class II molecules contains the sequence of a peptide eluted from class II polypeptides. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 90: 9703 - 9706**

**G**

**Germain, R.N., Bentley, D.M. and Quill. H. 1985.** Influence of allelic polymorphism on the assembly and surface expression of class II MHC (Ia) molecules. **Cell 43: 233 - 240**

**Giles, R., DeMars, R., Chang, C.C. and Capra, J.D. 1985.** Allelic polymorphism and transassociation of molecules encoded by the HLA DQ subregion. **Proc. Natl. Acad. SciU. SA 82: 1776 - 1782.**

**Gosh, P., Amaya, M., Mellins, E., Wiley, D.C. 1995.** The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. **Nature. Vol: 378 - 293**

**Blazenka, G., Sukernik, R.I., O'hUigin, C., Zaleska-Rutczynska, Z., Blagitko, N., Raldugina, O., Kosutic, T., Satta, Y., Figueroa, F., Takahata, N., Klein, J. 1998.** Polymorphism of the HLA class II loci in Siberian populations. **Hum Genet 102 : 27 - 43**

**Gu, F., Crump, C. M. and Thomas, G. 2001.** Trans-Golgi network sorting. **Cell. Mol. Life Sci. 58, 1067–1084**

**Gu, X. and Nei, M. 1999.** Locus specificity of polymorphic alleles and evolution by a birth- and death-process in Mammalian MHC genes. **Mol Biol Evol 16: 147 - 156**

**Gyllensten, U.B. and Erlich, H. A. 2002.** MHC class II haplotypes and linkage disequilibrium in primates. **Human Immunology 36: 1 - 10**

**H**

**Heard, R. 1994.** HLA and autoimmune disease, HLA and disease, **Academic Press Ltd, London.**

**Hiltbold, E.M., Roche, P.A. 2002.** Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. **Current Opinion in Immunology 14: 30-35**

**Hsieh, C.S., de Roos, P., Honey, K., Beers, C. and Rudensky, A.V. 2002.** A role for cathepsin S in peptide generation for MHC class II presentation. **J Immunol 168: 2618 - 2625**

**I**

**Ishikura, H., Ishikawa, N., Aizawa, M. 1987.** Differential expression of HLA-class II antigens in the human thymus. **Tranplantation 44, 314 - 317**

**J**

**Johnson, J. P., Demmer-Dieckmann, M., Meo, T., Hadam, M.R. and Riethmuller, G.. 1981.** Surface antigens of human melanoma cells defined by monoclonal antibodies. I. Biochemical characterization of two antigens found on cell lines and fresh tumors of diverse tissue origin. **Eur.J.Immunol. 11: 825 - 831**

**Jones, J. S. 1999.** The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. **Nature 401: 921 - 923**

**Jones, E. Y., Fugger, L., Strominger, J.L., Siebold C. 2006.** MHC class II proteins and disease: a structural perspective. **Nature Reviews 6: 271 - 282**

**K**

**King, G. and Dixon, A. M. 2010.** Evidence for role of transmembrane helix–helix interactions in the assembly of the Class II major histocompatibility complex. **Mol Biosyst. 6:1650-1661**

**Kleijmeer, M.J., Morkowski, S., Griffith, J.M., Rudensky, A.Y., Geuze, H.J.** Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. **J Cell Biol. 139: 639 - 649**

**Klein, J., Sato, A. 2000:** The HLA System. **N. Eng. J. Med 343: 702 – 709**

**Krawczak, M. 2003.** Genetische Epidemiologie. **Christina Albertina 56: 35 -50**

**Koch, N., McLellan, A. D. and Neumann. J. 2007.** A revised model for invariant chain-mediated assembly of MHC class II peptide receptors. **Trends Biochem. Sci. 32: 532 - 537**

**Kropshofer, H., Vogt, A.B., Moldenhauer, G., Hammer, J., Blum, J.S., Hammerling, G.J. 1996.** Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. **EMBO J 15: 6144 - 6154**

**Kwok, W.W., Schwarz, D., Nepom, B., Thurtle, P., Hock, R. and Nepom, G.T. 1988.** HLA-DQ molecules form  $\alpha$ - $\beta$  heterodimers of mixed allotype. **J. Immunol. 141: 3123 - 3133**

**Kwok, W.W., Thurtle, P. and Nepom, G.T. 1989.** A genetically controlled pairing anomaly between HLA-DQ $\alpha$  and HLA-DQ $\beta$  chains. **J. Immunol. 143: 3598 - 3604**

**Kwok, W.W., Kovats, S., Thurtle, P., Nepom, G.T. 1993.** HLA-DQ allelic polymorphisms constrain patterns of class II heterodimer formation. **J Immunol. 150: 2263 - 2272**

**L**

**Lee, K. H., Wucherpennig, K. W. and Wiley, D. C. 2001.** Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. **Nature Immunol. 2: 501 – 507**

**Leveille, C., Castaigne, J.G., Charron, D., Al-Daccak, R. 2002.** MHC class II isotype-specific signaling complex on human B cells. **Eur J Immunol. 32:2282 – 2291**



---

**M**

**Manoury, B., Hewitt, F.W., Morrice, N., Dando, P.M., Barrett, A.J. and Watts, C. 1998.** An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation. **Nature 396: 695 - 699**

**Marcilla, M., Lopez de Castro, J.A. 2008.** Peptides: the cornerstone of HLA-B27 biology and pathogenetic role in spondyloarthritis. **Tissue Antigens 71: 495 - 506**

**Marie, M., Sannerud, R., Avsnes, D.H., Saraste, J. 2008.** Take the 'A' train: on fast tracks to the cell surface. **Cell Mol Life Sci 65: 2859 - 2874**

**Marie, M., Sannerud, R., Avsnes, D.H., Saraste, J. 2009.** The Function of the Intermediate Compartment in Pre-Golgi Trafficking Involves its Stable Connection with the Centrosome. **Molecular Biology of the Cell 20: 4458 - 4470**

**McFarland, B. J. and Beeson, C. 2002.** Binding interactions between peptides and proteins of the class II Major Histocompatibility Complex. **Medicinal Research Reviews 22: 168 - 203**

**Marks, M.S., Germain, R.N. and Bonifacio, J.S. 1995.** Transient aggregation of major histocompatibility complex class II chains during assembly in normal spleen cells. **J.Biol. Chem. 270: 10475 - 10481**

**Milinski, M., S., Griffiths, K.M., Wegner, T.B.H., Reusch, A., Haas-Assenbaum, and Boehm, T. Mate choice decisions of stickleback females predictably modified by MHC peptide ligands. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 4414 - 4418**

**Miretti, M.M., Walsh, E.C., Ke, X., Delgado, M., Griffiths, M. Hunt, S. et al. 2005.** A high-resolution linkage-disequilibrium map of the human major histocompatibility complex and first generation of tag single nucleotide polymorphism. **American Journal of Human Genetics, 76: 634 - 644**

**Mosyak, L., Zaller, D.M., Wiley, D.C. 1998.** The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. **Immunity 9: 377 - 383**

**Müller, C.; (2003):** HLA-System: Organisation, Genetik, Struktur, Funktion und klinische Bedeutung. [www.medizin.uni-tuebingen.de/~webim2/abtii/hlalabor/hla.htm](http://www.medizin.uni-tuebingen.de/~webim2/abtii/hlalabor/hla.htm) (Stand: 25.08.2010)

**N**

**Nepom, B.S., Schwarz, D., Palmer, J. P. and G. T. Nepom. 1987.** Transcomplementation of HLA genes in IDDM. HLA-DQ  $\alpha$ - and P-chains produce hybrid molecules in DR3/4 heterozygotes. **Diabetes 36: 114 - 120**

**Neumann, J. 2005.** Novel antibody tags from the rat lysosomal protein RT1.DM for immunodetection of recombinant proteins. **Journal of Immunological Methods 301: 66 - 76**

**Neumann, J. and Koch, N. 2005.** Assembly of major histocompatibility complex class II subunits with invariant chain. **FEBS Lett. 579:6055-9**

**Neumann J and Koch N. 2006.** A novel domain on HLA-DR $\beta$  chain regulates the chaperone role of the invariant chain. **Journal of Cell Science 119: 4207 - 4214**

**Nickel, W. 2003.** The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. **Eur. J. Biochem. 270: 2109 - 2119**

**Nishioku, T., Hashimoto, K., Yamashita, K., Liou, SY, Kagamiishi, Y., Maegawa, H., Katsube, N., Peters, C., von Figura, K., Saftig, P., Katunuma, N., Yamamoto, K. and Nakanishi, H. 2002.** Involvement of cathepsin E in exogenous antigen processing in primary cultured murine microglia. **J Biol Chem 277: 4816 - 4822**

**Nonaka, M., Megumi Matsuo Kiyoshi Naruse and Akihiro Shima. 2001.** Comparative Genomics of Medaka: The Major Histocompatibility Complex (MHC). **Mar. Biotechnol. 3: 141 - 144**

**Nossal, G. J. .1994.** Negative selection of lymphocytes. **Cell 2: 229 - 39**

## O

**Ohta, T. 1992.** Diversifying selection, gene conversation, and random drift: interactive effects on polymorphism at MHC loci. **Oxford University Press 2: 20 - 27**

**Oshima, M., Deitiker, P., Atassi, M.Z. 2007.** Targeting the antigen-binding site of HLA-restricting alleles in treatment of autoimmune disease. **Crit Rev Immunol. 27: 271 - 88**

## P

**Paliakasis, K., Routsias, J., Kyriacos, P., Ouzounis, C., Papadopoulous, G. 1996.** Novel structural features of the human histocompatibility molecules HLA-DQ as revealed by modeling based on the published structure of the related molecule HLA-DR. **Journal of structural biology 117: 145 - 163**

**Park, Y. 2007.** Functional evaluation of the type 1 diabetes (T1D) susceptibility candidate genes. **Diabetes Res Clin Pract. 1: 110 - 115**

**Penn, D.J. and Ilmonen, P. 2005.** Major Histocompatibility Complex (MHC). **Encyclopedia of life sciences 10: 1038 - 1047**

**Pieters, J., Bakke, O. and Dobberstein, B. 1993.** The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. **Journal of Cell Science 106: 831-846**

**Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J. and Lippincott-Schwartz, J. 1997.** ER-to-Golgi transport visualized in living cells. **Nature 389, 81 - 85**

**Prydz, K., Dick, G., Tveit, H. 2008.** How many ways through the Golgi maze? **Traffic 9: 299 - 304**

## Q

**Qiao, S. W. 2005.** Refining the rules of gliadin T cell epitope binding to the disease-associated DQ2 molecule in celiac disease: importance of proline spacing and glutamine deamidation. **J. Immunol. 175: 254 - 261**

## R

**Rammensee, H.G. 1996.** Antigen presentation - recent developments. **Int Arch Allergy Immunol 4: 299 - 307**

**Rao, A. and Avni, O. 2000.** Molecular aspects of T-cell differentiation. **Br Med Bull 4: 969 - 84**

Raddrizzani, L., Sturniolo, T., Guenot, J., Bono, E., Gallazzi, R., Nagy, Z.A. 1997. Different modes of peptide interaction enable HLA-DQ and HLA-DR molecules to bind diverse peptide repertoires. **J. Immunol.** **159**: 703 - 711

Riberdy, J.M., Newcomb, J.R., Surman, M.J., Barbosa, J.A. and Cresswell, P. 1992. HLA-DR molecules from an antigenprocessing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. **nature** **360**: 474 - 71

Robinson, J.H. and Delvig. A.A. 2002. Diversity in MHC class II antigen presentation. **Immunology** **105**: 252 - 262

Rocha, R. and Neefjes, J. 2008. MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. **The EMBO Journal** **27**: 1 - 5

Roche, P. A., Teletski, C.L., Stang, E., Bakke, O. and Long, E.O. 1993. Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. **PNAS** **90**: 8581 - 8585

Robbins, P.A., Maino, V.C., Werner, N.L., Brodsky, F.M. 1988. Activated T cells and monocytes have characteristic patterns of class II antigen expression. **J. Immunol.** **141**: 1281 - 1287

Romagnoli, P., and Germain, R.N. 1994. The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport and peptide occupancy. **J Exp Med** **180**: 1107 - 1113

## S

Sant, A.J., Braunstein, N.S. and Germain, R.N. 1987. Predominant role of amino-terminal sequences in dictating efficiency of class I1 major histocompatibility complex a dimer expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**: 8065 - 8077

Sant, A.J., Hendrix, L.R., Coligan, J.E., Maloy, W.L. and Germain, R.N. 1991. Defective intracellular transport as a common mechanism limiting expression of inappropriately paired class I1 major histocompatibility complex alp chains. **J. Exp.Med.** **74**: 799 - 809

Schaiff, W.T., Hruska, K.A., Bono, C., Shuman, S., and Schwartz, B.D. 1991. Invariant chain influences post-translational processing of HLA-DR molecules. **J. Immunol.** **147**: 603 - 608

Shen, P. and Huang, H.V. 1989. Effect of basepair mismatches on recombination via the RecBCD pathway. **Molecular General Genetics** **97**: 41 - 52

Shin, J.S., Ebersold, M., Pypaert, M., Delamarre, L., Hartley, A. and Mellman. I. 2006. Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. **Nature** **444**: 115 - 118

Siebenkotten, I.M., Carstens, C., Koch, N. 1998. Identification of a sequence that mediates promiscuous binding of invariant chain to MHC class II allotypes. **J. Immunol.** **160**: 3355 - 3362

Siebold, C., Hansen, B.E., Wyer, J.R., Harlos, K., Esnouf, R.E., Svejgaard, A., Bell, J.I., Strominger, J.L., Jones, E.Y. and Fugger, L. 2004. Crystal structure of HLA-DQ0602 that protects against type 1 diabetes and confers strong susceptibility to narcolepsy. **Proc. Natl Acad.Sci. USA** **101**: 1999 - 2004

Siebold. C., Hansen, B.E., Wyer, J.R., Harlos, K., Esnouf, R.E., Svejgaard, A. Bell, J.I., Strominger, J.L., Jones, E.Y. and Fugger, L. 2003. Crystal structure of HLA-DQ0602 that protects against type 1 diabetes and confers strong susceptibility to narcolepsy. **PNAS** **101**: 1999 - 2004

---

**Sipak-Szmigiel, O., Ronin-Walknowska, E., Miklaszewicz, A., Dołubeczko, A., Zejmo, M., Giedrys-Kalemba, S. 2007.** Association between HLA-DQA1, HLA-DQB1 alleles and risk of early pregnancy loss. *Ginekol Pol.* **78:** 792 - 795

**Sollid, L.M., Markussen, G., Ek, J., Gjerde, H., Vartdal, F., and Thorsby, E. 1989.** Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ  $\alpha/\beta$  heterodimer. *J. Exp. Med.* **169:** 345 - 350

**Solberg, O.D., Mack, S.J., Lancaster, A.K., Single, R.M., Tsai, Y., Sanchez-Mazas, A., and Thomson, G. 2008.** Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte antigen loci: A meta-analytic review of 497 population studies. *Hum Immunol*, doi: 10.1016/j.humimm.2008.05.001

**Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G. Strominger, J.L. and Wiley, D.C. 1994.** Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* **368:** 215 - 221

**Stern, L.J., Potolicchio, I. and Santambrogio, L. 2006.** MHC class II compartment subtypes: structure and function. *Curr. Opin. Immunol.* **18:** 64 - 69

**Stepniak, D., Wiesner, M., de Ru, A.H., Mustakas, A.K., Drijthout, J.W., Papadopoulos, G.K., van Veelen, P.A. and Koning, F. 2008.** Large-Scale Characterization of Natural Ligands Explains the Unique Gluten-Binding Properties of HLA-DQ2. *J. Immunol.* **180:** 3268 - 3279

**Spurkland, A., Rønningen, K.S., Vandvik, B., Thorsby, E. and Vartdal, F.. 2002.** HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genes may jointly determine susceptibility to develop multiple sclerosis. *Human Immunology.* **30:** 69 - 75

## T

**Taylor, M., Hussain, A., Urayama, K., Chokkalingam, A., Thompson, P., Trachtenberg, E., Buffler, P.** The human major histocompatibility complex and childhood leukemia: an etiological hypothesis based on molecular mimicry. *Blood Cells Mol Dis.* **2009 42:**129 - 35

**Théry C., Brachet, V., Regnault, A., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Bonnerot C. and Amigorena, S. 1998.** MHC Class II Transport from Lysosomal Compartments to the Cell Surface Is Determined by Stable Peptide Binding, But Not by the Cytosolic Domains of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -Chains. *The Journal of Immunology* **161:** 2106 - 2113

**Todd, J.A., Bell, J.I. and McDevitt, H.O. 1987.** HLA-DQ $\beta$  gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* **329:** 599 - 604

**Traherne, J.A. 2008.** Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *International Journal of Immungentics* **35:** 179 - 192

**Tveit H., Linn Kristin Aa. Akslen, Gro Live Fagereng, Michael A. Tranulis and Kristian Prydz. 2009.** A Secretory Golgi Bypass Route to the Apical Surface Domain of Epithelial MDCK Cells. *Traffic* **2009 10:** 1685 - 1695

## V

**van de Wal, Y. et al. 1998.** Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J. Immunol.* **161:** 1585 - 1588

**Vandiedonk, C. and Knight, J.C. 2009.** The human Major Histocompatibility Complex as a paradigm in genomics research. **Briefing in functional genomics and proteomics. 8: 379 - 394**

## W

**Wahn, V., Wolf, H., Klein, C. and Friedrich, W. 2010.** Genetische Störungen der Antigenpräsentation. <http://www.immunodefekt.de/mhcIIdefekt.shtml> (31.08.2010)

**Watts, C. 1997.** Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. **Annual reviews of immunology 15: 821 - 850**

**Wiesner, M., Stepniak, D., de Ru, A.H., Moustakis, A.K., Drijfhout, J.W., Papadopoulos, G.K., van Veelen, P.A. and Koning, F. 2008.** Dominance of an alternative CLIP sequence in the celiac disease associated HLA-DQ2 molecule. **Immunogenetics60: 551 - 555**

**Weale, M.E. 2004.** A survey of current software for haplotype phase inference. **Human Genomics 1: 141 - 144**

**Wubbolts, R., Fernandez-Borja, M., Jordens, I., Reits, E., Dusseljee, S., Echeverri, C., Vallee, R.B., Neefjes, J. 1999.** Opposing motor activities of dynein and kinesin determine retention and transport of MHC class II-containing compartments. **J Cell Sci 112: 785 - 795**

## Y

**Yeager, M., Hughes, A.L. 1999.** Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination, and convergent evolution. **Immunological Reviews Volume 167, Issue 1, pages 45–58, February 1999**

## Z

**Ziegler, A. 2003.** Moleküle des MHC und olfaktorische Rezeptoren: Mögliche Bedeutung im Rahmen der Reproduktion. **J Fertil Reprod 13: 14 - 18**

**Zwart, W., Griekspoor, A., Kuijl, C., Marsman, M., van Rheenen, J., Janssen, H., Calafat, J., van Ham, M., Janssen, L., van Lith, M., Jalink, K., Neefjes, J. 2005.** Spatial separation of HLA-DM/HLA-DR interactions within MIIC and phagosome-induced immune escape. **Immunity 22: 222 - 233**

Lehrbücher:

**Abbas, A.K., Lichtman, A.H. 2005.** Cellular and Molecular Immunology: Updated Edition with Student Consult Access. **5. Auflage. Urban & Fischer Verlag / Elsevier GmbH**

**Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. 1990.** Molekularbiologie der Zelle. **2. Auflage, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge**

**Gemsa, D., Kalden, J.R., Resch, K. 1997.** Immunologie. **4. Auflage Thiemeverlag**

**Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. and Capra, J.D. 1999.** Immunobiology: the immune system in health and disease. **4th Edition, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, New York**

**Klein, J., Vaclav H. 1997.** Immunologie. **2. Auflage, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge**

**Lewin, B. 2002.** Gene: Lehrbuch der molekularen Genetik. **3. Auflage, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge**

**Stryer, L. 1999.** Biochemie. **Spektrum der Wissenschaft Verlag, Heidelberg, 4. Auflage, korrigierter Nachdruck**

**van den Tweel, J.G. 1999.** Immunologie: das menschliche Abwehrsystem. **Spektrum Akad. Verlag**

Webseiten:

**Becton Dickenson:** [www.bd.com](http://www.bd.com)  
Stand: 10.06.2010

**Cell biology:** <http://219.221.200.61/ywwy/zbsw%28E%29/edetail7.htm>  
Stand: 15.08.2010

**IMGT/HLA:** [www.ebi.ac.uk/imgt/hla/](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/)  
Stand: 23.09.2010

**Müller, C. 2003.** [www.medizin.uni-tuebingen.de/~webim2/abtii/hlalabor/hla.htm](http://www.medizin.uni-tuebingen.de/~webim2/abtii/hlalabor/hla.htm)  
Stand: 22.07.2010  
HLA-System: Organisation, Genetik, Struktur, Funktion und klinische Bedeutung.

**Wikipedia:** <http://de.wikipedia.org/wiki/Gendrift>  
Stand: 29.08.2010