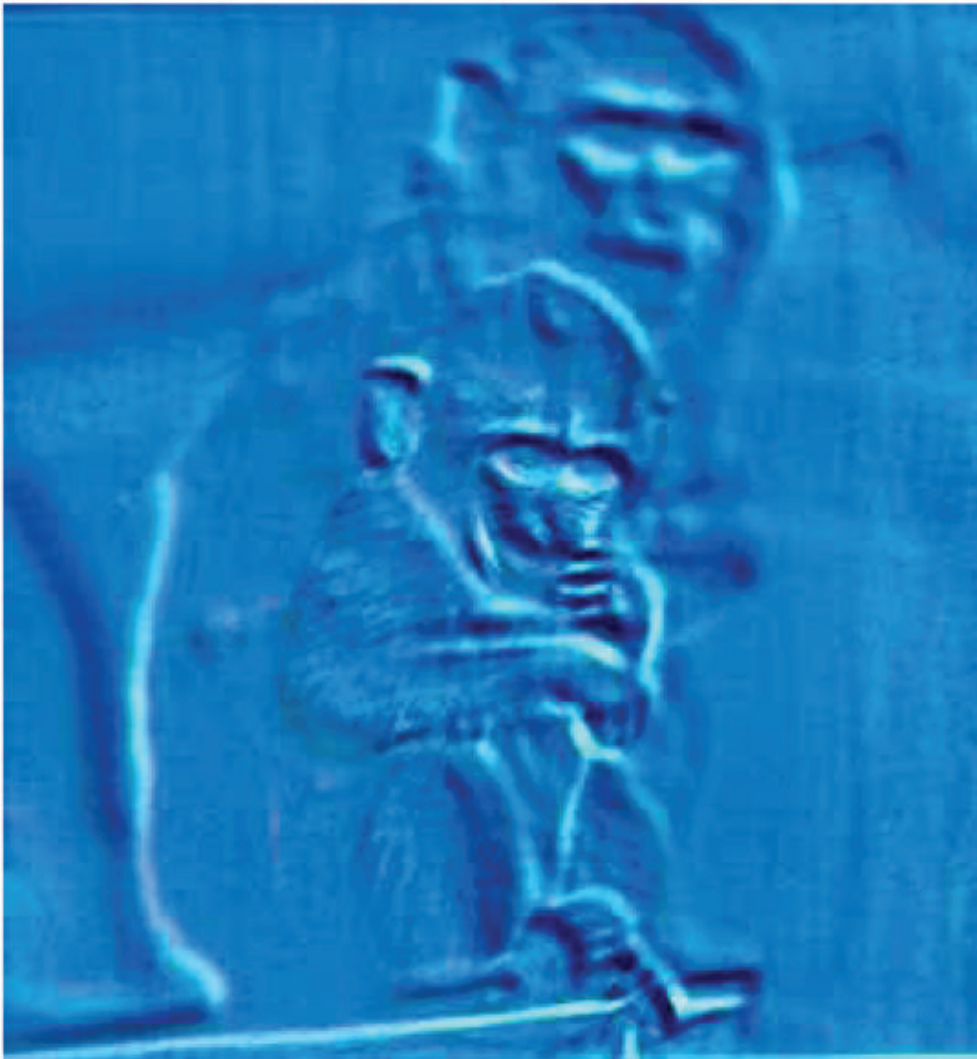

**Charakterisierung von MHC Klasse I-Molekülen aus
Rhesusaffen (*Macaca mulatta*)**



Charakterisierung von MHC Klasse I-Molekülen aus Rhesusaffen (*Macaca mulatta*)

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Thorsten Mühl

aus

Bergneustadt

Bonn

Januar 2002

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Mühl, Thorsten:

Charakterisierung von MHC Klasse I-Molekülen aus Rhesusaffen
(*Macaca mulatta*) / vorgelegt von Thorsten Mühl. -

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2002

Zugl.: Bonn, Univ., Diss., 2002

ISBN 3-89873-421-8

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

1. Referent:	Prof. Dr. N. Koch
2. Referent:	Prof. Dr. K. H. Scheidtmann
3. Referent:	Prof. Dr. G. Hunsmann
Tag der Promotion:	11. April 2002

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2002

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung
des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile
daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie)
zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2002

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-421-8

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das erworbene Immunschwäche Syndrom (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)	1
1.2	Die Struktur und Funktion des Immunsystems	2
1.3	Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC).....	5
1.3.1	Die Struktur und die Funktion der MHC-Moleküle.....	6
1.3.2	Die Gene der MHC-Moleküle	9
1.4	Der Rhesusaffe als Modell in der AIDS-Forschung.....	12
1.5	Aufgabenstellung	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Chemikalien und Radioisotope	14
2.1.2	Lösungen, Medien und Puffer	14
2.1.3	Oligonukleotide	15
2.1.4	Herkunft der DNA-Proben	16
2.1.5	DNA-Standards	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL) aus Vollblut	17
2.2.2	Isolierung von RNA	17
2.2.3	Isolierung von Poly-A ⁺ -RNA	17
2.2.4	Isolierung von DNA	17
2.2.4.1	Isolierung von DNA aus Lymphozyten	17
2.2.4.2	Isolierung von DNA aus gefrorenem Gewebe.....	18
2.2.5	Kontrolle der isolierten zytoplasmatischen RNA	18
2.2.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	18
2.2.7	Reverse Transkription	19
2.2.8	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	19
2.2.9	DNA-Präzipitation.....	19
2.2.10	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	20
2.2.11	Amplifizierung von MHC Klasse I cDNA-Sequenzen	20
2.2.12	Sequenzierungs-PCR	21
2.2.13	Nachweis der Mamu MHC-Allele mit der PCR mit sequenz-spezifischen Primern (PCR-SSP).....	21

2.2.14	Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)	22
2.2.15	DNA-Färbung in DGGE-Gelen	22
2.2.16	Agarosegelelektrophorese	23
2.2.17	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	23
2.2.18	Reinigung von PCR-Produkten	23
2.2.19	Sequenzierung und Allelbestimmung	24
2.2.20	Herstellung einer cDNA-Bank	24
2.2.21	Autoradiographie	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)- Analyse von MHC Klasse I-Genen von Rhesusaffen	25
3.2	Identifizierung neuer <i>Mamu</i> MHC Klasse I-Allele	29
3.3	Nachweis von <i>Mamu</i> MHC Klasse I A- und I B-Allelen mit allel- spezifischen Primern	36
3.4	Typisierung der <i>Mamu</i> MHC Klasse I-Gene von SIV-infizierten Rhesusaffen	37
3.5	Die Assoziationen von <i>Mamu</i> MHC Klasse I-Allelen mit einem langsamen Krankheitsverlauf	39
3.6	Einfluß der MHC Klasse I-Ausstattung auf die Virusbeladung und den Krankheitsverlauf von Rhesusaffen die mit lebend- attenuierten SIV infiziert worden waren	44
3.7	Aufbau einer cDNA-Bank	47
4	Diskussion	48
4.1	Identifizierung von <i>Mamu</i> MHC Klasse I-Allelen	49
4.2	Häufigkeitsverteilung von <i>Mamu</i> MHC Klasse I-Allelen	52
4.3	Sequenzvergleich und phylogenetische Analyse der neu identifizierten <i>Mamu</i> MHC Klasse I-Allele	54
4.4	<i>Mamu</i> MHC Klasse I-Peptidbindungsmotive und -taschen	55
4.5	Bedeutung und Einfluß der MHC Klasse I-Moleküle in der Immunantwort bei SIV/HIV-Infektionen	59
4.6	Wert des Rhesusaffenmodells in der HIV-Forschung	62

5	Zusammenfassung	64
6	Literaturverzeichnis	65
7	Abkürzungen	78
8	Anhang	81

1. Einleitung

1.1 Das erworbene Immunschwäche Syndrom (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)

1981 wurde in den USA erstmals ein Krankheitsbild beschrieben (Gottlieb et al., 1981; Masur et al., 1981), das uns heute als AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) bekannt ist. Diese Krankheit hat sich in der Zwischenzeit zu einer weltweiten Epidemie entwickelt, von der alle Kontinente betroffen sind. Bis jetzt sind etwa 22 Millionen Menschen an den Folgen von AIDS gestorben und 56 Millionen Menschen wurden mit dem Erreger der Krankheit infiziert. Diese Zahlen machen AIDS weltweit zur vierthäufigsten Todesursache (Piot et al., 2001).

Der Auslöser von AIDS, das HIV (human immunodeficiency virus) wurde 1983 entdeckt (Barré-Sinoussi et al., 1983) und 1984 isoliert (Gallo et al., 1984; Levy et al., 1984). Das HIV gehört zu den Retroviren. Diese Viren tragen ihre genetische Information in Form von zwei einzelsträngigen RNA-Molekülen und können mit Hilfe des viralen Enzyms Reverse Transkriptase RNA in DNA umschreiben. Das HIV befällt vorzugsweise T-Zellen, die CD4-Korezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen. An diesen Korezeptor bindet das Virus, kann mit der Wirtszelle verschmelzen und dadurch seine RNA in die Wirtszelle einschleusen. Anschließend wird die RNA mit Hilfe der Reverser Transkriptase in eine DNA-Kopie umgeschrieben. Diese Kopie integriert in das Genom der Wirtszelle und wird als Provirus bezeichnet. Dort wird die Virus-DNA von der Zelle mitrepliziert und vermehrt. Nach der Synthese der viralen Proteine und dem anschließenden Zusammenbau des Virus, werden die neuen Viren freigesetzt. Anfangs kann die Infektion vom Immunsystem noch unter Kontrolle gehalten werden. Später jedoch sinkt die Zahl der, für das Immunsystem sehr wichtigen, CD4⁺-T-Zellen drastisch ab und die Anfälligkeit für opportunistische Erreger steigt. Infizierte Personen sterben letztlich an Infektionen mit opportunistischen Erregern oder Krebs.

Vor diesem Hintergrund wird verständlich, warum das Wissen über das Immunsystem von besonderer Bedeutung ist. Ein besseres Verständnis der Immunantwort ist eine Voraussetzung für die Entwicklung eines Impfstoffes zum Schutz gegen AIDS. Bislang ist es jedoch noch nicht gelungen eine Vakzine zu entwickeln, die im Menschen einen Impfschutz bewirkt. Hierbei soll die Verwendung geeigneter Tiermodelle helfen. Das zur Zeit beste Tiermodell ist der Rhesusaffe, da sich, genau wie bei einer HIV-Infektion im Menschen, bei SIV-infizierten Rhesusaffen eine AIDS-ähnliche Krankheit entwickelt. Mit Hilfe dieses Modells werden mögliche Vakzine oder Therapien entwickelt.

1.2 Die Struktur und Funktion des Immunsystems

Während sich bei den Invertebraten im Verlauf der Evolution einige primitive Abwehrmechanismen gebildet haben, hat sich bei allen Vertebraten ein hoch entwickeltes, komplexes System zur Abwehr von Infektionserregern ausgebildet. Das Immunsystem schützt gegen Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten und einige ihrer Produkte. Eine wichtige Aufgabe des Immunsystems ist deshalb die Unterscheidung zwischen Fremd und Selbst. Die Bedeutung dieser Aufgabe wird z.B. bei Autoimmunerkrankungen deutlich, bei denen das Immunsystem gegen seinen Träger reagiert. Autoimmunerkrankungen rufen Gewebeschädigungen hervor, die mitunter tödlich enden können. Damit es nicht zu solchen Reaktionen kommt, werden durch verschiedene Selektionsmechanismen B-Lymphozyten, die körpereigene Proteine und T-Zellen, die körpereigene Antigene erkennen, inaktiviert oder eliminiert.

Die zur Verfügung stehenden Schutzmechanismen des Immunsystems können in zwei Bereiche eingeteilt werden, die angeborene und die adaptive Immunantwort. Die angeborene Immunität umfaßt unspezifische Immunreaktionen, die eine schnelle Antwort auf Pathogene ermöglichen. Zu den Abwehrmechanismen der unspezifischen Immunantwort gehören z.B. die Haut als anatomisches Hindernis für Mikroorganismen (MO) oder das Komplementsystem, das die Lyse von eingedrungenen, pathogenen MO bewirken kann.

Anders als die angeborene Immunität ist die adaptive Immunantwort hochspezifisch. Sie untergliedert sich in zwei Hauptkomponenten, die humorale oder Antikörper- und die zellvermittelte Immunantwort. Antikörper besitzen Antigenbindungsstellen mit extrem hoher Spezifität für ein bestimmtes Antigen. Weiterhin zeichnet sich die Antikörperantwort durch eine sehr hohe Flexibilität aus, so daß eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene erkannt werden kann. Die Variabilität der Bindungsstelle kommt durch die Mechanismen der genetischen Rekombination und somatischen Hypermutation der antikörperkodierenden Gene zustande. Gebundene Antikörper können zur Neutralisierung von z.B. Toxinen dienen, daß Komplementsystem aktivieren oder durch Opsonierung zur Eliminierung von MO durch Phagozytose von Makrophagen führen. Reife B-Lymphozyten, die sogenannten Plasmazellen, produzieren und sezernieren die Antikörper. Die Entstehung der Plasmazellen ist dabei von aktivierten T-Helferzellen abhängig. Eine naive B-Zelle, die ein Antigen gebunden hat, kann durch eine T-Helferzelle aktiviert werden. Die Aktivierung einer naiven B-Zelle führt zu deren Proliferation und Differenzierung in eine Plasma- oder Gedächtniszelle (immunologisches Gedächtnis). Plasmazellen exprimieren keinen B-Zell-Rezeptor mehr und produzieren große Mengen von Antikörpern mit derselben Spezifität wie der B-Zell-Rezeptor der Mutterzelle. Gedächtniszellen hingegen exprimieren konstitutiv B-Zell-Rezeptoren, die die gleiche Spezifität aufweisen wie der B-Zell-Rezeptor der ursprünglichen naiven B-Zelle. Gedächtniszellen haben außerdem die Fähigkeit, auf ein bekanntes Antigen stärker zu

reagieren als ungeprägte Lymphozyten. Durch die ständige Präsenz dieser Zellen, kann auf eine erneute Infektion durch ein bekannten Antigen sehr schnell reagiert werden. Die zellvermittelte Immunantwort wird durch die Stimulation von T-Zellen vermittelt. Dabei antworten T-Zellen auf die Stimulation ihres T-Zell-Rezeptors mit einer Proliferation, Differenzierung und der Sezernierung von Cytokinen. T-Zellen sind, anders als B-Zellen, nicht in der Lage mit ihrem hochspezifischen Rezeptor native Antigene zu binden. Sie erkennen Antigene immer nur im Kontext mit MHC I- oder II-Molekülen. Die Bindung an den Antigen-MHC-Komplex führt dann zur Proliferation und Differenzierung zu $CD4^+$ - oder $CD8^+$ -T-Zellen. Die Aufgaben der entstandenen T-Zellen unterscheiden sich dabei gravierend. $CD8^+$ -T-Zellen können zu zytotoxischen T-Zellen (cytotoxic T-lymphocytes, CTL) werden, die MHC Klasse I/Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche erkennen und deren Funktion die direkte Eliminierung infizierter Zellen ist. $CD4^+$ -T-Zellen hingegen erkennen MHC Klasse II/Peptid-Komplexe und dienen u.a. zur Aktivierung von Makrophagen und regen B-Zellen zur Antikörperproduktion an.

Insgesamt schafft das Immunsystem durch die spezifische Erkennung körperfremder Antigene und durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses einen Schutz, der es sowohl ermöglicht auf erstmalige Infektionen schnell zu reagieren als auch, bei sich wiederholende Infektionen, unmittelbar eine Immunantwort induzieren zu können.

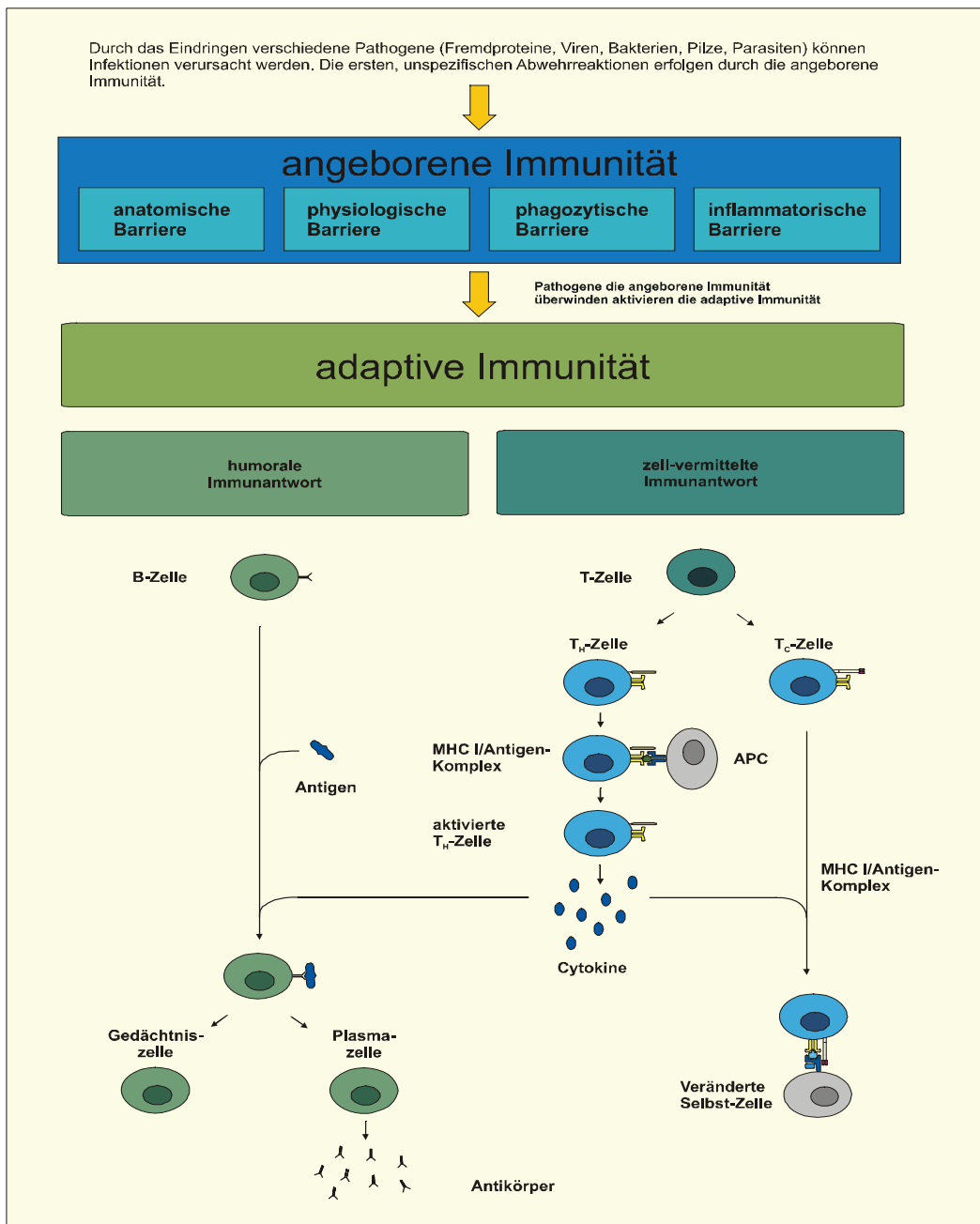


Abb. 1: Vereinfachte Übersicht über den Ablauf einer Immunantwort. Zum Schutz vor Infektionen stehen die zwei Systeme der unspezifischen angeborenen Immunität und der hochspezifischen adaptiven Immunantwort zur Verfügung. Die adaptive Immunantwort ihrerseits besteht aus der humoralen und der zell-vermittelten Immunantwort. In der humoralen Immunantwort interagieren B-Zellen mit Antigenen und differenzieren daraufhin zu Gedächtnis- oder Antikörper sezernierenden Plasmazellen. Die Antikörper binden weitere Antigene und erleichtern deren Entfernung. Die Gedächtniszellen ermöglichen schnelle Abwehrreaktionen gegen bekannte Antigene. Bei der zell-vermittelten Immunantwort werden Antigene unterschiedlichen Subpopulationen von T-Zellen präsentiert. $CD8^+$ -T-Zellen erkennen Antigene auf MHC Klasse I-Komplexen und bewirken deren Eliminierung. $CD4^+$ -T-Zellen sezernieren Cytokine nach der Erkennung eines Antigens auf einem MHC Klasse II-Molekül. Diese Cytokine haben Einfluß auf eine Reihe weiterer Reaktionen der nachfolgenden Immunantwort (modifiziert nach Osborne et al., Kuby Immunology)

1.3 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC)

Die vom Haupthistokompatibilitätskomplex kodierten antigenpräsentierenden Proteine spielen im Immunsystem der Vertebraten eine zentrale Rolle. Neben der Beteiligung an der Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“, sind sie sowohl an der Entwicklung der humoralen als auch der zell-vermittelten Immunantwort beteiligt. Die Erkennung von Pathogenen durch CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen ist abhängig von spezialisierten Molekülen, die Peptidfragmente dieser Pathogene an der Zelloberfläche präsentieren. Diese als MHC Klasse I- und II-Moleküle bezeichneten Proteine werden von den Genen des MHC-Komplexes kodiert. Der MHC wird beim Menschen auch als HLA (human leukocyte antigen) und beim Rhesusaffen als *Mamu*-MHC (*Macaca mulatta*) bezeichnet.

Tabelle 1: Krankheiten mit Assoziationen zu HLA-Allelen

Krankheit	assoziierte HLA-Allele
Infektionskrankheiten	
HIV-Verlauf	B35, A1-B8-DR3, B27, B57
Malaria	B53, DRB1*1302
Tuberkulose	DR2
Lepra	DR2
Hepatitis B persistent	DRB1*1302
Hepatitis C persistent	DR5
Autoimmunerkrankungen	
Diabetes Mellitus	DQ8, DR4/DR3
Multiple Sklerose	DR2
Myasthenia Gravis	DR3

Von einer Reihe von Krankheiten ist inzwischen bekannt, daß sie mit bestimmten Allelen des MHC-Komplexes assoziiert sind. Dazu gehören z.B. einige Autoimmunerkrankungen und Allergien. Weiterhin wurden Assoziationen mit der Suszeptibilität bzw. Resistenz gegen einige bakterielle und virale Erkrankungen festgestellt (Tab. 1; Hill, 1998). Hierzu gehört auch AIDS. Bislang konnten im Menschen noch keine starken Assoziationen mit bestimmten HLA-Allelen festgestellt werden, allerdings scheinen einige Haplotypen mit dem Krankheitsverlauf assoziiert zu sein (Jeannet et al., 1989; Kaslow et al., 1990; McNeil et al., 1996).

1.3.1 Die Struktur und die Funktion der MHC-Moleküle

Der humane MHC-Genkomplex ist in drei Regionen I – III untergliedert, die für unterschiedliche Klassen von MHC-Molekülen kodieren. Die Moleküle der Regionen I und II sind membrangebundene Heterodimere mit extrazellulär gelegenen Domänen, die auf die Bindung von Peptiden spezialisiert sind. Diese Moleküle sind evolutiv gesehen eng miteinander verwandt, unterscheiden sich jedoch in ihrer Struktur, ihrer Funktion und ihrem Expressionsmuster.

Die Gene in der MHC I-Region kodieren für die sogenannten Klasse I-Moleküle (Abb. 2). Diese membrangebundenen Glykoproteine finden sich auf fast allen kernhaltigen Zellen. Ihre Funktion ist die Präsentation von Peptidantigenen, die hauptsächlich von zytosolischen Proteinen abstammen (Jardetsky et al. 1991). Weiterhin können auch Peptide aus mitochondrialen Proteinen präsentiert werden (Loveland et al., 1990). Die cytosolischen Proteinen werden von einem multikatalytischen Proteasekomplex, dem Proteasom, im Cytosol abgebaut. Anschließend werden die Proteine in das Endoplasmatische Retikulum transportiert, wo sie an die MHC-Moleküle binden. Die Peptide werden CD8⁺ T-Zellen präsentiert. Im Falle körperfremder, an die MHC-Moleküle gebundener Peptide, führt die Erkennung durch die CD8⁺ T-Zellen zu deren Aktivierung und Differenzierung in zytotoxische T-Zellen (CTL). Die CTL eliminieren schließlich die infizierten, antigen-präsentierenden Zellen und verhindern damit die Ausbreitung viraler Infektionen.

Die MHC Klasse I-Moleküle bestehen aus zwei nicht kovalent miteinander verbundenen Polypeptidketten, der α -Kette und dem β_2 -Mikroglobulin (Björkman et al., 1987). Die α -Kette, die auch als schwere Kette bezeichnet wird, besitzt ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa und wird in der MHC-Region kodiert. Das β_2 -Mikroglobulin hingegen ist etwa 12 kDa schwer und seine kodierenden Gene liegen auf einem anderen Chromosom (z.B. Chromosom 15 beim Menschen). MHC Klasse I-Moleküle bestehen aus einer zytoplasmatischen Region (ca. 30 AS), einer Transmembranregion (ca. 40 AS) und einer extrazellulären Region. Diese Region wird von drei Domänen α_{1-3} gebildet, die jeweils aus 90 AS bestehen. Das β_2 -Mikroglobulin ähnelt in seiner Struktur der α_3 -Domäne.

Die Bindung der Peptide ist bei beiden Molekülen auf einen Bereich beschränkt, der als Peptidbindungsregion (PBR) bezeichnet wird. Die Struktur dieser Bereiche wurde aufgrund der Untersuchung der Kristallstrukturen der MHC Klasse I- und II-Moleküle aufgeklärt (Björkman et al., 1987a + b; Saper et al., 1991; Garboczi et al., 96; Brown et al., 93; Stern et al., 94). Die PBR der MHC Klasse I-Moleküle wird von den α_1 und α_2 -Domänen der schweren Kette gebildet. Der Bereich gleicht dabei einer Grube, deren Boden aus 8 antiparallel verlaufenden β -Faltblatt-Strukturen besteht und deren Ränder von 2 α -Helices gebildet werden. Im Bereich dieser Grube befinden sich auch die variabelsten Seitenreste,

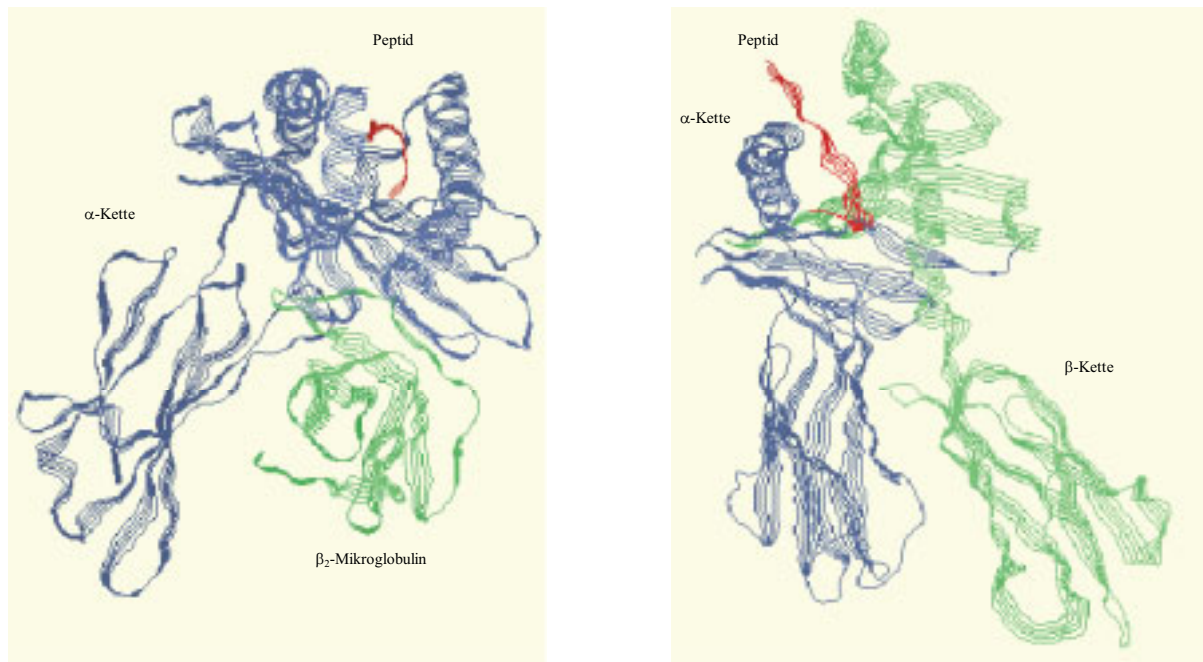


Abb.2: Schematische 3-dimensionale Strukturen eines MHC Klasse I- und II-Moleküls
 In (A) ist die Struktur eines peptidbeladenen MHC Klasse I-Moleküls dargestellt. Das Molekül ist ein Heterodimer und besteht aus einer α -Kette (blau) sowie dem nicht kovalent gebundenen β_2 -Mikro-globulin (grün). Die Bindung des Peptids (rot) erfolgt in einer Grube, deren Ränder von den Innen-seiten der α -Helices und deren Boden von β -Faltblattstrukturen gebildet wird. Im Gegensatz dazu besteht das MHC Klasse II-Molekül (B) aus den zwei Glykoproteinketten α (blau) und β (grün). Die peptidbindende Grube wird von beiden Molekülen gebildet und gleicht in ihrem Aufbau der des MHC Klasse I-Moleküls (RasWin Molecular Graphics, Windows Version 2.6)

die in die Grube hereinragen und sich auch auf der Oberfläche der α -Helices befinden. Die MHC Klasse I-Moleküle können in dieser Grube ausgestreckte Peptide mit einer Länge von 8-10 AS binden (Fremont et al., 1992; Jardetsky et al., 1991; Madden et al., 1991; Rötzschke et al., 1991). Dabei werden Peptide mit einer Länge von 9 AS bevorzugt gebunden. Die Bindung der Peptide in der Grube erfolgt über Aminosäureseitenengruppen, die in Taschen der PBR des MHC-Moleküls hineinragen. Diese Seitenengruppen werden als Verankerungsreste bezeichnet. Die wichtigsten Verankerungsreste befinden sich am C-terminalen Ende an Position 9 und am amino-terminalen Ende meistens an Position 2 und/oder 3 des Peptidantigens. Die C-terminalen Verankerungsreste sind dabei fast immer hydrophob oder basisch (Androlewicz et al., 1993; Shepherd et al., 1993; Momburg et al., 1994). Ein Teil der Aminosäuren des gebundenen Peptids können aus der Bindungsgrube herausragen. Aufgrund ihrer exponierten Lage können sie in einen direkten Kontakt mit dem T-Zellrezeptor treten. Durch die Lage der gebundenen Peptide und der oben erwähnten variablen Seitenreste besitzt jedes MHC-Molekül die Möglichkeit zur Bindung spezifischer Peptide und T-Zell-Rezeptoren.

Die MHC Region II hingegen kodiert für Glykoproteine die hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems exprimiert und als dendritische Zellen, Makrophagen sowie B- und T-

Lymphozyten bezeichnet werden. Diese Zellen präsentieren den T_H-Zellen mit Hilfe der MHC Klasse II-Molekülen Antigenpeptide die während des endozytischen Präsentations-weges durch die Degradation von Proteinen gebildet wurden.

Die MHC Klasse II-Moleküle bestehen aus zwei Peptidketten die ebenfalls nicht kovalent miteinander verbunden sind. Im Gegensatz zu den MHC Klasse I-Molekülen, werden beide Ketten von Genen in der MHC II Region kodiert. Die α -Kette besitzt ein Gewicht von ca. 33 kDa während die β -Kette im Bereich von 28 kDa liegt. Beide Ketten bestehen aus zwei extrazellulären Domänen (90-100 AS), einer Transmembranregion (20-25 AS) und einer zytoplasmatischen Region (12-15 AS). Die extrazellulären Domänen α_1 und β_1 bilden dabei die PBR. Die PBR der MHC Klasse II-Moleküle ist der der MHC Klasse I-Moleküle sehr ähnlich. Der Boden besteht ebenfalls aus β -Faltblatt-Strängen und die Ränder ebenfalls aus zwei α -Helices. Allerdings sind die Enden der Grube etwas weiter geöffnet als bei den Klasse I-Molekülen. Infolgedessen können hier, anders als bei den Klasse I-Molekülen, auch längere Antigene von 13-25 AS gebunden werden, da die Enden über die PBR hinausragen können (Newcomb & Cresswell, 1992; Hunt et al., 1992; Rudensky et al., 1991; Chicz et al., 1993). Die Enden der Peptide werden dabei nicht gebunden und spielen für die Antigenerkennung keine Rolle. Die Bindung kommt auch hier über Peptidseitengruppen zustande, die in flache und tiefe Taschen der Grube, die mit Aminosäureresten ausgekleidet sind, hineinragen. Weiterhin wird das Peptidrückgrat von Seitengruppen konservierter Aminosäurereste gebunden, die die Grube auskleiden. Die Bindung der Peptide ist im Vergleich zu Klasse I-Molekülen weniger abhängig von den individuellen Aminosäure-seitenketten (Brown et al., 1993).

Die in der MHC Region III kodierten Proteine sind sowohl von ihrer Struktur als auch von ihrer Funktion her sehr unterschiedlich und nicht mit den MHC Klasse I- und II-Molekülen verwandt. Allerdings besitzen die meisten der MHC Klasse III-Moleküle Aufgaben in der Immunantwort. Zu den Klasse III-Molekülen gehören lösliche Serumproteine, Komponenten des Komplementsystems, Tumor-Nekrose-Faktoren und Hitzeschockproteine.

1.3.2 Die Gene der MHC-Moleküle

Der menschliche MHC-Komplex ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 lokalisiert. Für den Rhesusaffen werden die Chromosomen zwei (Garvor et al., 1980) und fünf (Hirai et al., 1991) diskutiert. Insgesamt besitzt der MHC eine Länge von ca. ~ 4 Mb und besteht aus ca. 200 Genen.

Die MHC-Moleküle müssen in der Lage sein, eine Vielzahl unterschiedlicher Peptidantigene binden zu können. Dies wird dadurch ermöglicht, daß die MHC-Gene sowohl polygen als auch polymorph sind. Polygen bedeutet, daß es mehrere MHC Klasse I- und II-Gene mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten gibt. Weiterhin sind die Gene polymorph, daß heißt, es gibt von fast jedem Gen eine Anzahl individueller Varianten. Diese Varianten werden als Allele bezeichnet. Das Vorliegen vieler Allele eines Gens führt dazu, daß die meisten Individuen für diesen Locus heterozygot sind. Weiterhin werden die Produkte beider Allele codominant exprimiert. Durch die eben genannten Mechanismen wird eine hohe Variabilität der exprimierten MHC-Moleküle innerhalb einer Spezies erreicht.

Die in den MHC-Molekülen vorhandene Variabilität verteilt sich aber nicht zufällig über das gesamte Molekül, sondern ist in bestimmten Bereichen erhöht. So finden sich in den α_1 - und α_2 -Domänen der MHC Klasse I-Moleküle Bereiche mit einer erhöhten Variabilität. Die Stellen mit einer besonders hohen Variabilität befinden sich dabei an Positionen, die unmittelbar an der Bindung des Antigens beteiligt sind. Aufgrund dieser hohen Variabilität an den wenigen Bindungsstellen, ist es jedem Individuum möglich, eine große Zahl unterschiedlicher Antigene zu binden.

Die Genregion der menschlichen MHC Klasse I-Gene ist ca. 2 Mb lang und enthält ungefähr 20 Gene. Diese Gene sind in zwei Klassen, die klassischen und die nicht-klassischen MHC I-Gene unterteilt. Zu den klassischen Genen gehören die Loci der als A, B und C bezeichneten Region. Die Gene dieser Regionen kodieren für die antigenpräsentierenden MHC Klasse I-Moleküle. Bei den nicht-klassischen Genen handelt es sich in einigen Fällen um Pseudogene, während es auch Gene gibt, die für Klasse I ähnliche Proteine kodieren, die hoch spezialisierte Aufgaben besitzen. HLA-E und -G spielen z.B. bei der Erkennung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) eine Rolle (Callaghan & Bell, 1998)

Der Aufbau der MHC I-Genregion unterscheidet sich zwischen Menschen und Rhesusaffen. So findet sich beim Rhesusaffen ein komplizierterer Aufbau der MHC-I-Genregion. Während beim Menschen meist 6 Allele (2 A, 2 B, 2 C) exprimiert werden, sind beim Rhesusaffen bisher bis zu 12 Allele in einem einzelnen Tier nachgewiesen worden. Untersuchungen haben ergeben, daß Makaken bis zu 2 A- und bis zu 4 B-Loci besitzen (Boyson et al., 1996; Urvater et al., 2000).

Die MHC Klasse I-Region zeichnet sich durch einen hohen Grad an Polymorphismus aus, wie an den Zahlen der bereits veröffentlichten Allele zu sehen ist. So sind im Menschen bis

jetzt 225 A-Allele, 444 B-Allele und 111 C-Allele gefunden worden (IMGT/HLA Sequence Database; <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>). Für den Rhesusaffen liegen bislang nur wenige Daten vor, aber es ist davon auszugehen, daß auch hier ähnlich hohe Allelzahlen zu finden sind. Im Gegensatz dazu, ist ein *HLA-C*-Homolog weder in Rhesusaffen (Boyson et al., 1996), noch in Orang-Utans oder Gibbons (Chen et al., 1992) vorhanden. Dieser Locus findet sich aber sowohl im Gorilla als auch in Schimpansen wieder, was auf die engere Verwandtschaft des Menschen mit diesen Spezies zurückzuführen ist.

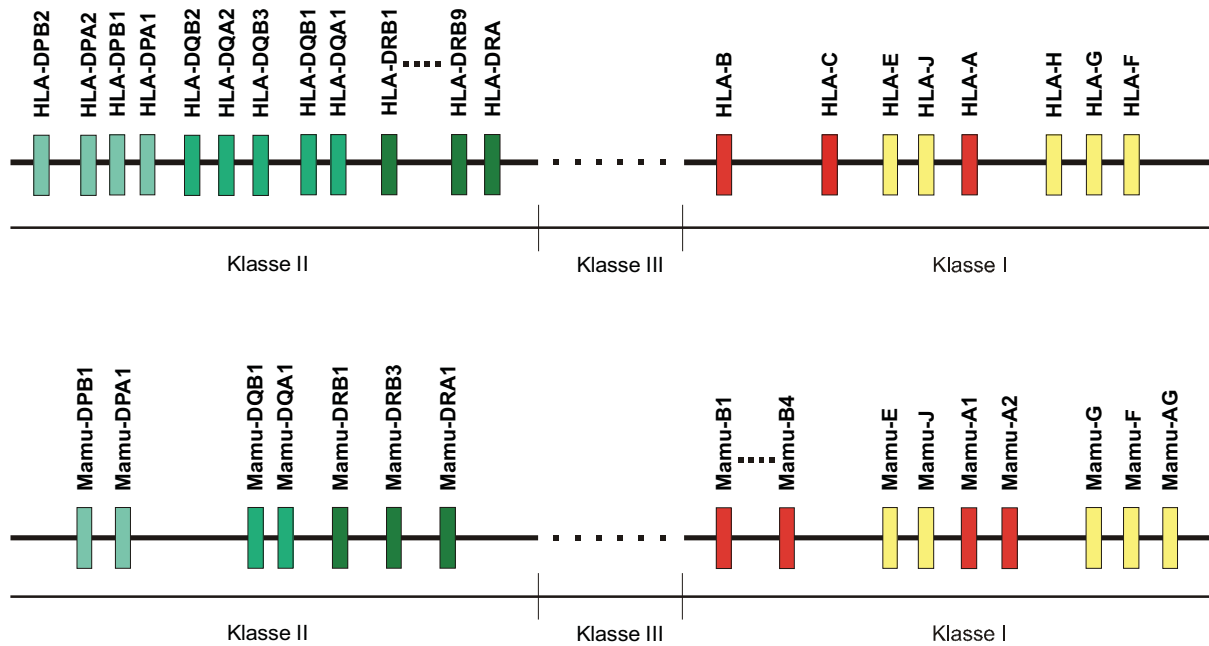


Abb. 3: Genomische Karte des menschlichen und des Rhesusaffen-MHC.

Dargestellt ist in vereinfachter Form die Organisation der Klasse I- und Klasse II-Regionen des menschlichen und des Rhesusaffen-MHC. Die klassischen MHC Klasse I-Gene sind zur Verdeutlichung in rot und die nicht klassischen MHC Klasse I-Gene in gelb dargestellt. Die MHC II-Gene sind in grün gezeichnet und die MHC Klasse III-Gene werden nicht aufgeführt.

Neben den klassischen MHC I-Loci finden sich im Rhesusaffen auch Homologe zu den nicht-klassischen humanen Loci. Hierbei handelt es sich um die MHC Klasse I-Loci *Mamu-E*, *Mamu-F* und *Mamu-G* (Otting & Bontrop, 1993; Boyson et al., 1995; Castro et al., 1996; Arnaiz-Villena et al., 1997). Im Gegensatz zum humanen *HLA-G*, ist das *Mamu-G*-Homolog inaktiviert (Boyson, 1996; Castro et al., 1996). Die ursprüngliche Funktion scheint ein *HLA-A* ähnliches Gen, *Mamu-AG*, möglicherweise eine Duplikation eines A-Gens, zu übernehmen (Boyson et al., 1997).

Der MHC Klasse II-Komplex des Menschen ist in drei Regionen *HLA-DR*, *-DQ* und *-DP* unterteilt. Diese Unterteilung findet sich auch beim Rhesusaffen. Beim Menschen wurde ein funktionelles Genpaar *HLA-DQA1-DQB1* und ein Pseudogenpaar *HLA-DQA2-DQB2*, in der *DQ*-Region identifiziert (Okada et al., 1985). Ein drittes *DQB*-Gen liegt ebenfalls in Form eines Pseudogens vor. Insgesamt wurden bisher mehr als 47 *DQB*- und mehr als 22 *DQA*-

Allele publiziert. Der Rhesusaffe hingegen besitzt in dieser Genregion jeweils ein funktionelles *DQA*- und ein *DQB*-Gen. Bislang wurden für die *DQA* Gene und *DQB*-Gene 20 bzw. 35 Allele gefunden. Zieht man die im Vergleich zum Menschen geringe Anzahl der untersuchten Individuen in Betracht, ist der Polymorphismus der Rhesusaffen-*DQ*-Gene höher als beim Menschen.

Bei den *HLA-DP*-Genen des Menschen findet man ebenfalls zwei Genpaare, nämlich *HLA-DPA1-DPB1* und *HLA-DPA2-DPB2*. Dabei sind die Gene *HLA-DPA2* und *HLA-DPB2* nicht funktional. Bis jetzt wurden im Menschen 20 *DPA1* und 96 *DPB1*-Allele identifiziert. Im Gegensatz dazu scheinen die *DP*-Gene beim Rhesusaffen einen geringen Polymorphismus zu zeigen. So wurden bislang lediglich 15 *DPB1*-Allele und ein monomorphes *DPA1*-Gen gefunden.

Tab. 2: Übersicht über die Gen- und Allelhäufigkeiten bei Mensch und Rhesusaffe

		Klasse I								Klasse II					
		A	B	C	E	F	I	G	AG	DQ		DP		DR	
										α	β	α	β	α	β
Mensch	Gene	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1-6
	Allele	225	444	111	6	1	0	15	0	22	47	20	96	2	358
Rhesus- affe	Gene	1-2	1-4	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1-6
	Allele	16	15	0	1	1	18	7	7	20	35	1	15	1	>95

Allelzahlen für HLA aus IMGT/HLA Sequence Database (www.ebi.ac.uk/imgt/hla)
 Allelzahlen für Rhesusaffe aus NCBI Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Wie schon in der *HLA-DP* und der *Mamu-DP*-Region findet sich auch bei den *DR*-Genen ein monomorphes *DRA*-Gen (Sliereendregt et al., 1994). Im Gegensatz zu den anderen Unterregionen der MHC Klasse II-Region, kennzeichnet aber die *DRB*-Gene sowohl im Menschen als auch im Rhesusaffen ein hoher Grad an Polymorphismus. Im Rhesusaffen wurden bislang 95 Allele identifiziert, während im Menschen schon weit über 300 Allele bekannt sind, wobei diese Zahlen ständig anwachsen. Allein die Anzahl an Allelen belegt die besondere Stellung der *DR*-Gene für das Immunsystem. Ein weiteres Merkmal der *DR*-Region ist, daß die Anzahl der *DR*-Gene nicht konstant ist und zwischen zwei und sechs Genen pro Haplotyp variiert (Bontrop et al., 1999). Dieser Längenpolymorphismus gilt sowohl für den Menschen als auch für den Rhesusaffen.

1.4 Der Rhesusaffen als Modell in der AIDS-Forschung

Nicht-menschliche Primaten sind exzellente Modelle für humane Krankheiten, da sie bemerkenswerte Ähnlichkeiten hinsichtlich der Anatomie, Physiologie und Endokrinologie mit dem Menschen besitzen (Nath et al., 2000). So dient der Rhesusaffe für eine Reihe von Krankheiten als Modell wie für Multiple Sklerose (Rose et al., 1994), Hepatitis (Arankalle et al., 1995; Tsarev et al., 1997), Malaria (Fujioka et al., 1994) und AIDS (Hulskotte et al., 1998; Rausch et al., 1999). Da die Nukleotidsequenzen von SIV und HIV-1 und -2 zudem eng verwandt sind (Chakrabarti et al., 1987; Franchini et al., 1987) bieten sich nicht-humane Primaten besonders hier als Modell an. Neben dem Rhesusaffen werden Grüne Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*), Paviane (*Papio hamadryas*), Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) und Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) in der AIDS-Forschung verwendet

Die Spezies die vor allem verwendet werden, sind allerdings der Schimpanse (*Pan troglodytes*) und der Rhesusaffe. Die genetische Nähe des Schimpansen zum Menschen ist ein gutes Argument für seine Verwendung bei der Erforschung von AIDS, allerdings sprechen ethische, finanzielle und experimentelle Gründe dagegen. So kommt es bei den meisten Schimpansen bei einer Infektion mit HIV nicht zur Ausbildung eines typischen Krankheitsbildes und auch nicht zu den üblichen Symptomen wie z.B. der Abnahme der CD4⁺ T-Zellen.

Im Gegensatz dazu erzeugt die Infektion mit SIV bei den meisten asiatischen Makaken innerhalb eines Jahres nach der Infizierung AIDS-ähnliche Symptome (Daniel et al., 1985; Klatzmann et al., 1984; King et al., 1990) Im Vergleich zum Schimpansen können bei SIV-infizierten Makaken ein Anstieg der Virusbelastung und der Abfall der CD4⁺-Zellzahl beobachtet werden. Die Ähnlichkeiten innerhalb der Immunsysteme von Makake und Mensch (Boyson et al., 1996; Jaeger et al., 1993; Slierendregt et al., 1992; Watkins, 1994) sowie in der Pathogenese von AIDS, sprechen für Makaken als Modell. Diese Ähnlichkeit besonders in Bezug auf den MHC I- (Boyson et al., 1996; Watkins, 1995), den MHC II- (Slierendregt et al., 1992) und den T-Zellrezeptor-Locus (Bontrop et al., 1995; Levinson et al., 1992) machen diese Spezies zu einem hervorragenden Modell für Studien von humanen Krankheiten, insbesondere AIDS (Johnson et al., 1996). Ein wichtiger Vorteil des Rhesusaffen ist hier, daß dieser in relativ großer Anzahl gezüchtet wird und so über eine ausreichend hohe Anzahl an Tieren verfügt werden kann. Bei den meisten anderen Affenarten ist dies nicht der Fall. Die meisten Pathogenitäts- und Vakzinestudien für HIV-1 werden deshalb heute in SIV/SHIV-infizierten Rhesusaffen durchgeführt.

1.5 Aufgabenstellung

Der Rhesusaffe dient heute als Modell für eine Anzahl von menschlichen Erkrankungen, vor allem als präklinisches Modell für AIDS. Von besonderer Bedeutung ist dabei der MHC-Komplex, der im Immunsystem eine zentrale Rolle einnimmt. Funktion und Aufbau dieses Genkomplexes wurden bisher hauptsächlich beim Mensch und der Maus untersucht. Dabei konzentrierten sich die Untersuchungen überwiegend auf die MHC Klasse II-Gene. Der Grund hierfür ist der einfachere experimentelle Nachweis der MHC Klasse II-Allele. Für MHC Klasse II-Moleküle wurden Assoziationen mit dem Krankheitsverlauf bei SIV-infizierten Rhesusaffen bereits nachgewiesen (Sauermaun et al., 2000). Es wird aber immer deutlicher, daß auch die virus-spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort und damit die MHC Klasse I-Ausstattung, eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Virusreplikation in SIV-infizierten Tieren spielt (Brodie et al., 1999; Schmitz et al., 1999).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die genetische Charakterisierung der MHC Klasse I-Gene des Rhesusaffen. Zunächst müssen dafür PCR-Methoden zur Amplifizierung der *Mamu* MHC Klasse I A- und B-Gene sowie die Methode der DGGE (Fischer & Lerman, 1983) zur Auftrennung der *Mamu* MHC Klasse I-Allele optimiert werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit soll an einer größeren Zahl von SIV-infizierten Tieren untersucht werden, ob deren MHC Klasse I-Allele mit langsamen Krankheitsverlauf von AIDS assoziiert sind. Für diese Untersuchungen war die Etablierung von Screening-Methoden (PCR-SSP) notwendig, die eine schnelle Typisierung bestimmter MHC Klasse I-Allele ermöglichen. Damit wäre die Möglichkeit gegeben, Tiere, die für langsamen und/oder schnellen Krankheitsverlauf von AIDS prädisponieren, für weitergehende Experimente vor Versuchsbeginn auszuwählen.

Eine Begrenzung des Rhesusaffen-Modells liegt in der geringen Anzahl bekannter CTL-Epitope und der restringierenden MHC Klasse I-Moleküle, die für weitere Untersuchungen der Immunantwort benötigt werden. Quantitative Analysen der antigen-spezifischen T-Zell-Populationen während der Immunantwort können mittlerweile mit der Methode des Tetramer-Stainings durchgeführt werden (Altman et al., 1996; Ogg et al., 1998). Voraussetzung für die Entwicklung der Peptid-MHC-Tetrameren ist dabei die Bestimmung von Bindungsmotiven.

Aus diesem Grund soll eine cDNA-Bank aus B-Zelllinien eines SIV-infizierten langzeitüberlebenden Tieres (longterm non-progressor; LTNP) hergestellt werden, um vollständige cDNA-Klone zu erhalten. Die stabile Expression von Klonen die MHC Klasse I-cDNA-Sequenzen enthalten, die mit dem Krankheitsverlauf assoziiert sind, würde die Identifizierung der Peptidbindungsmotive dieser MHC Klasse I-Moleküle ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Radioisotope

Alle Lösungen und Puffer wurden mit doppelt destilliertem Wasser (H_2O_{dd}) angesetzt. Falls nicht anders vermerkt wurden die Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt, BRD), ICN (Eschwege, BRD) und Roth (Karlsruhe, BRD) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen. Radioisotope wurden über die Firma Amersham (Buckinghamshire, GB) bezogen.

2.1.2 Lösungen, Medien und Puffer

Die verwendeten Lösungen, Medien und Puffer und ihre Zusammensetzungen sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Lösungen, Medien und Puffer

Lösungen, Medien und Puffer:	Zusammensetzungen:
Probenpuffer	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 15% [w/v] Ficoll Type 400
DGGE-Probenpuffer	0,05 % Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol, 70% Glycerin
1 x TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM Na_2 -EDTA, pH 8,0
1 x TAE	40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM Na_2 -EDTA, pH 8,0
1 x TAE _{mod.}	40 mM Tris-Acetat, 0,1 mM Na_2 -EDTA, pH 8,0
1 x TBE	0,1 M Tris-HCl, 0,1 M Borsäure, 2 mM Na_2 -EDTA, pH 8,0
1 x STE	10 mM Tris-Cl pH 8,0, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0
PBS	120 mM NaCl, 17 mM Na_2HPO_4 , 3 mM KH_2PO_4 , pH 7,2
1 x Lysispuffer	10 mM Tris pH 8,2, 40 mM NaCl, 1 mM EDTA
LB-Medium	1% [w/v] Bacto-Tryptone, 0,5% [w/v] Yeast-extract, 1% [w/v] NaCl
LB-Agar	LB-Medium + 1,5% [w/v] Agar
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium (Bio Whittaker, Verviers, Belgien); supplementiert mit 10% [v/v] hitzeinaktiviertem FCS (Pan Biotech, Aidenbach, BRD), 1% [v/v] Penicillin / Streptomycin (10000 Units/10 mg/ml) (PAA, Linz, Österreich)

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 4 aufgeführt. Oligonukleotide wurden von den Firmen ARK (Darmstadt, BRD) und MWG (Ebersberg, BRD) bezogen und waren HPLC bzw. HPSF gereinigt.

Tabelle 4: Auflistung der benutzten Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5´ - 3´):	Frag- ment- größe ² [bp]	Primer [pmol/ Ansatz]	Kontroll- primer ⁴ [pmol/ Ansatz]	T _A ³ [°C]
A-DGGE-for	ATG GCG CCG CGA ACC CTC CTC CTG G	592	15		62
A-DGGE-rev	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CTG GTG GGT CAC ATG TGT CTT G				
B-DGGE-for	ATG GCG CCC CGA ACC CTC CTC CTG C	523	20		64
B-DGGE-rev	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC TAT CTG CCG AGC CAC TCC				
A-Seq-for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG GCG CCG CGA ACC CTC	562	15		62
A-Seq-rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CGG TGC AGC GTC TCC TTC	487	20		64
B-Seq-for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGA CCT GGG CCG GCT CGC				
B-Seq-rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC TAT CTG CGG AGC CAC TCC	685	20	4	66
Mamu A*01 for ¹	GAC AGC GAC GCC GCG AGC CAA				
Mamu-A*01 rev ¹	GCT GCA GCG TCT CCT TCC CC	408/167	20	4	62
Mamu-A*02 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGT GGA GCA GGA GGG TCC A				
Mamu-A*02 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC TCG TAG GCG GAC TGG TG	668/427	18	2	61
Mamu-A*04 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCA TGA GCT ATT TCT ACA CCT A				
Mamu-A*04 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GGT AGG TTC TGT GCT GCT C	611/370	20	4	64
Mamu-A*08 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCT TGA GGT ATT TCT ACA CCG				
Mamu-A*08 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GCA GCC ATG TCC GCT GCC	579/336	20	4	64
Mamu-A*11 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGG AGC CCC GCT TCT TCA				
Mamu-A*11 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC TTC TGA GCC GCC ATG TCC C	669/428	18	2	60
Mamu-A*13 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG AGG TAT TTC TAC ACC TCC A				
Mamu-A*13 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CCA GGT AGG CTC TCA TCC T	672/431	20	2,5	61
NA4 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TCC ATG AGG TAT TTC TAC ACC A				
NA4 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CCA GGT AGG CTC TCA TCC T	606/365	20	2,5	64
NA7 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG AGG TAT TTC TAC ACC TCC A				
NA7 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CGC CAC ATC CGC CGC GAA	530/286	20	10	62
Mamu-B*01 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT ACC GGG AGA CAC GGA AGG				
Mamu-B*01 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC AGC CAC TCC ACG CAC CGG	635/392	20	3	60
Mamu-B*03 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAT GAG GTA TTT CAG CAC CTC				
Mamu-B*03 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CAC TTG CGC TGG GTT A	691/448	20	5	58
Mamu-B*04 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTC CAT GAG GTA TTT CAG CG				
Mamu-B*04 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ACG CAC GTC CCC TCC AGA	694/451	20	3	62
Mamu-B*05 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TGG GGT ATT TCT ACA CCG CCG				
Mamu-B*05 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GAG CCA CTC CGG GCA CTC G	638/395	18	4	60
Mamu-B*07 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGT ATT TCA GCA CCG CCG TA				
Mamu-B*07 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CAC TTG CGC TGG GTG AAC C	614/371	20	2	60
Mamu-B*09 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TTG AGG TAT TTC GGC ACC ACA				
Mamu-B*09 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC TGA GCC GCC TCA CCC GCA	624/381	21	3	63
Mamu-B*12 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCC GGG AAC CCT GGT ATC				
Mamu-B*12 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GAA CCG CTC CGC ATA ACG GT	482/239	21	2	64
Mamu-B*17 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCG ACA CGG AGA GCC AAG GA				
Mamu-B*17 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CCG CTC CGC ATA ACG GTT CC	666/423	18	2	62
NB2 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT ACT CCA TGA GGT ATT TCA CC				
NB2 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CTT CTG CTC CGC CAC ACG	624/381	20	3	61
NB4 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCC GGG AAC CCT GGT ATG				
NB4 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GAA CCG CTC CGC ATA ACG GT	541/298	20	5	62
NB5 for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCC CGC TTC ATC TCC GTG				
NB5 rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC TCG TAG GCG TCC TGC CGG	260			
MDRB5´	GCC TCG AGT GTC CCC CCA GCA CGT TTC				
3´MDR	GCC GCA GCT TTC ACC TCG CCG CTG				

¹ Knapp et al., 1997; ² Fragmentlänge mit bzw. ohne Intron; ³ Annealingtemperatur (T_A); ⁴ MDRB5´+ 3´MDR

Die Oligonukleotide für die *Mamu*-Klasse I-Allele wurden anhand der veröffentlichten Sequenzen des Rhesusaffen-MHC in der GenBank sowie der selber gefundenen Sequenzen konstruiert. Alle allelespezifischen Primer besitzen Bindungsbereiche für die in der Sequenzierung verwendeten M13-Primer.

2.1.4 Herkunft der DNA-Proben

Die Proben stammen von SIV-infizierten Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), die im Rahmen verschiedener Versuche am DPZ gehalten wurden. Die Affen waren indischen Ursprungs und stammten vom Carribbean Primate Research Center (CPRC) und vom Laboratory Animal Breeder and Services of Virginia (LABS).

2.1.5 DNA-Standards

Für die Größenbestimmung von PCR-Fragmenten in Agarosegelen wurden die DNA-Standards PEQGOLD 1 kb DNA-Leiter und PEQGOLD Leitemix (Peqlab, Erlangen, BRD) verwendet. Die Mengenbestimmung gereinigter PCR-Produkte erfolgte durch den Vergleich mit einem 50 ng-Mengenmarker.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL) aus Vollblut

Die PBL wurden aus Citratblut von Rhesusaffen isoliert. Dazu wurden 3 ml Ficoll (Pancoll, PanBiotech, Aidenbach, BRD) mit Affenblut überschichtet. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 1100 g und 4° C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Lymphozytensaum an der Interphase zwischen Ficoll und zellfreiem Plasma abgenommen, mit PBS gewaschen und bei 250 g für 5 min bei 10° C zentrifugiert. Die Lymphozyten wurden nochmals in PBS gewaschen und bei RT für 5 min bei 6800 g abzentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

2.2.2 Isolierung von RNA

Die zytoplasmatische RNA wurde aus $\sim 2 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ B-Zellen oder PBL isoliert. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits (RNeasy-Kit Midi, Qiagen, Hilden, BRD) entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Die RNA-Ausbeute pro 10^7 Zellen betrug ca. 40 – 60 µg. Die RNA-Lösungen wurden bei –20° C gelagert.

2.2.3 Isolierung von Poly-A⁺-RNA

Für die Isolierung von Poly-A⁺-RNA wurde zytoplasmatische RNA (s. 2.2.2) verwendet. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Oligotex mRNA-Kit, Qiagen, Hilden, BRD) entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Grundsätzlich wurden alle Ansätze zweimal gereinigt um eine optimale Sauberkeit der Poly-A⁺-RNA zu gewährleisten. Die Ausbeute an Poly-A⁺-RNA pro 10^7 Zellen betrug ca. 0,5 - 1 ng. Die mRNA-Lösungen wurden anschließend bei –80° C gelagert.

2.2.4 Isolierung von DNA

2.2.4.1 Isolierung von DNA aus Lymphozyten

Für die Isolierung von DNA aus Lymphozyten werden diese wie unter 2.2.1 beschrieben aus Citratblut isoliert. Das Lymphozytenpellet wird in 500 µl 1 x Lysispuffer, 40 µl 10% SDS und

40 µl Proteinase K (20 mg/ml) suspendiert. Die Proben wurden über Nacht bei 56° C im Wasserbad inkubiert. Der Ansatz wird anschließend mit 160 µl 6 M NaCl-Lösung versetzt und bei 8000 upm für 5 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wird zuerst mit 1 Volumen Isopropanol und nachher mit 1 Volumen 70 % Ethanol gewaschen, die DNA abzentrifugiert und in TE-Puffer gelöst.

2.2.4.2 Isolierung von DNA aus gefrorenem Gewebe

Für die Isolierung von DNA aus Autopsiematerial wurde auf in flüssigem Stickstoff eingefrorenes Milzgewebe zurückgegriffen. Mit einem sterilem Skalpell wurde ein ca. 20 mg schweres Stück abgetrennt. Das Gewebestück wurde in ein ERG mit 885 µl H₂O_{dd} und 50 µl 20 x STE-Puffer gegeben und mit einem Pistill (Eppendorf, Hamburg, BRD) im ERG homogenisiert. Anschließend wurden 50 µl 10%ige SDS-Lösung und 30 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und der Ansatz bei 56° C über Nacht im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden 330 µl 6M NaCl-Lösung zugegeben und der Ansatz bei 4000 rpm 10 min zentrifugiert. Die Probe wurde je einmal mit Isopropanol und 80% Ethanol gewaschen. Die isolierte DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und kann so in der PCR verwendet werden.

2.2.5 Kontrolle der isolierten zytoplasmatischen RNA

Die Qualität der isolierten RNA wurde in einer Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.16) überprüft. Bei intakter, isolierter RNA zeigen sich zwei Banden, die der 28S- und 18S-RNA entsprechen. Das Mengenverhältnis zwischen den beiden Banden sollte bei 3:1 liegen.

2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in Lösung wurde die optische Dichte (OD) bei 260 nm in einem Photometer (GeneQuant II, Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) ermittelt. Eine Extinktion von OD₂₆₀=1 entspricht einer DNA- bzw. RNA-Konzentration von 40 µg/ml bzw. 33 µg/ml (Sambrook et al., 1989). Die Reinheit der RNA-Lösung wurde durch die Messung der OD bei 260 nm und 280 nm überprüft. Weitgehend reine DNA-Lösungen haben ein OD_{260/280}-Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0 (Marmur & Doty, 1962), während dieser Wert für RNA-Lösungen zwischen 1,9 und 2,1 (in 10 mM TrisCl, pH 7,5) liegt.

2.2.7 Reverse Transkription

Mit Hilfe der Reversen Transkription wird mRNA in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden 4 µg RNA zusammen mit 2 µg random Primer (GibcoBRL, Gaithersberg, USA) und einem entsprechenden Volumen DEPC-H₂O_{dd} für 10 min bei 70° C inkubiert um mögliche Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Die reverse Transkription erfolgte in einem Gesamtvolumen von 40 µl mit 40 U RNasin (Promega, Heidelberg, BRD), 1 mM dNTP, 10 mM DTT, 1 x First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) und 600 U Reverse Transkriptase (SuperScript™ RNase H⁻ Reverse Transkriptase; Life Technologies, Karlsruhe, BRD). Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 10 min bei RT und anschließend für 30 min bei 42° C inkubiert. Durch eine abschließende Inkubation für 10 min bei 70° C wurde die Transkription gestoppt. Die synthetisierte cDNA wurde als Template in einer PCR verwendet.

2.2.8 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Die Reinigung von Nukleinsäurelösungen lässt sich mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion zuverlässig durchführen (Maniatis et al., 1989). Hierzu wurde der cDNA-Ansatz im Verhältnis 1:5 mit DEPC-H₂O_{dd} vermischt. Anschließend wurde die gleiche Menge einer Phenol-Chloroform-Lösung (1:1 Verhältnis Phenol / Chloroform) zugegeben, durchmischt und für 5 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Die obere, DNA-haltige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert. Die obere DNA-haltige Phase wurde danach mit EtOH präzipitiert.

2.2.9 DNA-Präzipitation

Die DNA-Präzipitation wurde zur Konzentration der cDNA aus der Phenol-Chloroform-Extraktion eingesetzt. Dazu wurden die DNA-haltigen Lösungen mit dem 2,5 fachen Volumen an 100 % EtOH und 1/10 Volumen einer 3 M NaAC-Lösung (pH = 5,5) versetzt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde bei 4° C und 13000 rpm für 20 min zentrifugiert. Das cDNA-Pellet wurde nochmals mit 70% EtOH gewaschen, um etwaige Phenolreste zu entfernen. Nach einer weiteren Zentrifugation von 4 min bei RT und 13000 rpm wurde der Überstand vollständig entfernt und die cDNA in 20 µl H₂O_{dd} aufgenommen.

2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die PCR ist eine effiziente *in vitro*-Methode um DNA-Abschnitte in großer Menge spezifisch zu amplifizieren. Die gesuchten DNA-Abschnitte müssen dazu zwischen bekannten DNA-Sequenzen liegen. Für eine Amplifikation benötigt man Oligonukleotidprimer, die zu den bekannten DNA-Sequenzen komplementär sind, Desoxynukleotidtriphosphate und ein geeignetes Puffer / DNA-Polymerase-System. Nach einer Denaturierung der DNA lagern sich die Primer an die komplementären Templatessequenzen an und die DNA-Polymerase verlängert die Primer entlang der denaturierten DNA. Für eine weitere Syntheserunde werden die doppelsträngigen DNA-Stränge erneut denaturiert und durch die folgende Anlagerung von Primern kommt es zu einer weiteren Synthese von DNA. Theoretisch wird bei jeder Syntheserunde die DNA-Menge verdoppelt. Im Gegensatz zu der Amplifizierung von DNA-Abschnitten, wurde bei der RT-PCR cDNA als Template eingesetzt.

Alle PCR-Methoden besitzen eine hohe Sensitivität und sind anfällig für Kontaminationen. Deshalb wurde eine strikte räumliche Trennung zwischen DNA- bzw. RNA-Isolierung, Ansetzen der Proben und der PCR-Reaktion sowie der Amplifikation eingehalten. Es wurden grundsätzlich nur sterile Lösungen und Einwegartikel verwendet und alle Arbeiten erfolgten an Sterilarbeitsplätzen.

2.2.11 Amplifizierung von Mamu Klasse I-cDNA-Sequenzen

In einer PCR wurden die cDNA-Abschnitte amplifiziert, die später in der denaturierenden Gradientengelelektrophorese getrennt werden sollten. Vorversuche hatten gezeigt, daß sich die MHC Klasse I-DNA am besten mit einem speziellen PCR-System für GC-reiche Sequenzen (GC-Rich-PCR System, Boehringer, Mannheim, BRD) amplifizieren ließ. Vorversuche ergaben, daß eine Konzentration von 0,5 M einer als GC-RICH resolution solution bezeichneten Pufferlösung die Ausbeute der PCR verbesserte. Für die PCR-Reaktionsansätze wurden jeweils Volumina von 50 µl angesetzt.

Für die Amplifizierung der MHC Klasse I-A-Allele wurden 5 µl gereinigte cDNA, je 15 pmol Primer, 200 µM dNTPs, 10 % GC-RICH resolution solution (v/v), 1 x PCR-Puffer und 1 U GC-RICH-PCR System Enzym-Mix eingesetzt. Die Ansätze wurden anschließend mit 50 µl Paraffin überschichtet. Die Amplifizierung erfolgte in 30 Zyklen in UNO II PCR-Thermocyclern der Fa. Biometra, Göttingen. Zuerst wurde die DNA für 3 min bei 95° C denaturiert. Anschließend folgten 30 Zyklen mit 95° C für 30 s (Denaturierung), 62° C für 30 s (Primeranlagerung) und 72° C für 40 s (Elongation). Abschließend folgte ein weiterer Elongationsschritt bei 72° C für 3 min. Die Amplifizierung der MHC Klasse I-B-Allele erfolgte in identischen Ansätzen, allerdings mit 15 pmol B-DGGE-Primern mit einer

Anlagerungstemperatur von 64° C. Die erhaltenen PCR-Fragmente konnten nun in die DGGE eingesetzt werden.

2.2.12 Sequenzierungs-PCR

Für die Herstellung von Proben zur Sequenzierung wurden je 5 µl Eluat (s. 2.2.11), 15 pmol je A-Sequenzierungs- bzw. B-Sequenzierungs-Primer, 200 µM dNTPs, 10 % GC-RICH resolution solution (v/v), 1 x PCR-Puffer und 1 U GC-RICH-PCR System Enzym-Mix eingesetzt. Die Ansätze wurden mit 50 µl Paraffin überschichtet. Die Amplifizierung wurde gemäß den Angaben aus 2.2.11 durchgeführt. Die Proben wurden in einer Agarosegelelektrophorese analysiert, gereinigt und zur Sequenzierung an die Fa. SeqLab (Göttingen, BRD) verschickt.

2.2.13 Nachweis der Mamu-MHC-Allele mit der PCR mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP)

Die Mamu MHC-Allele wurden mit der PCR-SSP nachgewiesen. Mit dieser Methode können einfach und schnell Allele in großen Probenzahlen nachgewiesen werden.

Die verwendeten PCR-Ansätze hatten ein Volumen von 25 µl. Für die Amplifizierung der *Mamu A*- und *B*-Allele wurden 70 - 110 ng genomische DNA, 200 µM dNTPs, 10 % GC-RICH resolution solution (v/v), 1 x PCR-Puffer und 1 U GC-RICH-PCR System Enzym-Mix eingesetzt. Die verwendeten Mengen der sequenzspezifischen Primer sowie der Primer MDRB5' und 3'MDR zur internen Kontrolle sind der Tab. 4 zu entnehmen. Die Ansätze wurden mit 20 µl Paraffin überschichtet. Die Amplifizierung erfolgte in einem Uno II Thermocycler (Biometra, Göttingen, BRD) bei 95° C für 3 min und 28 Zyklen mit 95° C für 30 s und 58°-62° C (s. Tab. 4) für 40 s, 72° C für 40 s sowie einem abschließenden Elongationsschritt für 3 min bei 72° C. Die Fragmente wurden danach in einer Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt und identifiziert.

2.2.14 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Die DGGE ist eine Methode zum Nachweis von Mutationen. Hierbei kann es sich sowohl um einzelne Basenaustausche als auch um kleinere Deletionen oder Insertionen handeln. In der Regel werden mit der DGGE PCR-Produkte analysiert. Die Funktionsweise der DGGE basiert darauf, daß DNA Fragmente nach ihrem Schmelzpunkt aufgetrennt werden, da eine partielle Aufschmelzung doppelsträngiger DNA zu einer Änderung ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im Gel führt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt in einem Polyacrylamidgel, das einen linearen Gradienten an denaturierenden Reagenzien aufweist (Formamid und Harnstoff). Die Denaturierung der DNA wird außerdem dadurch erleichtert, daß das Gel bei einer konstant erhöhten Temperatur gefahren wird. Für die DGGE wurde das DC-Code System (Biorad, München, BRD) verwendet.

Für die Auftrennung der MHC Klasse I-Allele wurden routinemäßig Gele mit 10 % Acrylamidanteil (37,5:1 Acrylamid:Bis-Acrylamid) und einem Gradienten von 55 % - 60 % denaturierender Reagenzien (100 % denaturierenden Reagenzien = 7 M Harnstoff und 40 % Formamid) verwendet. Die Menge an Probe pro Tasche war je nach Ausgangsmaterial verschieden. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit DGGE-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt. Der Gellauf erfolgte bei 130 V und 60° C über 9 h mit 1 x TAE als Laufpuffer. Die getrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von SYBR™-Green angefärbt und sichtbar gemacht (s. 2.2.15). Nach der Färbung wurden die Banden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde in 50 µl H₂O über Nacht bei RT eluiert. Die anschließende Lagerung der Eluate erfolgte bei -20° C.

2.2.15 DNA-Färbung in DGGE-Gelen

Die in der DGGE aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch eine SYBR™-Green-Färbung (Biozym, Hess. Oldendorf, BRD) sichtbar gemacht. Der interkalierende Farbstoffe SYBR™-Green wurde wegen der höheren Empfindlichkeit gegenüber Ethidiumbromid verwendet. Zur Färbung wurde das Gel in einer 1:10000 SYBR™Green- / 1 x TAE-Puffer-Lösung für 30 min inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden mit einer UV-Lampe (Saur, Reutlingen, BRD) bei 312 nm sichtbar gemacht. Die Ergebnisse wurden mit einem Bildverarbeitungssystem (EagleEye, Stratagene, La Jolla, USA) dokumentiert.

2.2.16 Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese in Agarosegelen dient zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten (Maniatis et al., 1982; Sambrook et al., 1989; Sealy & Southern, 1982). Die zu analysierenden Fragmente wurden in Horizontalgelen mit 1 % Agarose [w/v] (Biozym, Hess. Oldendorf, BRD) in TBE-Puffer getrennt. Zur Anfärbung der DNA wurden 5 µl Ethidiumbromidlösung (0,1 % [w/v]) pro 100 ml Gelvolumen zugegeben. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit 1/5 ihres Volumens Probenpuffer versetzt. Als Längenstandard wurde 1 µg 1 kb-Leiter (GibcoBRL, Gaitersburg, USA) (Hartley & Gregori, 1981) in Probenpuffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V in einer Horizontalelektrophoresekammer (Renner, Dannstadt, BRD) mit 1 x TBE als Laufpuffer. Die DNA-Fragmente wurden mit einer UV-Lampe (Saur, Reutlingen, BRD) bei 254 nm sichtbar gemacht. Die Ergebnisse wurde mit einem Bildverarbeitungssystem (EagleEye, Stratagene, La Jolla, USA) dokumentiert.

2.2.17 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

PCR-Produkten können durch eine Extraktion der Amplikons direkt aus einem Agarosegel gereinigt werden. Hierzu wurden die PCR-Produkte über ein 1 %iges TAE_{mod}-Agarosegel bei 120 V über ca. 1 h in 1 x TAE_{mod} als Laufpuffer getrennt. Anschließend wurden die entsprechenden Banden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in Zentrifugeneinheiten des Herstellers Millipore (Ultrafree-DA, Bedford, USA) extrahiert. Die Reinheit und der Menge der gewonnenen DNA wurde mit einer weiteren Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.18 Reinigung von PCR-Produkten

Für die direkte Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem PCR-Ansatz wurden Microcon-Zentrifugen-Filtereinheiten der Firma Millipore (Bedford, USA) verwendet. Die Reinigung wurde gemäß der Anleitung der Hersteller durchgeführt. Die Reinheit und der Menge der gewonnenen DNA wurde mit einer weiteren Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.19 Sequenzierung und Allelbestimmung

Die gereinigten DNA-Fragmente wurden von der Firma SeqLab, Göttingen sequenziert. Die gefundenen Allele wurden durch Vergleiche mit in der GenBank veröffentlichten Sequenzen mittels Blastsearch bestimmt (NCBI; Bethesda, USA; <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme Dnasis (Hitachi Software, Olivet Cedex, Frankreich) und Bioedit (Tom Hall, Dep. of Microbiol. North Carolina State University; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) ausgewertet.

2.2.20 Herstellung einer cDNA-Bank

Die Erzeugung dieser cDNA-Klonen und Zelllinien ist die Voraussetzung für die funktionelle Untersuchung von MHC Klasse I-Proteinen. Deshalb sollte eine cDNA-Bank aus B-Zelllinien eines SIV-infizierten LTNP hergestellt werden. Die Isolierung der Poly-A⁺-RNA Isolierung wurde wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Für die Herstellung einer cDNA-Bank wurde das SuperScript™ Plasmid System with Gateway™ Technology for cDNA Synthesis and Cloning (Life Technologies, Karlsruhe, BRD) verwendet. Die Herstellung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Es wurden 2-4 µg Poly-A⁺-RNA eingesetzt. Zur Überprüfung der Erststrang-Synthese und der Größenfraktionierung der cDNA, wurden Aliquots der Proben in einer Agarosegelelektrophorese analysiert und die Ergebnisse durch Autoradiographie (s.2.2.21) sichtbar gemacht. Der Ertrag der Erststrang-DNA-Synthese und die Ergebnisse der Größenfraktionierung wurden durch die Messung der Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Unitec Technologies Packard, Dreieich, BRD) überprüft.

2.2.21 Autoradiographie

Der Nachweis radioaktiv markierter cDNA erfolgte durch eine direkte Autoradiographie. Die cDNA wurde auf Agarosegelen getrennt, die anschließend getrocknet wurden. Die getrockneten Gele wurden in einer Filmkassette gegen X-OMAT AR-Filme (Kodak, Rochester, USA) exponiert. Die Filme wurden in einem Entwicklerautomaten (Kodak, Rochester, USA) entwickelt.

3. Ergebnisse

3.1 Die denaturierende Gradientenelektrophorese (DGGE)-Analyse von MHC Klasse I-Genen aus Rhesusaffen

Zur Trennung der MHC Klasse I-Allele wurde die Methode der DGGE-Analyse verwendet. Die DGGE ist eine elektrophoretische Methode zur Identifizierung einzelner Basenaustausche oder auch kleinerer Deletionen oder Insertionen (Fischer & Lerman, 1983). Diese Methode wird zur Identifizierung von

MHC Klasse II-Allelen verwendet (Knapp et al., 1997) und sollte hier für die Identifizierung von *Mamu* MHC Klasse I-cDNA-Sequenzen optimiert werden. Mit Hilfe der optimierten Methode wurden die MHC-Klasse I-Gene von zwei langzeitüberlebenden Affen sowie zehn anderen Tieren mit z.T. identischen MHC Klasse II Regionen (Tab. 5) untersucht. Eine Untersuchung der MHC Klasse I-Allele der MHC Klasse II identischen Tiere erscheint sinnvoll, da diese Tiere z.B. die Virusvermehrung unterschiedlich gut kontrollierten. Die genetische Prädisposition der MHC-Klasse I-Region könnte für diese Unterschiede verantwortlich sein. Durch die Bestimmung der MHC Klasse I-Allel-Sequenzen dieser Tiere sollten mögliche Assoziationen zwischen dem Krankheitsverlauf und genetischer Ausstattung erkannt werden. Hierfür

wurden MHC Klasse I A- und I B-Allele in einer RT-PCR amplifiziert und über eine DGGE aufgetrennt. Die PCR-Produkte waren ca. 600 bp lang und umfaßten das 1. Exon mit der „leader-Sequenz“, das 2. und 3. polymorphe Exon, die für die peptidbindenden Domänen kodieren und den Anfang des 4. Exons. Die Grundlage dieser Methode für die mögliche Unterscheidung von verschiedenen DNA-Sequenzen ist, daß doppelsträngige DNA in einer denaturierenden Umgebung in bestimmten Teilbereichen, den Schmelzdomänen, aufschmilzt. Die Schmelztemperatur der einzelnen Domänen ist dabei sequenzspezifisch.

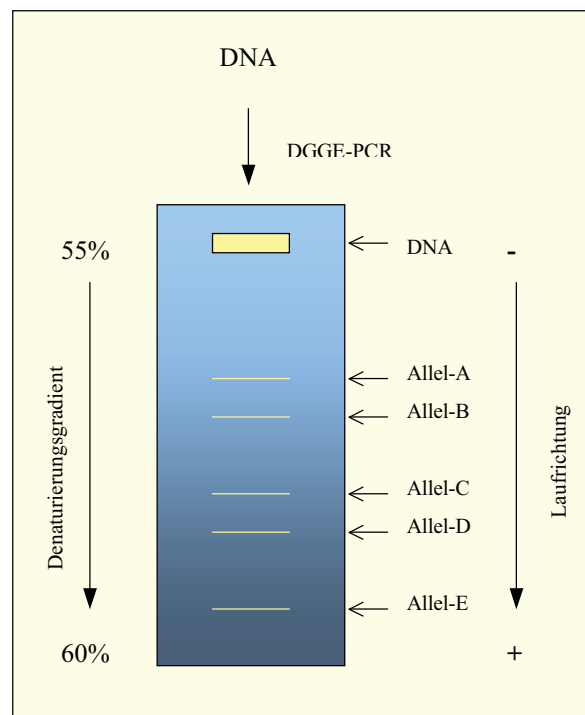


Abb.4: Schemazeichnung einer Auftrennung von DNA in einer parallelen DGGE

Die zu untersuchende DNA wird mit speziellen Primern amplifiziert und während des Laufes entsprechend ihrer Schmelztemperatur aufgetrennt. Bei einer parallelen DGGE ist der denaturierende Gradient parallel zur Elektroforeserichtung.

Durch die Aufschmelzung der DNA ändert sich deren Laufgeschwindigkeit im Gel. Die Änderung der Laufgeschwindigkeit ist daher ebenfalls sequenzspezifisch und es kommt zu

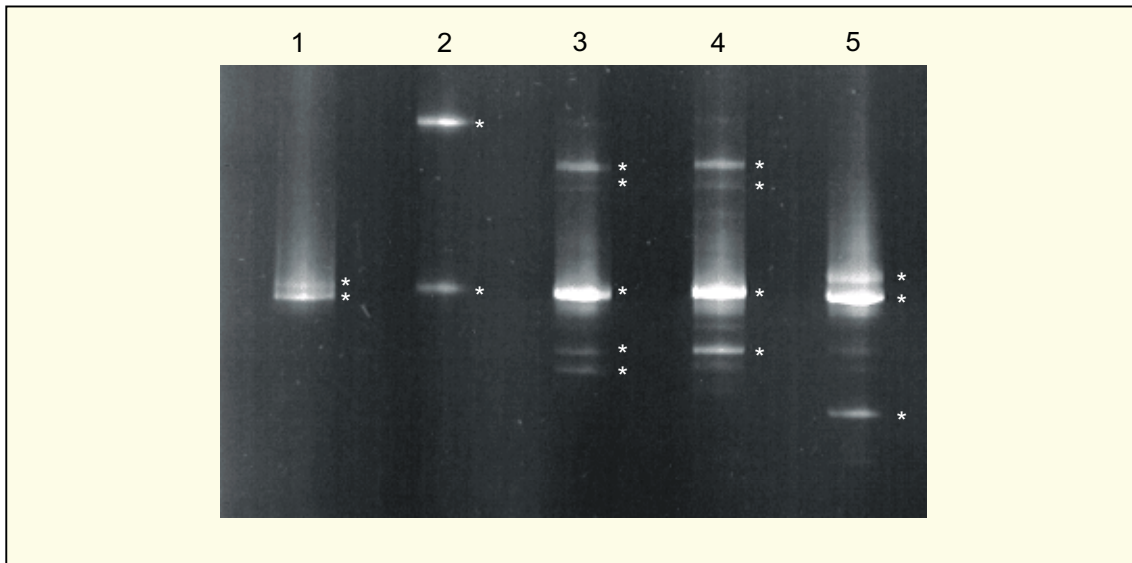


Abb. 5: Parallele *Mamu-B*-DGGE

Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer parallelen DGGE mit *Mamu-B*-PCR-Produkten von 5 Tieren (Spur 1: 8768, Spur 2: 8482, Spur 3: 8785, Spur 4: 9038, Spur 5: 7069). Die DGGE erfolgt bei 130 V und 60° C über 9 h. Der lineare Gradient an Harnstoff und Formamid im Gel liegt zwischen 55% und 60%. Die Polyacrylamidkonzentration beträgt 10 %. In den Spuren sind die Banden, die aus dem Gel ausgeschnitten und aus denen DNA eluiert wurde, mit einem * (weißer Stern) gekennzeichnet.

einer Auftrennung der DNA in Fragmente gleicher Länge, aber unterschiedlicher Sequenz (s. Abb. 4). Eine optimale Auflösung in der DGGE kann erreicht werden, wenn die DNA-Moleküle nicht vollständig denaturieren und die zu untersuchende Region sich in der Domäne mit der geringsten Schmelztemperatur befindet. Durch das Anfügen einer 30-40 bp langen GC-Klammer an einen der Primer können die o.g. Voraussetzungen erfüllt werden (Myers et al., 1985; Wu et al., 1998).

Die Abbildung 5 stellt das Ergebnis einer DGGE dar. Es zeigt sich eine deutliche Auftrennung der eingesetzten PCR-Produkte, zu sehen an den distinkten Banden in den entsprechenden Spuren. Zur Identifizierung der PCR-Produkte, wurden die Banden nach dem Lauf ausgeschnitten und eluiert. Ein Teil des Eluats wurde in einer PCR verwendet, deren Produkte direkt sequenziert wurden. Grundsätzliche Schwierigkeiten der hier verwendeten Methode lagen darin, daß die PCR-Produkte ca. 600 bp lang waren. Damit lagen sie an der oberen Auflösungsgrenze der DGGE. Außerdem befanden sich die polymorphen Regionen nicht unbedingt in der niedrigsten Schmelzdomäne und es entstanden während der PCR Heteroduplexbanden. Beim Auftreten von Heteroduplices wurde ein Teil der Probe für eine weitere DGGE-PCR eingesetzt und die entstandenen Produkte erneut auf ein Gel aufgetragen, um doch noch eine Trennung der Allele zu erreichen. Die Sequenzen

eindeutiger Proben wurden mittels des Blast-Programmes mit schon bekannten Mamu-MHC Sequenzen in der Genbank verglichen. Neue Allele wurden vorwärts und rückwärts sequenziert, um die Sequenzen zu bestätigen. Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von der Firma Seqlab (Göttingen, BRD) durchgeführt. Die Ergebnisse der MHC Klasse I-Charakterisierung und der DGGE sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Von zwei Tieren konnten mittels der DGGE keine Allele nachgewiesen bzw. isoliert werden. Bei Tier 8482 konnten keine A-Allele amplifiziert werden. Der Grund liegt möglicherweise darin, daß die verwendete RNA dieses Affen aus Lymphozyten isoliert wurde, die zu einem Zeitpunkt gewonnen wurden, zu dem das Tier bereits an AIDS erkrankt war. Eventuell war die MHC Klasse I-Expression zu diesem Zeitpunkt schon stark inhibiert, so daß nicht mehr alle MHC Klasse I-Transkripte nachgewiesen werden konnten (Collins et al., 1998). Die Analyse der DNA-Sequenz des Affen 9535 zeigte, daß das Tier wahrscheinlich 3 *Mamu B*-Allele exprimiert. Die Allele ließen sich aber durch die DGGE nicht trennen.

Tabelle 5: *Mamu*-A- und B-Allele der untersuchten Tiere aus der DGGE

Tier	1891	1937	1948	8768	8785	8790	9026	9038	9529	9535	7069	8482
Virus-replikation:	++	-	++	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-	-/+
A-Allele:	A*02 A*04 A*1302	A*04 NA7	A*04 A*08 NA4	A*04 NA6	A*04 A*11	A*04	A*11	A*02 A*08 A*1302		keine A-Allele gefunden	A*01	keine A-Allele gefunden
B-Allele:	B*12	B*12	B*12	B*01	B*01			B*01	B*01	*		
					NB3	NB2	NB2				NB5	NB4
				NB6								

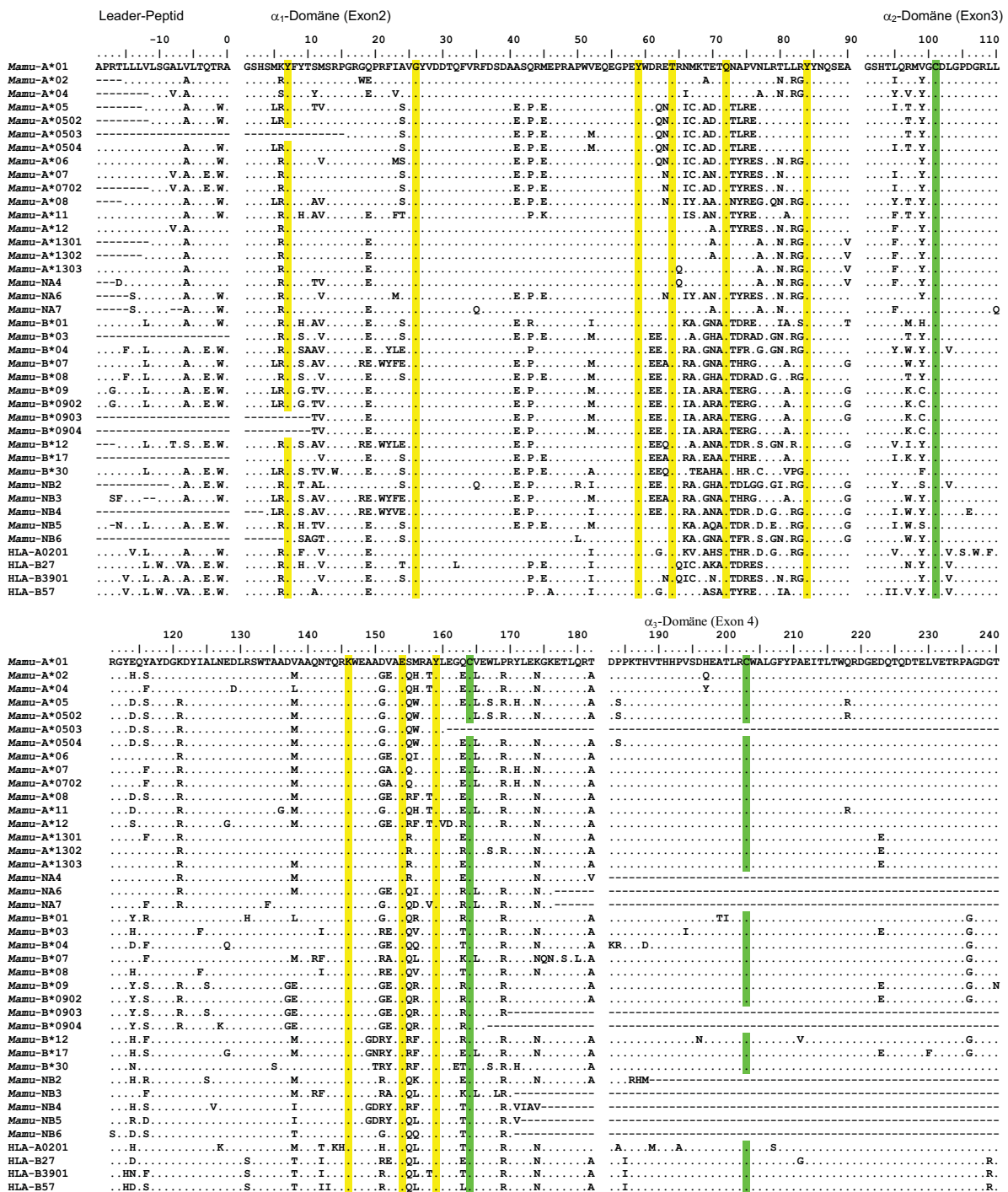
NA: neue *Mamu*-A-Allele; NB: neue B-Allele. *: Auf dem DGGE-Gel war nur eine Bande zu erkennen, die aber aus den PCR-Produkten von 3 B-Allelen besteht.

Bei der Analyse der *Mamu*-A-Allele wurden die bereits publizierten Allele *Mamu*-A*01, -A*02, -A*04, -A*08, -A*11, -A*1302 sowie 3 neue Allele gefunden, die als NA4, NA6 und NA7 bezeichnet wurden (Tab. 5). Von besonderer Bedeutung ist das Allel *Mamu*-A*01. Dieses Allel ist eines der wenigen Rhesusaffenallele für das Epitope charakterisiert wurden, die Untersuchungen der virus-spezifischen CTL-Immunantwort ermöglichen (Evans et al., 2000). Dieses Allel kommt hier, bei den in der DGGE untersuchten Tieren, nur in Tier 7069, einem

sogenannten LTNP (long-term nonprogressor) (Spring et al., 1998), vor. Bei der Analyse der *Mamu-B*-Allele wurden die bereits publizierten Allele *Mamu-B*01* und *-B*12* sowie 4 neue Allele gefunden, die mit *NB2* – *NB6* bezeichnet werden (Tab. 5). Die Allele *NB4* und *NB5* wurden in den Tieren 7069 und 8482 gefunden, die ebenfalls in der DGGE analysiert wurden.

3.2 Identifizierung neuer Mamu MHC Klasse I-Allele

Mit Hilfe der DGGE wurden während der Charakterisierung der o.g. 12 Tiere insgesamt 8 neue Mamu MHC Klasse I-Allele gefunden. Es handelte sich dabei um 3 Mamu MHC Klasse I A-Allele die mit NA4, NA6 und NA7 bezeichnet wurden, sowie um die 5 neuen Mamu MHC Klasse I B-Allele NB2, NB3, NB4, NB5 und NB6. In den Abbildungen 6 und 7 wurden die Aminosäuren- und die Nukleotidsequenzen der neuen Allele mit einigen bisher publizierten Allelsequenzen verglichen. Die Zuordnung der gefundenen Allele zu den Mamu-A und -B Genloci ist dabei eindeutig. Auffallend ist die Ähnlichkeit einiger neuer und publizierter Sequenzen untereinander.



Ergebnisse

	Transmembrandomäne										Zytoplasmatische Domäne														
	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340															
Mamu-A*01	FQKWA	VVP	SGEE	QRYT	CHVQ	HEGLPKP	HTLKW	EPFS	QSTIP	MVGLI	AGLVLL	GA	VVTG	AVVA	AVMW	RRKSS	DRK	GG	SS	QAAS	SDSA	GGSD	VSL	TACKV	
Mamu-A*02		K				RE	L	R		S		LI		I	I	I									
Mamu-A*04		K	H							S		I				V									
Mamu-A*05		K								S		I			T										
Mamu-A*0502		K								S		I			T										
Mamu-A*0503																									
Mamu-A*0504		K								S		I			T										
Mamu-A*06		E								S															
Mamu-A*07										S		E													W
Mamu-A*0702		K								S		E													W
Mamu-A*08		K								S															
Mamu-A*11		K								S		I													K
Mamu-A*12		K								S															
Mamu-A*1301			S							S					I										
Mamu-A*1302			S							S					I										
Mamu-A*1303			S							S					I										
Mamu-NA4																									
Mamu-NA6																									
Mamu-NA7																									
Mamu-B*01		G								S		I		V	AV	AV									GG
Mamu-B*03		G		H						S		I		V	AV	AV									GG
Mamu-B*04		G				Q				S		I		VG	AV	AV									GG
Mamu-B*07										S		I		V	AV	AV									GG
Mamu-B*08		G								S		I		V	AV	AV									GG
Mamu-B*09										S		IM		V	AV	AV									GG
Mamu-B*0902		G								S		IM		V	AV	AV									GG
Mamu-B*0903										S		IM		V	AV	AV									GG
Mamu-B*0904										S		IM		V	AV	AV									GG
Mamu-B*12		G								S		IM		V	AV	AV									GG
Mamu-B*17		G								S		I		V	AV	AV									GG
Mamu-B*30		G					K			S		I		V	AV	VAL									GA
Mamu-NB2																									
Mamu-NB4																									
Mamu-NB5																									
Mamu-NB6																									
HLA-A0201			Q							S		P		I		F									
HLA-B27																									
HLA-B3901										S		V		I		V									GG
HLA-B57										S		V		I		V									GG

Abb. 6: Vergleich einiger abgeleiteter Aminosäuresequenzen verschiedener humaner und Rhesus-affen MHC Klasse I-Allele. Die Sequenzen umfassen die extrazellulären Domänen α_{1-3} , die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische Domäne. Der Polymorphismus der MHC Klasse I-Moleküle ist vorwiegend in den Exons 2 und 3 zu finden, wie sich an den Sequenzen erkennen lässt. Gelb hinterlegt sind Aminosäurereste der PBR die sowohl in Säugetieren als auch in Vögeln konserviert sind. Die grün gekennzeichneten Aminosäuren sind konservierte Cysteinreste, die für die Bildung von Disulfidbrücken in den α_2 - und α_3 -Domänen verantwortlich sind.

So stimmen z.B. die Nukleotidsequenz und die Aminosäuresequenz des Allels NA4 bis auf 2 nichtsynonyme Nukleotidaustausche bzw. Aminosäuren mit den Sequenzen von *Mamu-A*1303* überein. Neben den Vergleichen der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurde ein phylogenetischer Baum erstellt. Die Konstruktion erfolgte mit Hilfe der neighbor-joining-Methode und die genetischen Abstände wurden mittels der Maximum-Likelihood-Analyse berechnet. Die Bootstrap-Analyse wurde mit 1000 Wiederholungen durchgeführt. In der Abbildung werden dabei nur die Werte über 50% aufgeführt. Als Daten für die Berechnung wurden die Aminosäuresequenzen des „leader“-Peptids sowie des 2. und 3. Exons verwendet. Die beiden Exons kodieren für die peptidbindenden Domänen der MHC Klasse I-Moleküle und beeinflussen somit unmittelbar die Bindung von Antigenen.

Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, liegen einige der *Mamu* MHC Klasse I-Allele in Gruppen angeordnet vor. Die Allele *Mamu-A*1301-1303* stehen anscheinend in enger Beziehung zu *Mamu-A*01*, -NA4 und -NA7. Diese Annahme wird unterstützt durch einen relativ hohen Resampling-Wert von 75%. Einen gemeinsamen Ursprung mit den eben genannten Allelen besitzen mit hoher Wahrscheinlichkeit auch *Mamu-A*02* und -A*04, wie der Resampling-Wert von 79% zeigt. Die Bildung von Clustern kann auch für die Allele *Mamu-A*11* mit *Mamu-A*05* - A*0504 sowie für die Allele *Mamu-B*01* mit *Mamu-B*09* - B*0904 beobachtet

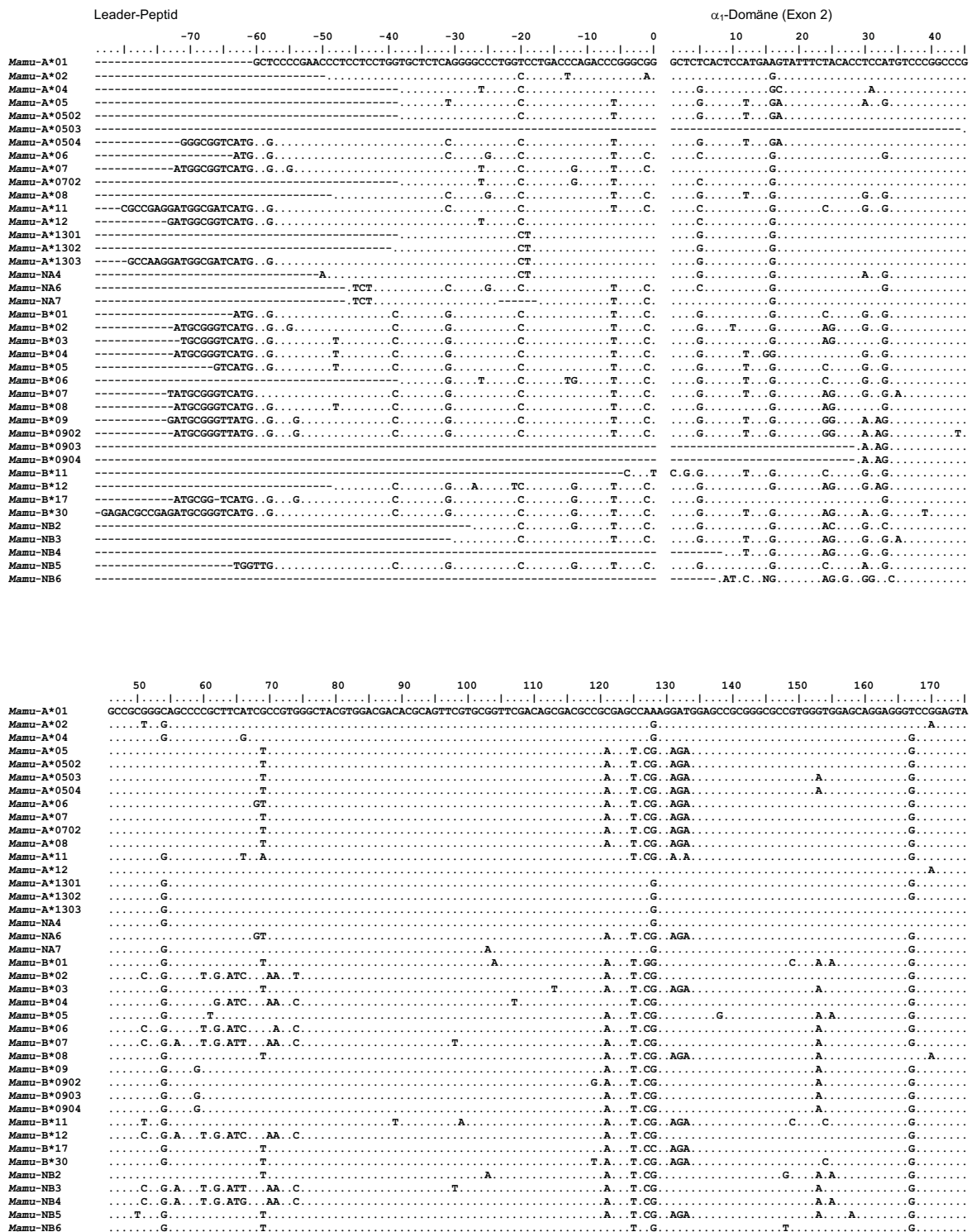


Abb. 7: Nukleotidsequenzen verschiedener Mamu-MHC Klasse I-Allele.

werden. Die gesamten Mamu-A-Allele sind in zwei größeren Gruppen zu finden, während bei den Mamu-B-Allelen mehrere Gruppen bestehen, die oftmals nur aus zwei Allelen bestehen. Übereinstimmungen innerhalb ihrer Sequenzen mit anderen schon bekannten Allelen zeigen die neuen Allele NA6 mit Mamu-A*06 sowie Mamu-NB4 mit Mamu-B*12 und NB2 mit Mamu-B*05.

Ergebnisse

	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	α ₂ -Domäne (Exon 3)		
											280	290	300
Mamu-A*01	TTGGACCGGAGACACGGAAATGAAGACCGGAGACACAGAAATGCCCAAGTGAACCTGGCGACCTGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCG										GGTCTCACACCTCCAGAGATGGTTGGTGGCGAC		
Mamu-A*02			G					A	G	G		A	TAC
Mamu-A*04		T					GC		A	GCG		TA	GT TAC
Mamu-A*05	A A C	T TGC	G	C	C	CT	G	A				A	C TAC
Mamu-A*0502	A A C	T TGC	G	C	C	CT	G	A		A		A	C TAC
Mamu-A*0503	A A C	T TGC	G	C	C	CT	G	A				A	C TAC
Mamu-A*0504	A A C	T TGC	G	C	C	CT	G	A				A	C TAC
Mamu-A*06	A A C	T TGC	G	C	C	CTA	G	A		A	T	G	G TAC
Mamu-A*07	A C	T TGC	G	A	C	C	CTA	G	A		A		A TAC
Mamu-A*0702	A C	T TGC	G	C	C	CTA	G	A		A		G	A TAC
Mamu-A*08	A C	T TAC	G	A	C	C	CTA	G	A	GG	A	A	G G TAC
Mamu-A*11		T TCC	G	A	C	C	CTA	G	A		GC		T C TAC
Mamu-A*12													T TAC
Mamu-A*1301													T TAC
Mamu-A*1302													T TAC
Mamu-A*1303		A											T TAC
Mamu-NA4		A											T TAC
Mamu-NA6	A C	T TAC	G	A	C	C	CTA	G	A	G	A	T	G G TAC
Mamu-NA7													T TAC
Mamu-B*01			GGCC	GG A	CG	C	A	G	A		T	GC	A A G T CAC
Mamu-B*02	A C		TCC	GT	ACCG	C	TT	G	G	G	A	G	G T TAC
Mamu-B*03	AGA		GCC	GG	C	CG	C	A	G	C	G	G	A G TAC
Mamu-B*04	AGA		GAGCC	GG	A	CG	C	TT	G	G	G	A	G G TAC
Mamu-B*05	AGA	C		GAG	C	CG	C	TT	GG	G	A	G	G T T C T
Mamu-B*06	AGA		T	GCC	GG	C	CG	C	AG	G	G		G T CA
Mamu-B*07	AGA	C		GAGCC	GG	A	CG	C	CA	G	G	A	GC A GG T TAC T
Mamu-B*08	AGA		GAGCC	GG	C	CG	C	A	G	C	G	G	A G TAC
Mamu-B*09	AGA		T	GCC	G	CGCG	C	AG	G	G		GC	GG A TG
Mamu-B*0902	AGA		T	GCC	G	CGCG	C	AG	G	G		GC	GG A TG
Mamu-B*0903	AGA		T	GCC	G	CGCG	C	AG	G	G		GC	GG A TG
Mamu-B*0904	AGA		T	GCC	G	CGCG	C	AG	G	G		GC	GG A TG
Mamu-B*11	AGA	C		T	GCC	GG	A	CG	GC	CA	GG	G	A TAC
Mamu-B*12	AGA	C		GCC	G	A	CG	C	A	G	G	A	G GG T G CA TAC
Mamu-B*17	AGA	C		GAGCC	GAG	CCG	C	CA	G	A		GC	G T TAC
Mamu-B*30	AGA	C		C	G	G	C	CG	A	CA	G	T	G C G T
Mamu-NB2	AGA	G		GAGCC	GG	C	CG	C	A	T	G	GG	G T TA TC
Mamu-NB3	AGA	C		GAGCC	GG	A	CG	C	CA	G	G	A	GC GG T TAC T
Mamu-NB4	AGA	A		GAGCC	GG	A	CG	C	A	G	G		G G A T TAC T
Mamu-NB5				AGCA	G	C	AG	C	A	G	G		GA G G T TC
Mamu-NB6				NAGCC	GG	A	CG	C	TT	G	G	G	A G G T TAC

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
Mamu-A*01	CTGGGCCCCGACGGGGCCCTCTCCGGGGTATGAACAGTACGCGTACGAGCGCAAGGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGGGCTCTGGACCGGGGGAGTGGCGCTCAGAACCACCGGCA												
Mamu-A*02													
Mamu-A*04													
Mamu-A*05													
Mamu-A*0502													
Mamu-A*0503													
Mamu-A*0504													
Mamu-A*06													
Mamu-A*07													
Mamu-A*0702													
Mamu-A*08													
Mamu-A*11													
Mamu-A*12													
Mamu-A*1301													
Mamu-A*1302													
Mamu-A*1303													
Mamu-NA4													
Mamu-NA6													
Mamu-NA7													
Mamu-B*01													
Mamu-B*02													
Mamu-B*03													
Mamu-B*04	G	A											
Mamu-B*05	G	AA											
Mamu-B*06													
Mamu-B*07													
Mamu-B*08													
Mamu-B*09													
Mamu-B*0902													
Mamu-B*0903													
Mamu-B*0904													
Mamu-B*11	G	A											
Mamu-B*12													
Mamu-B*17													
Mamu-B*30													
Mamu-NB2	G	A											
Mamu-NB3													
Mamu-NB4													
Mamu-NB5													
Mamu-NB6													

Abb. 7: Fortsetzung

Die Allele *NB5* und *NB6* hingegen können keiner Gruppe zugeordnet werden. Die mit in den Vergleich einbezogenen HLA-Allele liegen, bis auf *HLA-A*0201*, wie anhand des hohen Resampling-Wertes von 95% zu sehen, monophyletisch vor.

	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	α ₂ -Domäne (Exon 4)	
	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560
Mamu-A*01	AGTGGGAGCGCGGATGTGGCGGAGAGCATGAGAGCCTACCTGGAGGGCCAGTGCCTGGAGTGGCTCCCCAGATACCTGGAGAAGGGGAGGAGAGCTGCAGCGCAGGG											ACCCCCCAAGACACATGT	
Mamu-A*02		G . A	CAGCAC . A			G . C		G					
Mamu-A*04		G	CAGCAC . A			G . C		G					
Mamu-A*05		G	CAGTG			G . C	C . G . C						T
Mamu-A*0502		G	CAGTG			G . C	C . G . C						T
Mamu-A*0503		G	CAGTG			G . C	C . G . C						T
Mamu-A*0504		G	CAGTG			G . C	G . C						T
Mamu-A*06		G . A	CAG . C			G . C	G . T						
Mamu-A*07		G . C	CAG			G . C	G . C						
Mamu-A*0702		G . C	CAG			G . C	G . C						
Mamu-A*08		G . A	C . GT . C . A			G	G . T						C
Mamu-A*11		G	CAGCAC . A			G . C							
Mamu-A*12		G . A	C . GT . C . A	G . C	GA . T		G						C
Mamu-A*1301			G			G							
Mamu-A*1302			G			G . C . G							
Mamu-A*1303			G			G . C . G							
Mamu-NA4													
Mamu-NA6		G . A	CAG . C			G . C	G . T						
Mamu-NA7		G	CAGGAC . T			G . C	G			GA			
Mamu-B*01		C . G	A	CAGCG		G	G			A	G	A	C
Mamu-B*02		C . T . A . A	CAG			GAC	G . C			C	G	T . A	C
Mamu-B*03		CCG . A	CAGG . C			GAC	G				G	T . A	C
Mamu-B*04		C . G . A . A	CAGCA	T		GAC	G				G . A	A . G . A	G . C
Mamu-B*05		CCG	CAGC		A . G	CC	G	A	CCA		CT . G	A . A	C
Mamu-B*06		CC . C . A . A	CGCG	C	C . T	G	G				AG . T	T . A	C
Mamu-B*07		CCG . . C	CAGC		A	C	G		CCA . T . T	T . G	T . G	A . A	C
Mamu-B*08		CCG . A	CAGG . C			GAC	G			C	G	T . A	C
Mamu-B*09		C . G . A . A	CAGCG			G	G				G	T . A	C
Mamu-B*0902		C . G . A . A	CAGCG			G	G				G	T . A	C
Mamu-B*0903		C . G . A . A	CAGCG			G	G				G	T . A	C
Mamu-B*0904		C . G . A . A	CAGCG			G	G				G	T . A	C
Mamu-B*11		CCG . CA	AGGAC		C	G . C	G			C	G	T . A	C
Mamu-B*12		G . ACCG . TAT	C . GT . C	T		G	G			C	G	T . A	C
Mamu-B*17		G . AACCG . TAT	C . GT . C			G . C	G				G	T . A	C
Mamu-B*30		A . CCG . TAT	C . GT . C		AGAC	C	G . C		A		G	T . A	C
Mamu-NB2		CCG . . C	CAGC . A			G	C			A	G	A	C
Mamu-NB3		CCG . . C	CAGC		A . C	G	G			C			
Mamu-NB4		G											
Mamu-NB6		C . G	A	CAGCA		GAC . C	G						

	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690
Mamu-A*01	GACCCACCACCCCTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCAAACTCAGGACACGGAGCTCGTGGAG												
Mamu-A*02			A										
Mamu-A*04			T							C . A			T
Mamu-A*05	A									G			
Mamu-A*0502	A									G			
Mamu-A*0504										G			
Mamu-A*06													
Mamu-A*07													
Mamu-A*0702													
Mamu-A*08													
Mamu-A*11										G			
Mamu-A*12										A			
Mamu-A*1301												A	
Mamu-A*1302												A	
Mamu-A*1303												A	
Mamu-B*01		T		A	T								T . T
Mamu-B*02		T			A	T							T . T
Mamu-B*03			A								G		T . T
Mamu-B*04			T										C . T
Mamu-B*05			A									G	C . T
Mamu-B*06			A										C . T
Mamu-B*07													C . T
Mamu-B*08													C . T
Mamu-B*09												G	C . T
Mamu-B*0902												G	C . T
Mamu-B*11													C
Mamu-B*12													C
Mamu-B*17			A										C
Mamu-B*30												G	A . T . T

Abb. 7: Fortsetzung

Ergebnisse

	700	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	*						
Mamu-A*01	ACCAGG	CCTGC	AGGATG	GAACCT	TCCAGA	AGTGGG	CGGCTG	TGGTGG	CTCTCG	GAGAGG	AGGAGATAC	ACCTGTC	ATGTGC	AGCATG	AGGGTCTG	CCCAAG	CCCCAC	CCCTG	AAATGGG	AGC
Mamu-A*02		G	C													GTG				
Mamu-A*04						T		A	A	T						G		T	T	G
Mamu-A*05																G				
Mamu-A*0502																G				
Mamu-A*0504																G				
Mamu-A*06								A												
Mamu-A*07																				
Mamu-A*0702																				
Mamu-A*08																				
Mamu-A*11																				
Mamu-A*12																				
Mamu-A*1301										T										
Mamu-A*1302											A									
Mamu-A*1303										T										
Mamu-B*01		A	G			A	GA													
Mamu-B*02																				
Mamu-B*03		T																		
Mamu-B*04																				
Mamu-B*05																				
Mamu-B*06																				
Mamu-B*07																				
Mamu-B*08																				
Mamu-B*09																				
Mamu-B*0902																				
Mamu-B*11																				
Mamu-B*12																				
Mamu-B*17																				
Mamu-B*30																				

	* Exon 5													Exon 6					
	830	840	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950						
Mamu-A*01	CGTTTT	CCAGTCC	ACCATCC	CCATGG	TGGGCAT	CATTG	CTGGC	CTGGTTC	CTCTGG	AGCTGG	GTGCTG	CTGATG	TGGAGG	AGGAGCT	CAG	ATAGAAA	AGGAGG		
Mamu-A*02																			
Mamu-A*04																			
Mamu-A*05																			
Mamu-A*0502																			
Mamu-A*0504																			
Mamu-A*06																			
Mamu-A*07																			
Mamu-A*0702																			
Mamu-A*08																			
Mamu-A*11																			
Mamu-A*12																			
Mamu-A*1301																			
Mamu-A*1302																			
Mamu-A*1303																			
Mamu-B*01		A	C																
Mamu-B*02																			
Mamu-B*03																			
Mamu-B*04																			
Mamu-B*05																			
Mamu-B*06																			
Mamu-B*07																			
Mamu-B*08																			
Mamu-B*09																			
Mamu-B*0902																			
Mamu-B*11																			
Mamu-B*12																			
Mamu-B*17																			
Mamu-B*30																			

Abb. 7: Fortsetzung

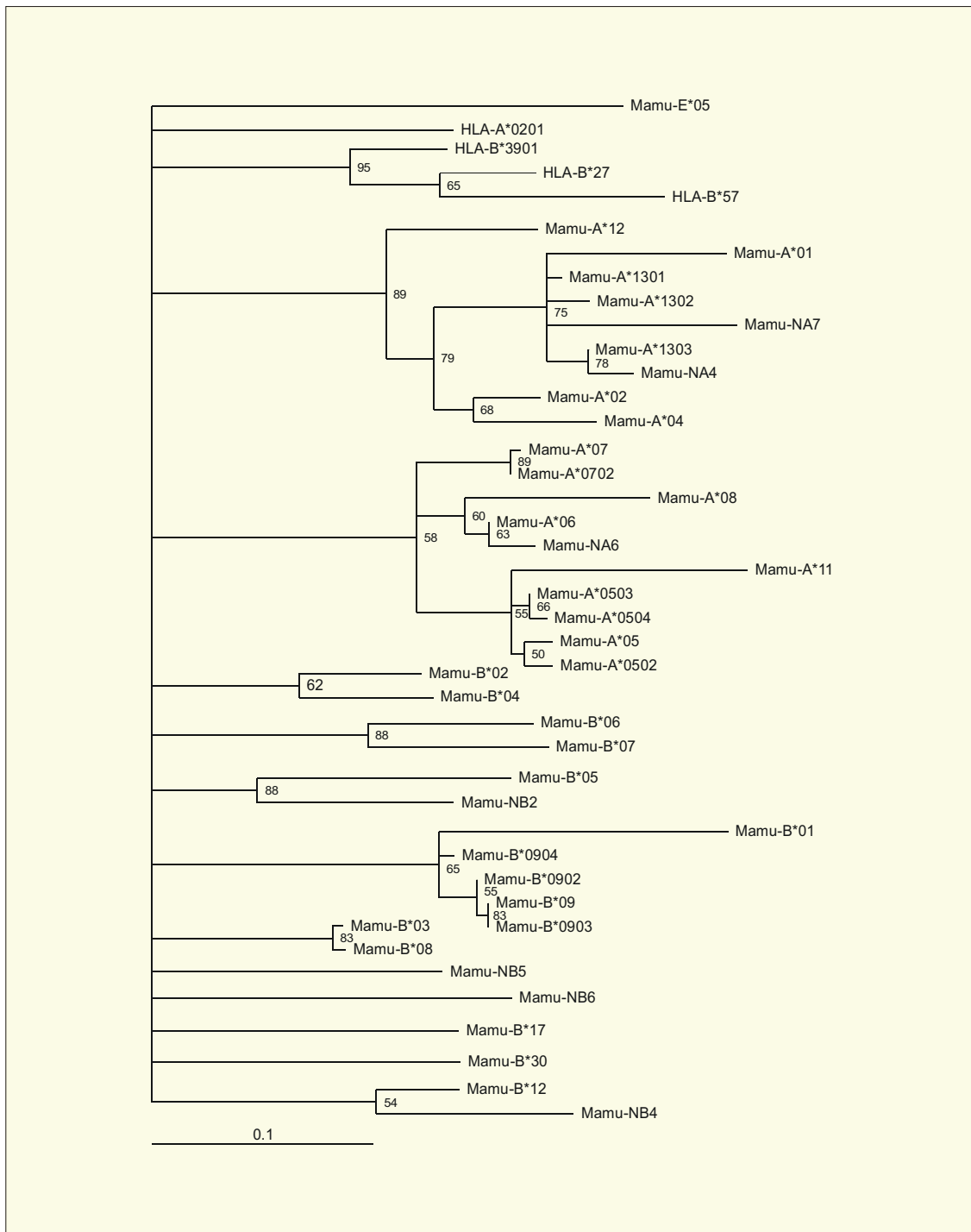


Abb. 8: Phylogenetischer Baum einiger humaner und Rhesusaffen MHC Klasse I-Allele. Es wurden die Aminosäuresequenzen des Leader-Peptids sowie der Exons 2 und 3 verwendet. Die Exons 2 und 3 wurden ausgewählt, da die peptidbinde Region der MHC Klasse I-Moleküle aus diesen Bereichen gebildet wird. Die zugrunde liegenden Sequenzvergleiche und die Konstruktion des Baumes wurden mit Hilfe der Programme Bioedit und Treepuzzle 5.0 (www.tree-puzzle.de) erstellt.

3.3 Nachweis von *Mamu-MHC* Klasse I-A- und B-Allelen mit allelspezifischen Primern

Die in der DGGE erhaltenen Daten lassen darauf schließen, daß einige der gefundenen *Mamu-MHC* Klasse-I-Allele (Tab. 5) mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen bei SIV-infizierten Rhesusaffen assoziiert sein könnten. Um genauere Aussagen zu erhalten, wurde

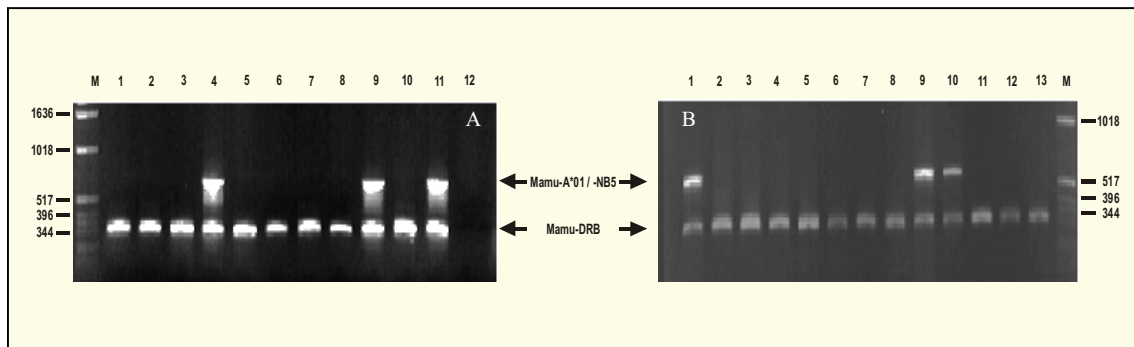


Abb. 9: Nachweis von *Mamu-MHC* Klasse I-Allelen mittels PCR-SSP

Sequenzspezifische Primer wurden für die Amplifizierung von *Mamu-A*01* und *NB5* aus genomischer DNA verwendet. Als interne Kontrolle wurden gleichzeitig *Mamu-DRB* spezifische Primer mit eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Abbildungen A und B zeigen die Ergebnisse einer *Mamu-A*01* bzw. *-NB5*-Typisierung. A) Die Spuren 1-3, 5-8 und 10 zeigen *Mamu-A*01* negative Tiere. Die Spuren 4, 9 und 11 zeigen *Mamu-A*01* positive Tiere. Spur 11 zeigt Tier 7069 das als Positivkontrolle diente. In den Spuren M und 12 sind der 1 kb- Längenstandard und die Negativkontrolle zu sehen. B) Die Spuren 2-8 und 11-13 zeigen *Mamu-NB5* negative Tiere. Die Spuren 1, 9 und 10 zeigen *Mamu-NB5* positive Tiere. Spur 11 zeigt Tier 7069 das als Positivkontrolle diente. In der Spur M ist der 1 kb-Längenstandard zu sehen.

eine größere Anzahl von SIV-infizierten Tieren untersucht. Dazu wurden PCR-SSP Typisierungs-Methoden für die gefundenen Allele entwickelt.

Weiterhin wurden Primer für die bereits publizierte Allele konstruiert. Unter anderem auch für die Allele *Mamu-A*11* und *-B*17*, da für diese beiden Allele bereits Peptidbindungs-motive definiert wurden (Dzuris et al., 2000). Für die Typisierung von *Mamu-A*01* wurde eine veröffentlichte Methode adaptiert (s. 2.2.13). In Abbildung 9 ist das Ergebnis einer *Mamu-A*01*-PCR-SSP von 11 Rhesusaffen zu sehen. Anhand eines Vergleichs mit dem Größenstandard können die Banden eindeutig als *Mamu-A*01*- (685 bp) oder *Mamu-DRB*-Banden (260 bp) identifiziert werden.

Insgesamt wurden Primer für 7 *Mamu-MHC* Klasse I-A-Allele (*A*02*, *A*04*, *A*08*, *A*11*, *A*13*, *NA4*, *NA7*) und 7 *Mamu-MHC* Klasse I B-Allele (*B*01*, *B*07*, *B*12*, *B*17*, *NB2*, *NB4*, *NB5*) entwickelt. Mit den *A*13*-Primern können alle *A*13*-Varianten *A*1301-1303* sowie 3 neue *A*13*-Allele amplifiziert werden. Während der Optimierungsphase für die PCR-SSP wurde als Positivkontrolle DNA von bereits charakterisierten Tieren verwendet. In den anderen Fällen wurden die PCR-Produkte sequenziert.

Die Methode der PCR-SSP ist geeignet auch größere Zahlen von Tieren schnell und sicher zu typisieren. Die Konstruktion allelspezifischer Primer war aufgrund der Sequenzzusammensetzung der zu amplifizierenden Bereiche zum Teil schwierig, da eine Unterscheidung der einzelnen Allele nur in relativ eingeschränkten Bereichen möglich war. Diese Bedingungen führten dazu, daß für die Allele *NA6*, *NB3* und *NB6* keine Primer konstruiert werden konnten, die eine eindeutige Identifizierung der Allele zugelassen hätten. Die genaue Bestimmung dieser Allele hätte für alle positiven Tiere durch die Sequenzierung erfolgen müssen. Eine schnelle Typisierung großer Tierzahlen wäre damit aber nicht möglich und zudem sehr teuer. Weiter könnte über die Sequenzierung kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden, wenn mehr als ein Gen mit einem Primerpaar amplifiziert würde. Der hohe GC-Gehalt der untersuchten DNA-Abschnitte erforderte weiterhin spezielle Polymerasen und für jedes Allel einzeln optimierte PCR-Bedingungen. Wie unter 2.2.11 beschrieben, wurde ein spezielles Polymerasesystem für GC-reiche Sequenzen angewendet. Die Versuchsbedingungen für die allelspezifischen PCR-Reaktionen sind dem Abschnitt 2.2.13 und der Tabelle 4 zu entnehmen

3.4 Typisierung der *Mamu*-MHC Klasse I-Gene von SIV-infizierten Rhesusaffen

Insgesamt wurden die *Mamu* Klasse I-Gene von 94 SIV-infizierten Tieren mit der PCR-SSP typisiert. Die ermittelten Allelfrequenzen sind der Tabelle 6 aufgelistet. Die mit sequenzspezifischen Primern amplifizierten *A*11*-, *A*13*-, *NB2*-, *B*17*-, *NB4*- und *NB5*-PCR-Produkte wurden zusätzlich sequenziert. Es wurden dabei einige neue Allele gefunden. Neben den in den Tabellen 5 und 9 aufgeführten Tieren wurde ebenfalls das Tier 7069 mit der DGGE und PCR-SSP analysiert. Beim Tier 7069 wurde ein neues *Mamu*-B-Allel, *NB5*, gefunden (Tab. 5). Da es sich bei Tier 7069 um einen LTNP handelt, ist es prinzipiell möglich, daß das *Mamu*-B-Allel *NB5* mit langsamen Krankheitsverlauf assoziiert ist. Daher wurde auch bei den übrigen Tieren noch dieses Allel typisiert und alle positiven Proben sequenziert. Von den Allelen *B*17* und *NB5* wurde je ein neues Allel gefunden, während für das Allele *A*13* drei Varianten nachgewiesen wurden. Die analysierten Tiere besaßen zwischen 3 und 9 MHC Klasse I-Allele. Teilweise lagen bis zu 5 *A*-Allele in einem Tier vor, d.h. es traten Haplotypen auf, die bis zu 3 *A*-Loci enthalten müssen. Bisher bekannt waren Allelzahlen, die auf eine Zahl von bis zu 2 *A*-Loci und 4 *B*-Loci schließen lassen (Urvater et al., 2000).

Die gefundenen Allele können entsprechend der Häufigkeit ihres Vorkommens in drei Gruppen eingeteilt werden. So finden sich die drei Allele *Mamu*-*A*11*, *-B*17* und *NB4* in weniger als 10% der untersuchten Tiere. Die Allele *Mamu*-*A*01*, *-A*02*, *-A*1302*, *-A*1303*, -

NA4, *-B*01*, *-B*07*, *-NB2* und *-NB5* besitzen Allelfrequenzen zwischen ca. 10%-30%. Alle anderen Allele, also *Mamu-A*04*, *-A*08*, *-NA4* und *-B*12*, sind sehr häufig, d.h. in 50% bis 80% der Tiere zu finden. Zusätzlich ist die Verteilung der einzelnen Allel je nach Herkunft der Tiere unterschiedlich. So ist z.B. das Allel *Mamu-B*12* in 67% der Tiere aus der DPZ-Zucht nachgewiesen worden, während es in Tieren mit LABS-Herkunft, nur zu 39% vorkommt. Von diesen Unterschieden in den Allelhäufigkeiten in Abhängigkeit von der Herkunft der untersuchten Tiere wurde auch schon in einer anderen Studie berichtet (Horton et al., 2001). Von den bisher identifizierten MHC Klasse I-Allelen ist *Mamu-A*01* bislang das am besten untersuchte Allel. Nach Literaturangaben wird das *Mamu-A*01*-Molekül in ca. 25 % der Affen exprimiert, die vom Indischen Subkontinent stammen (Furchner et al., 1999).

Tabelle 6: Allelfrequenzen der SIV-infizierten Tiere und die Verteilung der Allelhäufigkeiten innerhalb der Tiergruppen unterschiedlicher Herkunft.

Allele	positive Tiere gesamt		positive Tiere DPZ		positive Tiere LABS	
	n	%	n	%	n	%
A*01	14	15,3	10	17,9	4	11,1
A*02	15	16,0	3	5,4	12	31,6
A*04	64	70,3	44	80,0	20	55,6
A*08	44	48,4	28	51,0	16	44,4
A*11	2	2,2	0	0	2	5,6
A*1302	12	13,2	2	3,6	10	27,8
A*1303	20	22,0	13	23,6	7	19,4
NA4	20	22,0	16	29,1	4	11,1
NA7	74	81,3	46	83,6	28	77,8
B*01	20	22,0	7	12,7	13	36,1
B*07	26	28,6	10	17,9	16	44,4
B*12	51	56,0	37	67,3	14	38,9
B*17	5	5,5	2	3,6	3	8,3
NB2	18	19,8	12	21,8	6	16,7
NB4	7	7,7	5	9,0	2	5,6
NB5	18	19,8	14	25,5	4	11,1

Bei den von uns untersuchten Tiere waren nur ca. 15% *Mamu-A*01*-positiv und etwa 35% *Mamu-A*13*-positiv. Da mit den A*13-Primern allerdings alle bisher publizierten A*13-Allele amplifiziert werden können, wurden alle positiven Proben sequenziert. Dadurch konnten die Allele eindeutig bestimmt werden. Außer den Allelen *Mamu-A*1302* und *-A*1303* wurden weiterhin 3 neue Allele gefunden, die bisher nur in wenigen Tieren nachgewiesen werden konnten. Das Allel *Mamu-A*02* wurde in 16% der Tiere exprimiert. Diese Angabe deckt sich mit den Beobachtungen einer anderen Gruppe (Robinson et al., 2001).

Eine statistische Auswertung der Allele zeigte, daß Koppelungen zwischen Allelen auftreten. Bei den Allelen *A*08* und *A*1303* ist dies zu beobachten. Alle 20 Tiere die *Mamu-A*1303* besitzen, tragen ebenfalls das Allel *Mamu-A*08* ($p < 0,0001$). *Mamu-A*08* segregiert hingegen auch noch mit anderen Allelen. Das *Mamu-A*1303* ähnliche Allel *NA4* kommt ebenfalls oft in Verbindung mit *A*08* vor. Von 20 *NA4*-positiven Tieren sind 19 *A*08*-positiv. Weiterhin zeigt

sich auch, daß die Allele *Mamu-A*01* und *Mamu-NB5* miteinander gekoppelt sind. Bis auf eine Ausnahme sind alle 13 Tiere, die *Mamu-A*01* besitzen, auch Träger von *NB5* ($p < 0,0001$). Das Allel *NB5* hingegen tritt in 6 Tieren allein auf.

3.5 Die Assoziationen von *Mamu*-MHC Klasse I-Allelen mit einem langsamen Krankheitsverlauf

Die AIDS-freie Überlebenszeit war signifikant negativ mit der Höhe der Virusbeladung korreliert. Aus der Analyse von 51 Rhesusaffen für die die Virusbeladung bekannt war und die mit AIDS-ähnlichen Symptomen euthanasiert wurden, errechnete sich ein Spearman rank correlation-Koeffizient von $r = -0,508$ und ein Wert von $p = 0,0004$. In Abbildung 8 ist ein

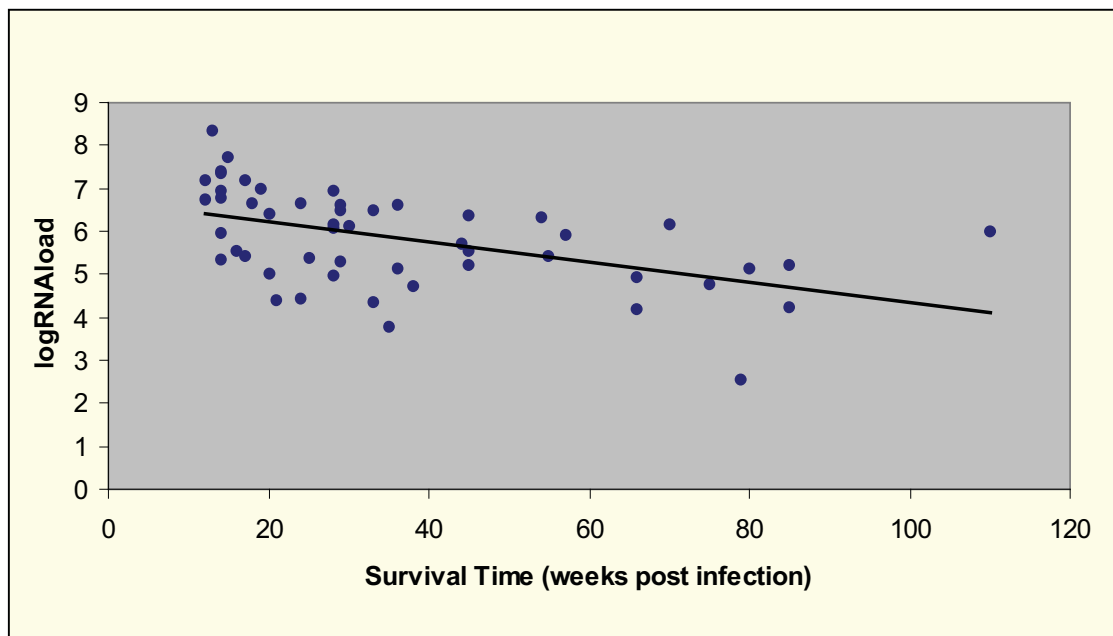


Abb. 10: Graphische Darstellung der Virusbeladung im Verhältnis zur Überlebenszeit von 51 SIV-infizierten Rhesusaffen die an AIDS gestorben sind. Es ist zu erkennen, daß eine kürzere Überlebenszeit eindeutig mit einer höheren Virusbeladung assoziiert ist. Diese Assoziation ist statistisch signifikant.

"Scatter plot" dieser Daten gezeigt. Eine hohe Virusbeladung ist mit einer kurzen Überlebenszeit assoziiert. Daraus ergibt sich die Frage, ob einzelne Allele mit der Virusbeladung assoziiert sind und bei Vorhandensein der entsprechenden Allelen von einer längeren Lebensdauer der Träger ausgegangen werden kann. Für 86 der 94 untersuchten Rhesusaffen lagen Angaben zur Virusbeladung 20 Wochen nach der Infektion vor. Diese Daten wurden mit einem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test ausgewertet, der Aufschluß darüber geben sollte, ob Assoziationen zwischen bestimmten Allelen und der Höhe der Virusbeladung bestehen. Demnach haben die Allele *Mamu-A*01* ($p = 0,0067$), *NB2*

($p=0,0434$) und *NB5* ($p=0,0122$) einen signifikanten Einfluß auf die Virusbeladung und Affen mit diesen Allelen haben durchschnittlich eine geringere Virusbeladung.

Die Typisierungsergebnisse aller untersuchten Tiere wurden in einer Kaplan-Meier-Analyse ausgewertet. Hier ergibt sich, daß die 4 Allele *Mamu-A*01*, *-A*08*, *-A*1303* und *NB5* die Überlebenszeit signifikant beeinflussen. Diese „protektiven“ Allele sind in den Kaplan-Meier-Diagrammen (Abb. 12) deutlich sichtbar. Eine weitere Prüfung der statistischen Ergebnisse mit dem χ^2 -Test ergab, daß weder *Mamu-A*08* noch *NB5* signifikant mit der Überlebenszeit assoziiert waren, falls die Allele *Mamu-A*01* und *-A*1303* mit berücksichtigt werden. Im umgekehrten Fall hingegen bleiben die Assoziationen weiter signifikant. Insgesamt betrachtet ergibt sich daraus, daß nur *Mamu-A*01* und *-A*1303* als unabhängige, mit langsamen Krankheitsverlauf assoziierte Allele betrachtet werden können. Die restlichen typisierten Allele sind für den Krankheitsverlauf von SIV-infizierten Rhesusaffen nicht relevant oder aufgrund geringer Tierzahlen nicht als signifikant erkennbar.

Eine Betrachtung möglicher kumulativer Effekte wurde für den Fall durchgeführt, daß ein Tier Träger von zwei oder mehreren protektiven Allelen sein sollte. Die Untersuchung umfaßte die Allele *Mamu-A*01*, *-A*11*, *-A*1303*, *-B*17* und *NB2* (Abb. 10). Nur Tiere, die *A*01* und zusätzlich ein weiteres der genannten Allele besaßen, leben statistisch signifikant länger ($\chi^2=4,1098$; $p=0,043$). Ein ähnlicher Effekt wurde für *Mamu-A*1303* beobachtet, der allerdings nicht signifikant war.

In Abbildung 12 F sind die Überlebenszeitkurven für die Tiere gezeigt, die entweder kein (blau), ein (grün) oder mehr als ein (rot) protektives Allel besaßen. Zu erkennen ist ein deutlicher Einfluß der protektiven Allele auf die Überlebenszeit nach der SIV-Infektion. Während bei den Tieren ohne schützendes Allel schon nach 30 Wochen 50% der Tiere an AIDS verstarben, überlebten 50% der Individuen 57 Wochen bzw. 85 Wochen bei Anwesenheit von einem oder mehreren schützenden Allelen. Zu beachten ist, daß über 40% der Tiere mit mehreren schützenden Allelen auch nach über 120 Wochen noch am Leben waren. Dies verdeutlicht den Einfluß der vorliegenden MHC Klasse I-Moleküle auf die Überlebenszeit.

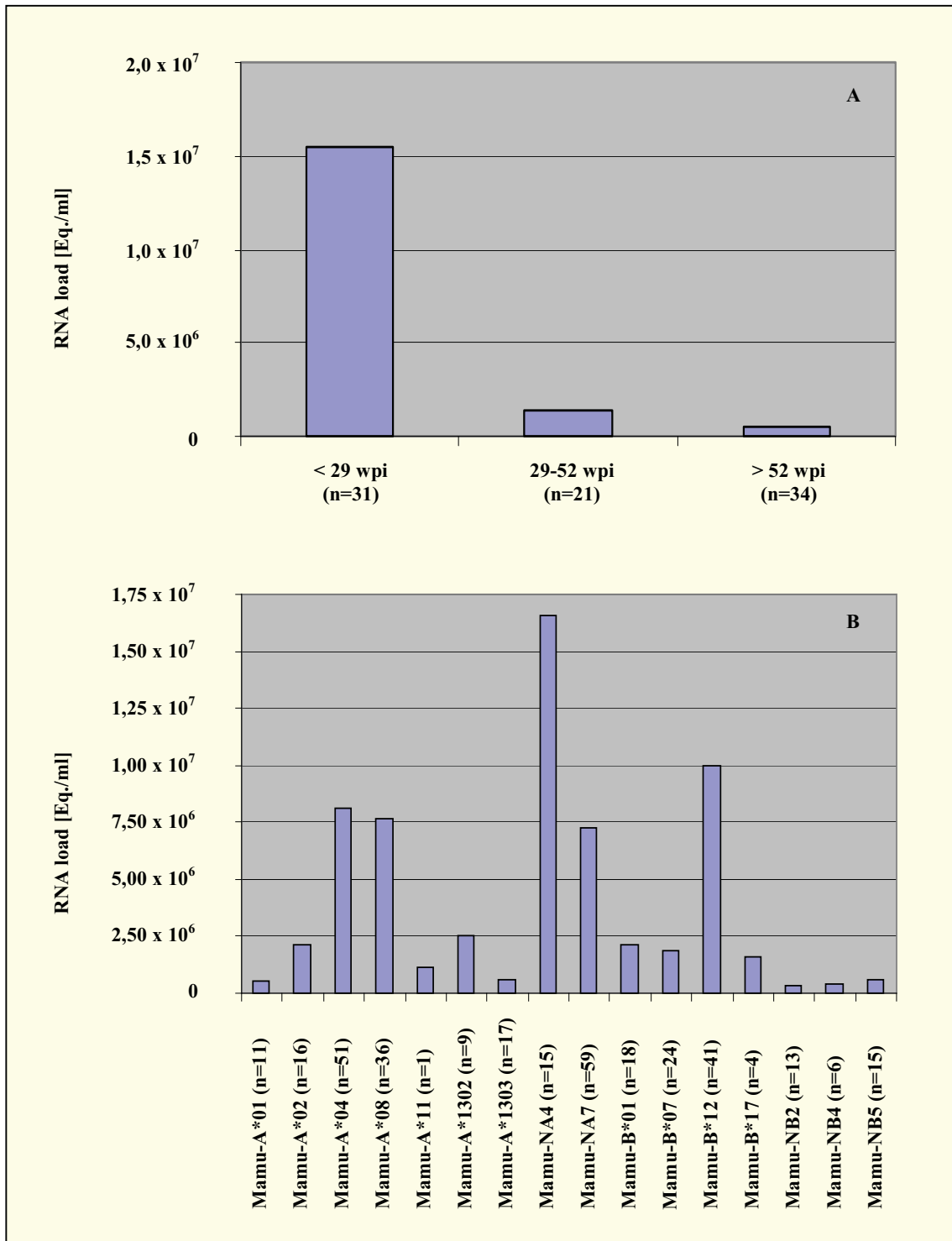


Abb. 11: Verhältnis der Virusbeladung der SIV-infizierten Rhesusaffen in Bezug auf die Überlebenszeit (A) und die MHC Klasse I-Allele (B). Alle Beladungsdaten wurden aus Plasmaproben 20 Wochen nach Infektion erhoben. (A): Die Tiere wurden entsprechend ihrer Überlebenszeit in 3 Gruppen eingeteilt. Hier wird unterschieden zwischen "rapid progressors" (<29 wpi), "progressors" (29-52 wpi) und "slow progressors" (>52 wpi). Dargestellt sind die durchschnittlichen Virusbeladungen für die einzelnen Gruppen. (B): Diagramm B zeigt den Durchschnitt der Virusbeladung in Bezug auf die einzelnen MHC Klasse I-Allele.

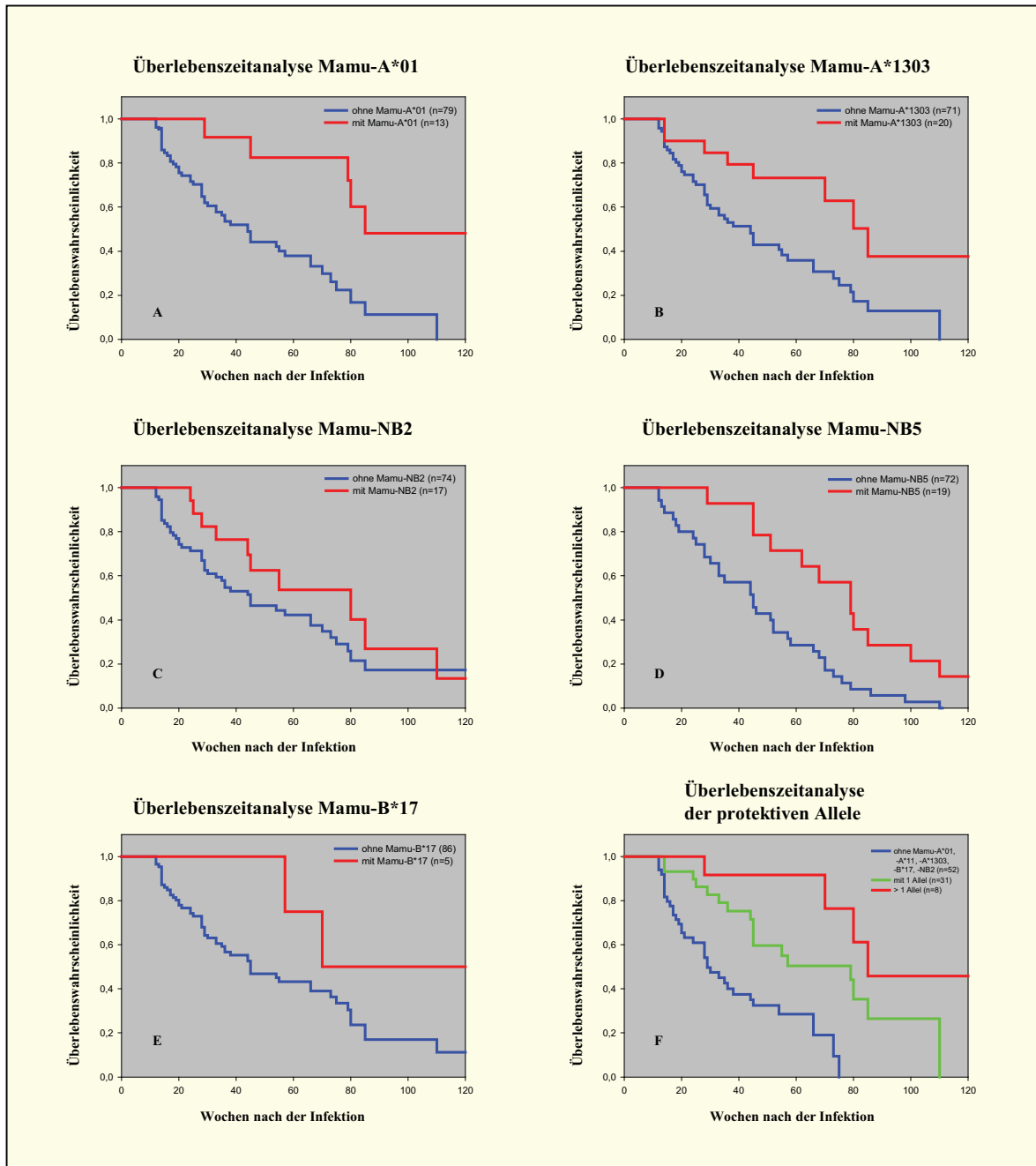


Abb. 12: Überlebenszeit-Analysen SIV-infizierter Rhesusaffen. In den Abbildungen (A), (B) und (D) sind die Überlebenszeitkurven für die mit einem langsamen Krankheitsverlauf assoziierten Allele *Mamu-A*01*, *-A*1303* und *NB5* dargestellt. Die Abbildungen (C) und (E) zeigen die Überlebenszeitdiagramme für Tiere ohne bzw. mit *Mamu-NB2* bzw. *-B*17*. Abbildung (F) zeigt den Einfluß der Allele *Mamu-A*01*, *-A*11*, *-A*1303*, *-B*17* und *NB2* auf die Überlebenszeit in Abhängigkeit von ihrer Anzahl der Allele pro Tier.

Aufgrund der statistischen Auswertungen der bisher untersuchten Allele mit signifikanten Assoziationen zum Krankheitsverlauf bzw. der Virusbeladung, können die Allele in zwei Gruppen unterteilt werden: Zum einen Allele, die die Überlebenszeit oder die Virusbeladung beeinflussen und zum anderen solche die für den Krankheitsverlauf sind irrelevant.

Tab. 7: Assoziation der Allele mit der Überlebenszeit oder der Virusbeladung

Klasse I-Allele	A*02	A*04	A*08	A*1302	NA4	NA7	B*01	B*12	NB4	A*01	A*1303	NB2	NB5
Assoziation mit der Überlebenszeit oder Virusbeladung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

In Tab. 7 sind die Assoziationen mit dem Krankheitsverlauf aller Allele zusammengefaßt. Die mit + gekennzeichneten Allele können möglicherweise relevante CTL-Epitope repräsentieren und eignen sich für weitergehende Untersuchungen. Nicht in der Tabelle aufgeführte Allele waren zu selten um genaue statistische Aussagen treffen zu können.

3.6 Einfluß der MHC Klasse I-Ausstattung auf die Virusbeladung und den Krankheitsverlauf von Rhesusaffen die mit lebendattenuiertem SIV infiziert worden waren

Die Vakzinierung mit lebendattenuierten Viren ist der bisher effektivste Ansatz, um einen Schutz gegen SIV zu erhalten. Hierbei kommt die Frage nach der Sicherheit der verwendeten Vakzine auf, da allem Anschein nach auch stark attenuierte Viren unter gewissen Umständen noch AIDS auslösen können (Baba et al., 1999). Die genetische Disposition der vakzinierten Tiere spielt dabei möglicherweise eine Rolle. Deshalb ist die Kenntnis der genetischen Faktoren für Pathogenitäts- und Vakzinestudien von großer Wichtigkeit. Bei Rhesusaffen ist bekannt, daß Homozygotie für den konservierten MHC Klasse II Haplotyp *DQB1*0601-DRB1*309-DRB*W201* mit einem schnellen Krankheitsverlauf assoziiert ist (Sauer mann et al., 2000). Deshalb sollten die MHC Klasse I-Allele von Tieren mit bekannter MHC Klasse II-Ausstattung typisiert werden. Es wurde untersucht, ob die Virusbeladung und der Krankheitsverlauf, nach Infektion mit attenuiertem SIV mit der MHC-Ausstattung assoziiert sind. Für diese Studie wurden 5 Rhesusaffen eingesetzt die für den o.g. Rapid Progressor-Genotyp homozygot waren und 3 heterozygote, sowie 2 Kontrolltiere. Die Kontrolltiere (9529 und 9535) besaßen keinen Rapid Progressor-Genotyp und wurden mit 5 ml Blut inokuliert, daß mit 10^7 Lymphknotenzellen von 1891 (homozygot) und 1948 (heterozygot) versetzt war. Die Lymphknotenzellen wurden den Tieren 1891 und 1948 54 Wochen nach ihrer Infektion mit SIVmac239 Δ NU (Gundlach et al., 1997) entnommen, da diese Tiere eine hohe Virusbeladung aufwiesen. Durch diese Infektion sollte herausgefunden werden, ob das Virus durch eine Passage in suszeptiblen Tieren eine höhere Pathogenität entwickelte. Die *Mamu* MHC Klasse II-Haplotypen der verwendeten Tiere wurden mit der PCR-RFLP und DGGE untersucht (Sauer mann et al., 1998; Khazand et al., 1999). Die *Mamu* MHC Klasse I-Typisierung erfolgte, wie unter 2.2.14 beschrieben, mit Hilfe der DGGE. Hierbei wurden insgesamt 9 *Mamu* Klasse I A- und 6 *Mamu* Klasse I B-Allele identifiziert. Für die gefundenen Allele wurden anschließend Primer konstruiert und alle Tiere mittels PCR-SSP nachtypisiert. Bei positiven Tieren wurden die PCR-Produkte sequenziert. Außer für die gefundenen Allele, wurden alle Tiere auch für das Allel *Mamu-A*01* typisiert^E. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt^F.

Messungen der zell-assoziierten Virusreplikation ergaben, daß die Tiere 1891 und 1948 die Virusreplikation nicht kontrollieren konnten. Von allen untersuchten Tieren zeigten sie die höchste Virusbeladung (Tab. 9). Die in diesen Tieren vorkommenden Allele scheinen keinerlei Einfluß auf den Krankheitsverlauf zu haben. Diese Aussage stimmt mit den statistischen Auswertungen der MHC Klasse I-Typisierung (s. 4.4) überein.

Tabelle 8: Übersicht über die MHC Klasse II-Prädisposition von MHC Klasse II ähnlichen oder identischen Tieren, die hinsichtlich ihrer MHC Klasse I-Moleküle charakterisiert wurden.

Tier:	Virus SIVmac:	DQ:	DRB:	Kontrolle der Virus-replikation:	Anmerkungen:
1891	ΔNU	*0601	DRB1*0309 DRB*W201	-	
1937	ΔNU	*0601	DRB1*0309 DRB*W201	++	
1948	ΔNU	*0601	DRB1*0309 DRB*W201	-	
		*1801	DRB1*0303 DRB1*1007		
8768	ΔNU	*0601	DRB1*0309 DRB*W201	+	
8785	ΔNU	*0601	DRB1*0309 DRB*W201	++	
8790	ΔNU	*0601	DRB1*0309 DRB*W201	++	
9026	ΔNU	*0601	DRB1*0309 DRB*W201	++	
		*1801	DRB1*0303 DRB1*1007		
9038	ΔNU	*0601	DRB1*0309 DRB*W201	+/-	
		*1801	DRB1*0303 DRB1*1007		
9529	ΔNU	*1503	DRB3*0407 DRB5*0307	++	Mit Material von 1891 infiziert
		*1808	DRB*W2801		
9535	ΔNU	*0605	DRB1*0306 DRB1*1003	-	Mit Material von 1948 infiziert
		*1804	DRB1*0310 DRB*W101 DRB*W602 DRB*W609		

Die Tiere 1891, 1937, 8768, 8785 und 8790 waren für ihre MHC Klasse II-DQ-Gene homozygot.

Zu diesen Allelen gehören auch die hier nachgewiesenen Allele *Mamu-A*02*, *-A*04*, *-A*08*, *-NA4*, *-NA7*, *-B*01*, *-B*07* und *-B*12*. Die fehlende Viruskontrolle könnte deshalb durch die Abwesenheit der uns bekannten protektiven MHC Klasse I-Gene erklärt werden, wobei dies natürlich nicht ausschließt, daß das Fehlen anderer Faktoren ebenfalls von Einfluss sein könnte.

Für die Tiere, die die Virusreplikation kontrollieren können, zeigt sich, daß sowohl in 8785 als auch in 9026 das Allele *Mamu-A*11* vorkommt. Von *Mamu-A*11* ist bekannt, daß es ein Epitop aus env präsentiert und vor einem raschen Krankheitsverlauf schützt. Dieses Allel konnte von uns bisher nur in 4 Tieren gefunden werden. Bei diesen Tieren handelte es sich ausschließlich um Rhesusaffen, die einen langsamen Krankheitsverlauf zeigten. Aufgrund der geringen Anzahl positiver Tiere war eine aussagekräftige statistische Auswertung allerdings nicht möglich. Neben *Mamu-A*11* findet sich in 9026, ebenso wie in 8790, das Allel *NB2*. Die MHC Klasse I-Typisierung hatte für dieses Allel ergeben, daß es in Tieren mit einer hohen Virusbelastung unterrepräsentiert ist. Statistisch signifikant ist die Assoziation mit dem

Ergebnisse

Krankheitsverlauf allerdings nicht, so daß allein aus dem Vorhandensein dieses Allels nicht sicher auf die Kontrolle der Virusreplikation geschlossen werden kann. Es korreliert allerdings mit einer niedrigen Virusbelastung. Weiterhin wurde das Allel *Mamu-A*1303* nachgewiesen. Dieses Allel ist mit langsamen Krankheitsverlauf signifikant assoziiert. Weiterhin ist es auch in dem LTNP 7069 zu finden. Das Tier 9529, das dieses Allel auch besitzt, konnte ebenfalls die Virusreplikation kontrollieren.

Tabelle 9: Typisierung der *Mamu-A*- und *B*-Allele der untersuchten Tiere durch PCR

Tier	1891	1937	1948	8768	8795	8790	9026	9038	9529	9535
Virus-replikation:	++	-	++	+/-	-	-	-	+/-	-	+/-
A-Allele:	A*02 A*04 A*1302	A*04	A*04 A*08 NA4 NA7	A*02 A*04 NA6 NA7	A*04 A*11 NA7	A*02 A*04 A*08 A*11 NA4 NA7	A*04 A*11 NA7	A*02 A*08 A*1302	A*02 A*08 A*1303 NA4	A*04 NA7
B-Allele:	B*01 B*07 B*12	B*12	B*12	B*01 B*07 NB6	B*01 B*07	NB3	NB2 NB2	B*01	B*01 B*07	B*01 B*07

NA: neue *Mamu-A*-Allele; NB: neue B-Allele. Allele die weder durch DGGE noch durch PCR eindeutig bestimmt werden konnten, sind nicht in der Tab. aufgeführt.

Bei Tier 1937 liegt kein Allel vor das als schützend bewertet wurde. Trotzdem kann 1937 die Virusreplikation kontrollieren. Dies ist ein Hinweis darauf, daß möglicherweise noch weitere genetische Faktoren einen Einfluß auf den Krankheitsverlauf haben. Die Tiere 8768, 9038, 9535 besitzen ebenfalls keine Allele, die signifikant mit dem Krankheitsverlauf assoziiert sind, können aber die Virusreplikation besser kontrollieren als 1891 und 1948. Dies läßt ebenfalls darauf schließen, daß es noch andere Faktoren gibt, die die Kontrolle der Virusreplikation beeinflussen. Aus den vorhandenen Ergebnissen lassen sich aber keine sicheren Rückschlüsse auf die Art dieser Faktoren ziehen. Neue *Mamu MHC*-Allele sind ebenso denkbar wie z.B. Veränderungen in den TAP- oder anderen Genen, die mit der Immunantwort assoziiert sind. Eine Ausweitung der MHC Klasse I-Charakterisierung könnte zumindest klären, ob weitere MHC-Gene hier eine Rolle spielen.

3.7 Aufbau einer cDNA-Bank

Für quantitative Analysen der antigen-spezifischen CTL-Immunantwort werden die Bindungsmotive der MHC Klasse I-Moleküle benötigt. Mit Hilfe dieser Angaben können Peptid-MHC-Tetramere entwickelt und in einem Tetramer-Staining eingesetzt werden. Für die Identifizierung von Bindungsmotiven sollte zunächst eine MHC Klasse I cDNA-Bank aus einer B-Zelllinie eines SIV-infizierten LTNP (7069) hergestellt werden, um vollständige cDNA-Sequenzen zu erhalten.

Für die Herstellung der cDNA-Bank wurde ein System von Life Technologies verwendet (s. 2.2.20). Die Durchführung wurde durch vom Hersteller vorgeschlagene Kontrollen überprüft. Die Kontrolle der Erst-Strang-Analyse ergab gute Meßwerte für die Reaktionsausbeute und auch eine Agarosegelaufreinigung zeigte das erwartete Ergebnis. Im weiteren Verlauf wurden dann die Fragmente hergestellt, die für die Klonierung verwendet werden sollten. Damit sichergestellt war, daß möglichst lange Inserts vorliegen, wurde eine Größenfraktionierung über Chromatographiesäulen durchgeführt. Die Größenfraktionierung wurde anschließend in einem Agarosegel überprüft. Weiterhin wurde ein Teil der eluierten Proben in einem Szintillationszähler durchgemessen (Cerenkov counts) um die vorliegenden cDNA-Konzentrationen und -Mengen zu bestimmen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden nun die am besten geeigneten Fraktionen ausgewählt. Die weiteren Schritte wurden wie im Protokoll des Herstellers beschrieben durchgeführt. Nach der Elektroporation lagen insgesamt $1,8 \times 10^5$ Kolonien vor. Die Ausbeute in Bezug auf die Kolonienzahl war damit zu gering, um die Vollständigkeit der cDNA-Bank gewährleisten zu können. Eine präzise Bestimmung der Fehlerquelle war nicht möglich. Weiterhin gab es Schwierigkeiten bei der Kultivierung der benötigten Zellen, so daß bis zu diesem Zeitpunkt leider keine komplette cDNA-Bank vorliegt.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von MHC Klasse I-Molekülen des Rhesusaffen. Diese Klasse von Molekülen spielt eine besondere Rolle bei der Induktion der zytotoxischen Immunantwort. Sie schützen gegen eine Reihe von viralen Infektionen, wie in einigen Studien, sowohl in Tieren als auch im Menschen, nachgewiesen wurde. So wurde in einer Studie beschrieben, daß im Menschen eine CTL-Antwort gegen multiple konservierte HIV-Epitope zu einer Resistenz gegen HIV-Infektionen führen kann (Rowland-Jones et al., 1998). In einer Tierstudie mit 5 Rhesusaffen-Geschwistern wurde gezeigt, daß nur Rhesusaffen mit bestimmten MHC Klasse I-Allelen eine CTL-Antwort gegen SIV entwickeln konnten. Die beiden Tiere, die diese MHC-Allele hingegen nicht hatten, starben sehr schnell nach der Infektion (Evans et al., 1999). Der Einfluß der CD8⁺-T-Zellen wurde auch durch Untersuchungen in CD8⁺-T-Zell depletierten Rhesusaffen nachgewiesen. Die Abwesenheit dieser Zellen führte in chronisch SIV-infizierten Rhesusmakaken zu einer erhöhten Virämie (Jin et al., 1999; Schmitz et al., 1999). Bei Depletion von CD8⁺-T-Zellen in der Frühphase der Infektion hingegen kam es zur Ausbildung einer unkontrollierten Virämie, der Unfähigkeit neutralisierende Antikörper zu bilden und zu einem schnellen Krankheitsverlauf (Schmitz et al., 1999).

Bislang sind die Informationen über die MHC Klasse I Region des Rhesusaffen wesentlich spärlicher als die über die MHC Klasse II-Region. Deshalb besteht im Bereich der Charakterisierung der Rhesusaffen MHC Klasse I-Moleküle und –Gene ein großer Nachholbedarf. Durch das zunehmende Wissen über den Rhesusaffen-MHC ist es möglich, dessen Einfluß auf den Krankheitsverlauf genauer zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden MHC Klasse I-Allele von 94 SIV-infizierten Rhesusaffen charakterisiert. Mit der DGGE und PCR-SSP wurde ihre MHC Klasse I-Ausstattung typisiert. Die gewonnenen Ergebnisse dienen anschließend dazu, mögliche Assoziationen bestimmter Allele mit dem Krankheitsverlauf zu finden. Auf der Grundlage einer MHC-Typisierung können Tiere vor Versuchsbeginn ausgewählt werden und so die Zuverlässigkeit der Resultate bei relativ kleinen Tierzahlen verbessert werden.

4.1 Identifizierung von *Mamu* MHC Klasse I-Allelen

Die Unterschiede zwischen einzelnen MHC Klasse I-Allelen beschränken sich mitunter auf einige wenige Nukleotidaustausche. Die zur Identifizierung der Allele gewählte Methode muß daher eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit besitzen. Weiterhin sollte die Methode die Typisierung vieler Tiere in einer kurzen Zeit zulassen. Am Anfang wurden serologische Techniken zur Bestimmung der Rhesusaffen MHC-Allele verwendet. Diese Methoden sind allerdings recht ungenau. Für die Identifizierung der MHC Klasse I-Allele bieten sich heute verschiedene andere Methoden an. Die eindimensionale isoelektrische Fokussierung ist ein elektrophoretisches Verfahren. Dabei wandert ein Polypeptid in einem Gel durch einen pH-Gradienten bis zu dem Punkt, an dem seine Nettoladung null ist. Die Nettoladung hängt dabei von vielen Faktoren wie der Konformation oder Glykosylierungen ab. Trotzdem ist es möglich, daß MHC-Moleküle mit verschiedenen Sequenzen an einem Punkt im Gel fokussieren.

Die Methode des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) besteht darin, daß PCR-Produkte (PCR-RFLP) der zu untersuchenden DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen in kleinere Fragmente zerschnitten werden. Diese Fragmente werden über eine Gelelektrophorese aufgetrennt. Sind die DNA-Sequenzen bekannt, kann über das Bandenmuster auf die Allele geschlossen werden. Der Nachweis von Punktmutationen ist mit dieser Methode nur möglich, falls durch die Mutation eine neue Schnittstelle geschaffen oder eine vorhandene zerstört wird. Da die Zahl der allelischen Varianten, die man identifizieren kann gering ist, die Allele bekannt sein müssen und keine Möglichkeit zu einer Sequenzierung neuer Allele besteht, wurde diese Methode nicht verwendet. Für die Analyse weniger Tiere ist der Aufbau einer cDNA-Bank und die anschließende Sequenzierung der Klasse I-Allele eine gut anwendbare Methode. Allerdings ist sie für die Untersuchung einer großen Anzahl von Tieren oder für eine routinemäßiges Typisierung unpraktikabel.

Die Single Strand Conformation Polymorphism Methode (SSCP) (Orita et al., 1989) basiert auf der Grundlage, daß geringfügige Änderungen in der Sequenz eines Fragments zu Konformationsänderungen bei einer bestimmten Temperatur führen. Dies wiederum äußert sich in unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten in einem PAGE. Unter geeigneten Bedingungen kann mit dieser Methode ein hoher Probendurchsatz erzielt werden. Allerdings ist die Verwendung auf Fragmentlängen von 200-300 bp beschränkt. Weiterhin liegen die aufgetrennten Fragmente im Gel als einzelsträngige DNA vor und können so nicht direkt eluiert und sequenziert werden. Für die MHC-Typisierung ist die SSCP somit nicht geeignet, da weder eine genaue Bestimmung von Allelen mit Hilfe solch kurzer Fragmente möglich und eine Sequenzierung nur mit hohem Aufwand durchführbar ist.

Die relativ neue Methode der Reference Strand Mediated Conformation Analysis (RSCA) (Argüello et al., 1998) basiert auf Differenzen innerhalb der Konformationen von

verschiedenen MHC-Allelen. Dabei werden in einer PCR Fluoreszenzmarker-gekoppelte, Locus-spezifische Oligonukleotide eingesetzt. Die entstehenden PCR-Fragmente werden in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Aufgrund der unterschiedlichen, sequenzabhängigen Konformationen ist die Laufgeschwindigkeit der Allele im Gel verschieden. Die Auftrennung geschieht in einem automatischen Sequenzer. DNA-Fragmente, die ein markiertes Oligonukleotid enthalten, werden dabei detektiert und können anhand eines Verhältnisses der Laufstrecke und zweier Marker über eine entsprechende Software identifiziert werden. Die Verhältnisse der allelspezifischen Mobilitäten müssen allerdings in Vorversuchen ermittelt werden. Die RSCA erlaubt damit zwar die Trennung langer Fragmente und die Identifizierung einer großen Anzahl von Allelen in einem Versuch, allerdings müssen die Sequenzen der zu untersuchenden Loci sowie das Laufverhalten der zu suchenden Allele bekannt sein. Die Sequenzierung neuer Allele ist damit nicht möglich. Diese Methode ist außerdem mit einem hohen experimentellen, technischen und finanziellen Aufwand verbunden. Im Hinblick auf den Zeitaufwand zeigt die RSCA im Vergleich zu anderen Methoden keine Vorteile wie eine wesentlich kürzere Gellaufzeiten.

Als eine weitere Methode bietet sich die DGGE an. Bei dieser abgewandelten Art der PAGE können Mutationen in PCR-Fragmenten von über 500 bp erkannt werden. Die Genauigkeit der Methode ist theoretisch so hoch, daß auch Punktmutationen sicher nachgewiesen werden können. Weiterhin ist die Analyse der aufgetrennten Fragmente durch eine direkte Sequenzierung problemlos möglich. Theoretisch bietet sich deshalb die DGGE als eine Methode an, die eine hohe Genauigkeit aufweist und deren experimenteller Aufwand sich in einem vertretbaren Rahmen hält. Die Untersuchung von 12 Tieren mit der DGGE ergab u.a. die in Tabelle 5 gezeigten Ergebnisse. Bei der Durchführung dieser Analysen zeigte sich, daß die Identifizierung von *Mamu MHC* Klasse I-A-Allelen mit Hilfe der DGGE akzeptable Ergebnisse erbrachte. Die Anzahl der gefundenen Allele pro Tier lag im Rahmen dessen, was auch von anderen Gruppen mit Hilfe anderer Methoden gefunden wurde. Die Bestimmung von *Mamu MHC* Klasse I-B-Allelen hingegen funktionierte nur mangelhaft. Hier kam es häufig nur zu einer unvollständigen Auftrennung der PCR-Produkte oder es zeigten sich mehrere Banden, die allerdings alle dasselbe Allel darstellten. Auch trotz vielfacher Optimierungsversuche konnten keine Verbesserungen erzielt werden. Die Verwendbarkeit der DGGE scheint in hohem Maße von den verwendeten Ausgangsequenzen abzuhängen, da die Trennung von *Mamu MHC* Klasse II-DRB-Allelen ohne Probleme möglich ist. Insgesamt betrachtet kann die DGGE für die Bestimmung von *Mamu MHC* Klasse I-A-Allelen verwendet werden. Allerdings ist die Typisierung großer Tierzahlen mit dieser Methode nur unter optimalen Bedingungen möglich. Mit Hilfe der *Mamu MHC* Klasse I-Sequenzen wurden anschließend sequenzspezifische Primer konstruiert und in der PCR-SSP eingesetzt. Diese Technik ist schon seit längerem bekannt und wird auch für die Identifizierung von HLA-

Allelen eingesetzt (Bunce et al., 1995). Durch die neu konstruierten, spezifischen Primer wurden auch Allele in den Tieren gefunden, die vorher in der DGGE nicht zu trennen waren. Dies verdeutlicht nochmals die angesprochenen Schwierigkeiten der DGGE.

Insgesamt ist festzustellen, daß die von uns etablierten *MHC* Klasse I-Typisierungsmethoden mit den entwickelten, sequenzspezifischen Primern eine Charakterisierung der *MHC*-Gene von Rhesusaffen ermöglichen. Die Überprüfung der Screening-Ergebnisse mittels direkter Sequenzierung zeigt, daß die etablierten Methoden schnell und einfach in der Anwendung und die Ergebnisse reproduzierbar sind (s. Tab 5). Versuchstiere können so routinemäßig charakterisiert und/oder für Studien vorselektiert werden. Nach der Optimierung und Etablierung der Methoden für die einzelnen Allele könnte sich die Methode auch zu einem Hochdurchsatzverfahren ausbauen lassen, um große Zahlen von Tieren schnell und vielleicht auch automatisch zu typisieren.

4.2 Häufigkeitsverteilung von *Mamu* MHC Klasse I-Allelen

Mit Hilfe der in 4.1 beschriebenen Methoden wurde die MHC Klasse I-Ausstattung von 94 SIV-infizierte Rhesusaffen untersucht. Ermittelt wurden die Frequenzen mit denen die einzelnen Allele vorliegen. Diese Angaben können unter Umständen Aufschluß darüber geben, ob ein bestimmtes Allel weiter untersucht werden sollte oder als Marker verwendet werden kann. Hierbei ist zu beachten, daß sowohl Allele mit geringen Häufigkeiten als auch sehr häufig vorkommende Allele meistens keine genauen statistischen Analysen bzw. Aussagen über mögliche Assoziationen mit dem Krankheitsverlauf zulassen.

Tabelle 10: Allelfrequenzen der am DPZ gehaltenen Tiere und die Verteilung der Allelhäufigkeiten innerhalb der Tiergruppen unterschiedlicher Herkunft

Allel- bezeich- nung	Allelhäufigkeit						Literatur- angaben %
	aller Tiere		DPZ Tiere		LABS Tiere		
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	
A*01	14	15,3	10	17,9	4	11,1	23 ¹
A*02 ⁶	15	16,0	3	5,4	12	31,6	18 - 28 ⁴
A*02 ⁷	45	47,9	22	40,0	23	63,9	
A*04	64	70,3	44	80,0	20	55,6	4 ¹
A*08	44	48,4	28	51,0	16	44,4	31 ¹ / 63 ²
A*11	2	2,2	0	0	2	5,6	8 ¹
A*1302	12	13,2	2	3,6	10	27,8	42 ³
A*1303	20	22,0	13	23,6	7	19,4	
NA4	20	22,0	16	29,1	4	11,1	
NA7	74	81,3	46	83,6	28	77,8	
B*01	20	22,0	7	12,7	13	36,1	58 ¹
B*07	26	28,6	10	17,9	16	44,4	58 ¹
B*12	51	56,0	37	67,3	14	38,9	43 ²
B*17	5	5,5	2	3,6	3	8,3	4 ¹ / 12 ⁵
NB2	18	19,8	12	21,8	6	16,7	
NB4	7	7,7	5	9,0	2	5,6	
NB5	18	19,8	14	25,5	4	11,1	

¹ Urvater et al., 2000; ² Voss & Letvin, 1996; ³ Urvater et al., 2000; *Mamu*-A*1301-1303; ⁴ Robinson et al., 2001; ⁵ Horton et al., 2001; ⁶ Primer s. Robinson et al., 2001; ⁷ eigene Primer

Die Tab. 10 zeigt die ermittelten Genfrequenzen der am DPZ gehaltenen Tieren sowie die Allelfrequenzen, die von anderen Gruppen in Publikationen angegeben wurden. Für die Allele *NB2*, *NB5* und *NA4* sind natürlich keine Vergleiche in Bezug auf die Häufigkeit mit anderen Kolonien möglich, da es sich um neu identifizierte Allele handelt. Die Allele *A*11*, *B*17* und *NB4* kommen in <10% der Tiere vor. Die Verteilung dieser Allele ist innerhalb der DPZ- und der LABS-Tiere ungefähr gleich. In einer anderen Population wurde eine ähnliche Häufigkeit für *Mamu*-*A*11* gefunden. Das Allel *Mamu*-*B*17* kommt hingegen in den Kolonien

verschiedener Primatenzentren mit Frequenzen von 0% – 17% (Durchschnitt 12%) vor (Horton et al., 2001). Demnach sind die genetischen Grundlagen zwischen unterschiedlichen Zuchtcolonien durchaus verschieden und die Ergebnisse von Infektionsversuchen mit diesen Tieren deshalb nicht unbedingt vergleichbar. Sehr häufig kommen die Allele *A*04* und *NA7* in den untersuchten Tieren vor. *Mamu-A*04* liegt dabei in 70% der Tiere vor. Auffällig ist das unterschiedlich häufige Vorkommen bei den DPZ- und den LABS-Tieren. *A*04* kommt in 80% der DPZ-Tiere aber nur in 56% der LABS-Tiere vor. Aus einer anderen Quelle ist außerdem eine Frequenz von nur ca. 4% positiver Tiere bekannt. Das Allel *NA7* kommt in ca. 80% der Versuchstiere vor. Erstaunlich ist, daß in noch keiner Veröffentlichung dieses Allele erwähnt wurde, da es mit 80% sehr häufig in den hier typisierten Tieren vorkam. Die hohe Frequenz läßt auf ein stark konservatives Allel und somit auch auf ein Vorkommen in anderen Colonien schließen. Eine Assoziation mit dem Krankheitsverlauf von SIV ist bei diesem Allel nicht gegeben. Die Allele *Mamu-B*01* und *-B*07* kommen mit knapp über 20% vor. Von einer anderen Quelle sind Werte von ca. 58% bekannt. Diese Angaben wurden durch Klonierung und eine anschließende Sequenzierung bzw. PCR-SSP mit darauf folgender direkter Sequenzierung ermittelt (Urvater et al., 2000). Auch hier sind keine Assoziationen mit dem Krankheitsverlauf zu finden.

Der Nachweis des Allels *Mamu-A*02* ergab zuerst eine Frequenz von 48% positiven Tieren. Dabei waren 40% der DPZ-Tiere und 64% der LABS-Tiere Träger dieses Allels. Ein Teil der positiven *A*02*-Proben wurde sequenziert. Die Sequenzen zeigten jedoch Unterschiede zu den Sequenzen der DGGE-Proben und der publizierten *A*02*-Sequenz (Genbank, NCBI). Untereinander waren diese Proben jedoch identisch. Diese Schwierigkeiten wurden auch von einer anderen Arbeitsgruppe publiziert (Lobashevsky & Thomas, 2000). Die Gründe für die Unterschiede liegen möglicherweise im technischen Bereich oder Besonderheiten bei der PCR-Reaktion. In einer neueren Untersuchung wurde ebenfalls das Allel *Mamu-A*02* mittels PCR-SSP nachgewiesen. Dieses MHC Klasse I-Molekül ist in der Lage ein Nef-Epitop CD8⁺-T-Zellen zu präsentieren. In SIV- und SHIV-infizierten Rhesusaffen konnte eine entsprechende Immunantwort induziert werden (Robinson et al., 2001). Zur Überprüfung der eigenen Ergebnissen wurden die dort veröffentlichten Primer verwendet und nochmals alle 94 Tiere typisiert. Das Allel *Mamu-A*02* kam in den untersuchten Tieren mit 16% vor. Diese Tiere waren ausschließlich solche, die auch mit den von uns verwendeten Primern in der PCR-SSP als positiv erkannt wurden. Abhängig von der untersuchten Affenpopulation, soll die Allelfrequenz zwischen 18%-28% liegen (Robinson et al., 2001). Hierbei zeigt sich, daß nur 5,4% der DPZ-Tiere *A*02*-Träger sind. Mit einem Prozentsatz von 32% ist *A*02* in den LABS-Tieren hingegen recht häufig vertreten. Eine Assoziation mit dem Krankheitsverlauf wurde bei diesem Allel nicht gefunden.

Ein weiteres interessantes Allel ist *Mamu-A*1303*. Dieses Allel kommt mit 22% recht häufig in der untersuchten Kohorte vor und ist außerdem signifikant mit langsamen Krankheitsverlauf assoziiert. Weiterführende Untersuchungen zur Sequenz der präsentierten *Mamu-A*1303*-Peptide und der induzierten Immunantwort sind interessant. Leider liegen keine Angaben darüber vor, ob dieses Allel in anderen Kolonien ähnlich häufig vorkommt.

Die hier ermittelten Genfrequenzen der gefundenen Allele und die Genfrequenzen dieser Allele aus anderen Kolonien zeigen, daß sich die Zuchttiere in ihren genetischen Grundlagen stark unterscheiden. Der Genpool der Ausgangspopulation sowie das Zuchtmanagement sind zwei Faktoren, die den bestehenden genetischen Hintergrund einer Gruppe beeinflussen. Die genetische Diversität von Rhesusaffen läßt sich durch die Typisierung ihrer *MHC*-Allele gut erkennen.

4.3 Sequenzvergleich und phylogenetische Analyse der neu identifizierten *Mamu MHC* Klasse I-Allele

Die Sequenzvergleiche der Aminosäuren- und Nukleotidsequenzen zeigten deutlich, daß bei manchen der gefundenen neuen Allele Ähnlichkeiten mit schon bekannten Allelen vorhanden sind. Von besonderem Interesse sind *Mamu-MHC* Klasse I-Allele, die mit dem SIV-Infektions- und Krankheitsverlauf im Rhesusaffen assoziiert sind. Wie mehrfach erwähnt, spielt hierbei die CD8⁺-T-Zell-Antwort eine wichtige Rolle. Die Bindung und Präsentation von Antigenpeptiden durch die *MHC* Klasse I-Moleküle an den T-Zell-Rezeptor initiiert diese Immunantwort. Die PBR wird dabei von den α_1 - und α_2 -Domänen der schweren Kette des *MHC*-Moleküls gebildet. Die Aminosäure- bzw. Nukleotidsequenzen der für diese Region kodierenden Exons 2 und 3 wurden deshalb für eine vergleichende phylogenetische Analyse ausgewählt. Mit der "neighbor-joining"-Methode wurde ein phylogenetischer Baum (Abb. 8) konstruiert. Die genetischen Distanzen wurden mit der Maximum-Likelihood-Methode berechnet. Durch diese Analysen sollten die Beziehungen zwischen den verschiedenen Allelen deutlicher dargestellt werden.

Auffällig ist, daß sich die *Mamu-A*-Allele in zwei Gruppen aufspalten während sich die *Mamu-B*-Allele in mehrere kleinere Gruppen aufteilen. Die *B*-Allele besitzen untereinander offenbar eine größere Diversität in ihren Sequenzen als die *A*-Allele. Dies könnte darauf hinweisen, daß es bei Rhesusaffen mehr *Mamu MHC* Klasse I *B*-Allele als *Mamu MHC* Klasse I *A*-Allele gibt. Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich, stehen im Menschen 225 *A*-Allele 444 *B*-Allelen gegenüber. Für den Rhesusaffen hingegen sind bislang nur relativ wenige Klasse I-Allele publiziert worden (15 *A*, 16 *B*), aber man geht von einer höheren Gesamtzahl als beim

Menschen aus. Sollten das Verhältnis zwischen *A*- und *B*-Allelen ähnlich wie beim Menschen sein, könnte dies die in Abbildung 8 beobachtete Diversität der *B*-Allele erklären.

Im Gegensatz dazu besteht eine der monophyletischen *A*-Gruppen beispielsweise aus den Allelen *Mamu-A*01*, *-A*02*, *-A*04*, *-A*12*, *-A*1301-A*1303*, *-NA4* und *-NA7* auf. Die enge Beziehung zwischen diesen Allelen wird durch den hohen Resampling-Wert von 89% dargestellt. Interessant an dieser Gruppe ist, daß mit *Mamu-A*01* und *-A*1303*, zwei Allele vorkommen, die mit dem Krankheitsverlauf signifikant assoziiert sind. Hier könnte nun vermutet werden, daß Allele, die mit den eben genannten eng verwandt sind, auch einen Einfluß auf den Krankheitsverlauf haben könnten. Diese Vermutung konnte aber nicht bestätigt werden. Das Allel *NA4* z.B. zeigt eine hohe Übereinstimmung mit *A*1303*. Die einzigen Unterschiede zu *A*1303* sind zwei Aminosäureaustausche auf den Positionen 11 und 12 in Exon 2 (Abb. 6). Diese Positionen haben keinen Einfluß auf die Bindungstaschen und in beiden Fällen wird eine Aminosäure durch eine zweite ersetzt, die ähnliche Eigenschaften aufweist.

4.4 *Mamu* MHC Klasse I-Peptidbindungsmotive und –taschen

Für Untersuchungen der zellulären Immunantwort bei SIV oder HIV sind genaue Kenntnisse der MHC Klasse I-Moleküle und der gebundenen Peptide notwendig. Die Komplexität des MHC erschwert dabei den direkten Vergleich von Immunantworten infizierter Individuen. Deshalb ist eine vollständige genetische Charakterisierung des MHC unabdingbar, um über diese Grundlagen die relevanten strukturellen und genetischen Unterschiede der MHC-Moleküle in Individuen mit einer schützenden oder ineffizienten Immunantwort zu finden.

MHC-Moleküle präsentieren gebundene Antigenpeptide an der Zelloberfläche. Dabei werden zwei Anforderungen an sie gestellt. Zum einen sollen sie eine möglichst große Anzahl unterschiedlicher Peptide präsentieren können, damit auf viele Pathogene effektiv reagiert werden kann. Zum anderen muß die Bindungsaffinität der Peptide zum MHC-Molekül so hoch sein, daß die Präsentation des Peptid-MHC-Komplex an die Zelloberfläche und die Erkennung des Komplexes durch den T-Zell-Rezeptorkomplex von CD8⁺-T-Zellen möglich wird. Derart stabile Bindungen benötigen in der Regel hochspezifische Interaktionen zwischen dem Peptid und dem MHC-Molekül. Die Struktur der MHC-Moleküle erlaubt, diesen beiden Anforderungen gleichzeitig gerecht zu werden. Eine enge Bindung des Peptids mit dem MHC-Molekül wird durch wenige invariante Verankerungsreste hergestellt. Dabei ragen die Aminosäureseitenketten dieser Verankerungsreste in die Bindungstaschen der PBR hinein. Die Fähigkeit der Bindungstaschen ein bestimmtes Peptid zu binden und dieses zu präsentieren, hängt von ihrer Aminosäuresequenz und der daraus abgeleiteten

Tertiärstruktur ab. Ein konkretes Beispiel für die Auswirkungen anderer Aminosäuren liefert das Molekül HLA-B*27. Experimentell ausgetauschte Aminosäuren auf den Positionen 45 (E) und 67 (C) führen dazu, daß es weder zu einer Peptidbindung, einer Oberflächenexpression oder einer CTL-Antwort kommt (Buxton et al., 1992; Rojo et al., 1993).

Die an humanen MHC Klasse I-Molekülen gebundenen Peptide besitzen an beiden Enden Verankerungsreste. Die Positionen P2 und P9 sind hier hauptsächlich für die spezifische Bindung des Peptidonomers zuständig. Am Carboxyl-Ende (P9) befindet sich dabei fast immer ein hydrophober Rest. Die Länge der Peptide beträgt 8-11 AS, wobei Peptide mit 9 AS bevorzugt gebunden werden (Jardetzky et al., 1991; Rammensee et al., 1995). Die Untersuchungen über die Peptidbindungsmotive beim Rhesusaffen sind noch nicht so weit fortgeschritten wie beim Menschen. Allerdings liegen Studien vor, die die Peptidbindungsmotive der Liganden für die Allele *Mamu-A*01*, *-A*11*, *-B*03*, *-B*04* und *-B*17* charakterisiert haben (Allen et al., 1998; Dzuris et al., 2000; Sidney et al., 2000). Während sich bei *A*11* und *B*03*, ebenso wie bei den meisten HLA-gebundenen Peptiden, die Verankerungsreste an den Positionen P2 und P9 befinden, wird bei *B*04* und *B*17* nur jeweils ein primärer Verankerungsrest benötigt. Während bei *B*04* der Hauptverankerungsrest an P2 liegt, ist für *B*17* die Position P9 für die optimale Peptidbindung wichtig. Die Bindung der Peptide wird bei den zuletzt genannten Allelen und *B*03* allerdings noch von sekundären Verankerungsresten beeinflusst. Weiterhin zeigte sich, daß für das Allel *Mamu-A*01* besondere Voraussetzungen erfüllt sein müssen. Es werden in diesem Fall drei Verankerungsreste innerhalb des Peptids benötigt. Dabei handelt es sich um die Positionen P2, P3 und den C-Terminus (P9). Eine optimale Bindung des Peptids ist dabei an das Vorhandensein von S oder T an P2, P an der Hauptankerposition P3 und einem hydrophoben oder aromatischen Rest an P9 gebunden. Die Anwesenheit der Aminosäure Prolin an P3 ist dabei unbedingt notwendig. Die teils deutlichen Unterschiede zwischen diesen wenigen charakterisierten Peptiden lassen auf eine hohe Diversität der Peptidbindungsmotive im Rhesusaffen schließen. Außerdem ist zu erkennen, daß die Hauptverankerungsreste nicht in dem Maße an den Positionen P2 und P9 zu finden sind, wie dies für den Menschen zutrifft.

Tabelle 11 zeigt für verschiedene MHC-Allele aus welchen Aminosäuren die Taschen (B, C, F) gebildet werden. Anhand dieser Tabelle ist der Vergleich der Bindungstaschen einiger protektiver und nicht-protektiver Allele möglich.

Tab. 11: Übersicht über die Aminosäurepositionen einiger Rhesusaffen MHC-Molekül-Taschen

Tasche B (P2)

Allele	Aminosäureposition									
	7	9	24	34	45	63	66	67	70	99
A*01	Y	Y	A	V	M	E	N	M	E	V
A*02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y
A*07	-	-	S	-	E	N	I	C	N	Y
A*11	-	H	T	-	K	-	I	S	N	Y
A*1303	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B*01	-	H	S	-	-	-	K	A	N	H
B*03	-	S	S	-	E	E	-	A	H	Y
B*04	-	S	E	-	-	-	R	A	N	Y
B*07	-	S	E	-	-	A	R	A	N	Y
B*17	-	-	S	-	E	A	R	A	A	Y
NB5	-	H	S	-	E	-	K	A	Q	S
B27	-	H	T	-	E	-	I	C	K	Y
B3901	-	-	S	-	E	N	I	C	N	Y

Tasche C (P3)

Allele	Aminosäureposition								
	9	22	70	73	74	97	99	114	116
A*01	Y	F	E	N	A	R	V	E	Y
A*02	-	-	-	-	-	-	-	H	S
A*07	-	-	N	T	Y	-	Y	-	F
A*11	H	-	N	T	Y	T	Y	D	-
A*1303	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B*01	H	-	N	T	D	M	H	Y	R
B*03	S	-	H	T	D	T	Y	H	-
B*04	S	Y	N	T	F	W	Y	D	F
B*07	S	Y	N	T	H	W	Y	-	F
B*17	-	-	A	T	H	K	Y	H	S
NB5	H	-	Q	T	D	W	S	R	D
B27	H	-	K	T	D	N	Y	D	-
B3901	-	-	N	T	D	-	Y	N	F

Tasche F (P9; C-terminal)

Allele	Aminosäureposition									
	73	77	80	81	84	95	116	118	123	*
A*01	N	N	T	L	Y	L	Y	Y	Y	
A*02	-	-	N	-	-	I	S	-	-	
A*07	T	S	N	-	-	I	F	-	-	
A*11	T	-	-	A	-	F	-	-	-	
A*1303	-	A	N	-	-	F	-	-	-	
NA4	-	A	N	-	-	F	-	-	-	
B*01	T	-	I	A	-	-	R	-	-	
B*03	T	D	N	-	-	-	-	-	-	
B*04	N	G	N	-	-	Y	F	-	-	
B*07	T	-	-	A	-	-	F	-	-	
B*17	A	-	-	A	-	I	S	-	-	
NB5	Q	D	-	-	-	I	D	-	-	
B27	T	S	-	-	-	-	-	-	-	
B3901	T	S	N	-	-	-	F	-	-	

In diesen Taschen binden die Verankerungsreste der Peptidseitenketten. Die Aminosäuren an den unten aufgeführten Aminosäurepositionen bestimmen die Struktur, die Größe und die chemischen Eigenschaften der Taschen. In der Tabelle sind zu A*01 gleiche Aminosäuren durch einen (-) ersetzt. * die Aminosäuren an den Positionen 124, 143, 146 und 147 der F-Tasche sind bei allen Allelen identisch und wurden nicht eingetragen.

Die Bindung des Peptids an P2 erfolgt in der B-Tasche der PBR. Für die meisten bisher definierten Peptidmotive ist P2 ein primärer Verankerungsrest. Die Eigenschaften der

gebundenen Aminosäurereste können dabei stark differieren. Auffällig für diese Tasche ist, daß sowohl *Mamu-A*01* als auch *Mamu-A*1303* und *NA4*, dieselbe Aminosäuresequenz an den für die Eigenschaften der Tasche wichtigen Positionen (Urvater et al., 2000) aufweisen. Weiterhin besitzt auch *Mamu-A*02*, bis auf Position 99, identische Aminosäuren. Alle anderen Allele variieren hingegen stark. Der Grund hierfür könnte in einem Selektionsdruck liegen, der eine funktionelle Diversität induziert damit eine möglichst hohe Zahl an verschiedenen Peptiden gebunden wird und eine breite Immunantwort ausgelöst werden kann.

Eine weitere Tasche, die als C-Tasche bezeichnet wird, ist in die Peptidbindung involviert. Die C-Tasche wird von den Aminosäuren der Positionen 9, 22, 70, 73, 74, 97, 99, 114 und 116 gebildet. In dieser Tasche bindet der P3 Verankerungsrest des Peptids. Für die meisten der bisher untersuchten Peptidmotive spielt P3 anscheinend keine Rolle bei der Peptidbindung. Eine Ausnahme bildet dabei das Molekül *Mamu-A*01*. Ähnlich wie bei der B-Tasche sind die Aminosäurepositionen von *Mamu-A*01*, *-A*1303* und *NA4* mit identischen AS besetzt. Die Tasche von *Mamu-A*02* unterscheidet sich in den letzten beiden Positionen von *A*01*. Auch hier weisen die restlichen Taschen große Unterschiede auf.

In der F-Tasche bindet der Verankerungsrest des C-Terminus. Hierbei handelt es sich für die, von *A*11*, *B*03* und *B*17* gebundenen Peptide um einen primären Verankerungsrest, während diese Peptidposition für *A*01* einen sekundären Verankerungsrest darstellt. Der Wert für optimale Peptidbindung hängt also stark vom Allel ab. Auch hier besitzen die Allele *A*1303* und *NA4* wieder dieselbe Zusammensetzung der Tasche, während sich alle anderen Taschen untereinander nicht sehr ähnlich sind. Dabei ist aber zu beachten, daß diese Aussage nur für die Aminosäurepositionen bis einschließlich 116 zutrifft. Die weiteren Positionen bis 147 sind bei allen Allelen identisch. Demnach hat dieser Bereich der Tasche für die spezifische Peptidbindung keine Bedeutung.

Die vorliegenden Angaben können aber kaum einen Einfluß der Peptidbindungstaschen auf eine mögliche Immunantwort voraussagen. Die Allele *Mamu-A*1303* und *NA4* unterscheiden sich lediglich durch 2 Aminosäureaustauschen an den Positionen 11 und 12. Dabei werden ein Serin gegen ein Threonin (beide mit unpolaren Seitenketten) sowie ein Methionin gegen ein Valin (beide mit ungeladenen polaren Seitengruppen) ausgetauscht. Die angesprochenen Positionen sind dabei nicht an der Bildung von Bindungstaschen beteiligt. Folglich sollten beide Allele identische SIV-Epitope binden und präsentieren. Bei den von uns typisierten SIV-infizierten Rhesusaffen zeigte sich aber, daß *Mamu-A*1303*, im Gegensatz zu *NA4*, mit einem langsamen Krankheitsverlauf assoziiert ist. Um dies zu erklären reicht unser Wissen über die Peptidbindungen möglicherweise nicht aus. Auch könnten weitere sekundäre Verankerungsreste eine Rolle spielen oder andere Aminosäure-kombinationen die Peptidbindung beeinflussen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wären unterschiedliche

Expressionsmuster der Mamu MHC-Moleküle. Einige Polypeptide werden unter Umständen nur in geringen Mengen exprimiert, die zur Induktion einer Immunantwort nicht ausreichen.

4.5 Bedeutung und Einfluß der MHC Klasse I-Moleküle für die zell-vermittelte Immunantwort bei SIV/HIV-Infektionen

Die virus-spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort gegen HIV (Walker et al., 1986, Koup et al., 1994). Aus diesem Grund sollen HIV-Impfstoffe auch eine CD8⁺-T-Zell-Antwort induzieren.

Bislang wurden 14 Epitope, drei in Env, vier in Gag, vier in Pol, sowie je eines in Vif, Vpx und Tat charakterisiert, die bei Rhesusaffen von *Mamu-A*01* präsentiert werden (Allen et al., 1998, Furchner et al., 1999, Evans et al., 2000, Allen et al., 2001). Daneben wurden die MHC Klasse I-Moleküle *Mamu-B*03*, *-B*04* und *B*17* beschrieben, die Epitope binden, die im nef-Gen von SIV lokalisiert sind (Horton et al., 2001), sowie die Allele *Mamu-A*11* und *-B*03* die beide ein env-Epitop erkennen. Die Kenntnis dieser Epitope und der präsentierenden MHC-Moleküle ermöglicht Untersuchungen der virus-spezifischen CD8⁺-T-Zellpopulationen durch Tetramer-Färbung (McMichael & O'Callaghan, 1998, Allen et al., 1998, Evans et al., 2000). Damit können quantitative Aussagen zur CTL-Antworten in infizierten und vakzinierten Tieren erhalten werden (Allen et al., 2000; Kuroda et al., 1998; Seth et al., 1998).

Für die Entwicklung von Vakzine- und Pathogenitätsstudien sind gerade die SIV oder HIV Epitope von großem Interesse, die eine natürliche Immunantwort gegen das Virus induzieren können. Um diese *Mamu*-Allele zu finden, wurden Nachweismethoden für eine Reihe von Allelen entwickelt und ihr Vorkommen bei einer größeren Anzahl von Tieren untersucht. So wurden *MHC* Klasse I-Allele von Rhesusaffen gefunden, die die Immunantwort nach einer SIV-Infektion positiv beeinflussen. Nach Typisierungen und statistischer Auswertung ergab sich, daß die Allele *Mamu-A*01* und *-A*1303* signifikant mit langsamen Krankheitsverlauf assoziiert sind. Der positive Einfluß dieser Allele auf die Überlebenszeit wurde in Kaplan-Meier-Analysen deutlich gemacht (Abb. 12). Weiterhin wurde festgestellt, daß die Allele *Mamu-A*01* und *NB2* und *NB5* signifikant mit niedriger Virusbeladung assoziiert sind. Diese Ergebnisse ermöglichen die Vorauswahl von geeigneten Versuchstieren mit ähnlichen immunbiologischen Eigenschaften für Impfstoff- und Therapieversuche.

Untersuchungen beim Menschen lassen darauf schließen, daß die HLA-Moleküle, die mit einem langsamen Krankheitsverlauf assoziiert sind, eine höhere Anzahl an HIV-Epitopen binden können als solche, die mit einem schnellen Krankheitsverlauf assoziiert sind (Nelson et al., 1997). Weiterhin wurde im Schimpansen beobachtet, daß Tiere die eine polyclonale CTL-Antwort gegen Hepatitis C-Virus-Epitope entwickelten, in der Lage waren das Virus zu

eliminieren (Cooper et al., 1999). Diese Befunde zeigen, daß eine breite Immunantwort wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Kontrolle der Virusreplikation spielt. Ein ähnliches Ergebnis ergibt sich für den HLA Klasse I-Locus. Eine Heterozygotie für die A- und B-Loci bewirkte einen verlangsamten Krankheitsverlauf in HIV-Infizierten (Carrington et al., 1999). Eine Erklärung hierfür ist die Präsentation eines weiten Spektrums an HIV-1-Peptiden.

Alle diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Anzahl der, von den MHC-Molekülen gebundenen, Peptide und deren Erkennung eine zentrale Rolle bei der Ausbildung einer erfolgreichen Immunantwort zukommt. Wahrscheinlich lassen sich diese Ergebnisse auf die MHC Klasse I-Allele bei Rhesusaffen übertragen. Dafür spricht, daß das mit langsamen Krankheitsverlauf assoziierte Allele *Mamu-A*01* eine große Anzahl unterschiedlicher Epitope binden kann. Dieses Allel bindet eine Vielzahl von Epitopen (Allen et al., 2001). Interessant wäre die Anzahl an Epitopen zu kennen die von anderen MHC-Molekülen gebunden werden, die mit dem SIV-Verlauf im Rhesusaffen assoziiert sind. Dies sind z.B. *Mamu-A*1303* oder *NB5*. Die Allele *A*11* und *B*17* kommen ebenfalls in den von uns untersuchten SIV-infizierten Tieren vor. Bislang sind nur Tiere mit einem langsamen Krankheitsverlauf Träger dieser Allele. Allerdings ist die Anzahl der positiven Tiere zu gering, um statistisch signifikante Angaben machen zu können. Die Verlängerung der Überlebenszeit bei den von uns untersuchten Tieren mit mehreren schützenden Allelen (Abb. 11) spricht dafür, wie die oben genannten Ergebnisse, daß möglichst viele präsentierte Epitope eine stärkere Immunantwort bewirken. Aus der bloßen Anzahl der vorkommenden Allele kann allerdings nicht auf die Wirksamkeit einer Immunantwort geschlossen werden. Bei den von uns untersuchten Tieren konnte z.B. keine signifikante Assoziation zwischen Allelzahl pro Tier und der Überlebenszeit gefunden werden. Die Erkennung und die Eliminierung eines Virus aufgrund eines einzelnen Epitops birgt die Gefahr, daß sich bei einer Mutation der viralen RNA das Virus der Erkennung durch den Wirt komplett entziehen kann. Gerade im Hinblick auf AIDS ist diese Tatsache von Bedeutung, da das HIV eine extrem hohe Mutationsrate aufweist. In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß sich bei der Induktion einer CTL-Antwort „Escape“-Mutanten von HIV und SIV bilden, die sich der Kontrolle des Immunsystems entziehen (Borrow et al., 1997; Evans et al., 1999; Soudeyns et al., 1999). Hier stellt sich die Frage nach der, für eine ausreichende Immunantwort benötigten Anzahl an präsentierten Epitopen und ob neben der Anzahl auch bestimmte „qualitative“ Merkmale des Peptids gegeben sein sollten. Da die stabile Bindung der Peptide an die MHC-Moleküle von großer Bedeutung ist, könnte angenommen werden, daß eine möglichst niedrige Dissoziationskonstante von Vorteil ist. Entsprechende Befunde sind allerdings widersprüchlich. So zeigen die Ergebnisse einer Gruppe, daß eine höhere Stabilität der Bindung nicht zwangsläufig mit einer besseren Immunantwort korreliert (Allen et al., 2001).

Wie aus 3.4 ersichtlich ist, kann die Fähigkeit zur Kontrolle der Virusreplikation nicht unbedingt auf Assoziationen mit einzelnen MHC-Allelen zurückgeführt werden. Infolgedessen liegt die Vermutung nahe, daß die Immunantwort von weiteren Faktoren abhängig ist. So berichtet eine Studie von der Assoziation eines TNF-Mikrosatelliten mit dem Krankheitsverlauf bei HIV-Infizierten (Khoo et al., 1997). Weitere Untersuchungen beim Menschen haben ergeben, daß die TAP-Gene einen Einfluß auf den Krankheitsverlauf bei HIV besitzen. Es konnte nachgewiesen werden, daß bei manchen Allelen eine stärkere Assoziation mit langsamen Krankheitsverlauf vorlag, wenn bestimmte TAP-Moleküle präsent waren (Kaslow et al., 1996).

Insgesamt folgt aus diesen Ergebnissen und Beobachtungen, daß die Charakterisierung der *Mamu* MHC Klasse I-Moleküle sowie die Typisierung von SIV-infizierten Rhesusaffen auf dem gesamten MHC-Locus weiter ausgedehnt werden sollte. Die genaue Kenntnis der MHC-Moleküle und präsentierten Epitope sollten wichtige Informationen zum besseren Verständnis der komplexen Vorgänge zur Induktion einer effizienten CD8⁺-T-Zell-Antwort liefern.

4.6 Wert des Rhesusaffenmodells für die HIV-Forschung

Die Verwendung von Tiermodellen ist unverzichtbar für die rationale Pathogenitäts- und Vakzineforschung. Mit Hilfe von Tiermodellen kann das Wissen über humanrelevante Infektionskrankheiten vergrößert werden, wodurch die Effizienz und die Sicherheit von Vakzinen geprüft und verbessert werden kann. Erst danach sollten klinische Studien am Menschen beginnen. Speziell im Fall der Immunschwächekrankheit AIDS, der global vierthäufigsten Todesursache, sind Tiermodelle von großem Nutzen. Dabei kommen verschiedene Spezies als Versuchstiere in Frage. Arten wie Mäuse und Meerschweinchen sind evolutiv sehr weit vom Menschen entfernt und lassen sich häufig nicht mit humanpathogenen Viren infizieren. Außerdem erkennen ihre MHC-Moleküle andere Epitope. Deshalb eignen sich nicht-humane Primaten häufig besser für Modelluntersuchungen.

Die dem Menschen nächste Spezies ist der Schimpanse (*Pan troglodytes*), dessen genetischer Code zu über 98% mit dem des Menschen übereinstimmt. Es wurden einige Studien mit Schimpansen durchgeführt, da von diesen Tieren auch Zuchtgruppen vorhanden waren. Dabei stellte sich heraus, daß diese Tiere zwar mit HIV-1 infizierbar sind, es aber kaum zur Ausbildung AIDS ähnlichen Symptomen kam. So war z.B. nur ein geringer Abfall der CD4⁺-T-Zellen zu verzeichnen und es wurde bisher nur von sehr wenigen Schimpansen berichtet, bei denen sich einige Symptome von AIDS viele Jahre nach einer Infektion mit HIV ausgebildet hatten (Novembre et al., 1997). Problematisch ist die Verwendung von Schimpansen in der Vakzineforschung auch aufgrund der aufwendigen Haltung, der hohen Kosten und der ethischen Akzeptanz.

Auch deshalb hat sich als Modelltier für die AIDS-Forschung der Rhesusaffe (*Macaca mulatta*) durchgesetzt. Diese Art wird in relativ großer Zahl gezüchtet, so daß auf ein Reservoir an Versuchstieren zurückgegriffen werden kann. Auch können unter Haltings- und Versuchsbedingungen Schwierigkeiten wie unbekannte Infektionsdosen, -wege und -zeitpunkte oder die Einwirkungen einer antiretroviralen Therapie wie bei behandlungsbedürftigen Menschen umgangen werden. Ein weiterer Vorteil ist, daß Makaken nach einer Infektion mit SIV ein Krankheitsbild entwickeln, daß dem des menschlichen AIDS sehr ähnlich ist (Daniel et al., 1987; Levy, 1996). Auch hier findet man einen Abfall der CD4⁺-T-Zellen und die Ausbildung AIDS-ähnlicher Symptome. Die Krankheitsentwicklung und der Krankheitsverlauf sind dabei wesentlich schneller als bei HIV-infizierten Menschen.

Ein berechtigter Kritikpunkt ist, daß HIV und SIV, trotz struktureller und genetischer Ähnlichkeit und vergleichbarem Pathogenitätsspektrum unterschiedliche Viren sind. So sind z.B. Antikörper gegen das HIV-Gen env nicht neutralisierend für SIV und umgekehrt. Weiterhin enthalten beide Viren teils verschiedene akzessorische Gene in ihrem Genom. Ebenso ist die Verwendung von Corezeptoren, die für die Virusaufnahme wichtig sind, unterschiedlich. Diese Unterschiede wurden zum Teil durch die Konstruktion von

rekombinanten Viren aufgehoben. Die HIV-Gene env, pol, rev, tat und vpu wurden eingebaut (Johnston, 2000). Damit können Vakzine im Tiermodell getestet werden, die gegen das HIV env-Gen gerichtet sind. Durch entsprechende Versuche können Informationen gesammelt werden, die bei der Entwicklung von AIDS-Vakzinen sehr hilfreich sind.

Ein weiteres Problem für die Verwendung des Rhesusaffen als Modell ist, daß die Kenntnisse über die genetische Ausstattung der eingesetzten Tiere in den meisten Fällen äußerst gering ist. Schon die Abstammung der Zuchttiere ist häufig nicht bekannt. Es existieren zum Teil keine Stammbäume und oft ist die ursprüngliche geographische Herkunft der Tiere unbekannt. Rhesusaffen sind genetisch wesentlich heterogener als Menschen. Des Weiteren existieren weder Zuchtprogramme, die genetische Merkmale berücksichtigen noch definierte Inzuchtlinien. Deshalb werden in den Versuchen meistens Tiere mit einem heterogenen genetischen Hintergrund eingesetzt, was die Auswertung der Experimente erschwert. Für abgesicherte Aussagen müssen deshalb möglichst große Tierzahlen verwendet werden. Diese Praxis stößt aufgrund ethischer und ökonomischer Probleme an Grenzen. Die Verwendung genetisch charakterisierter Tiere würde es hier ermöglichen, daß auch bei geringen Tierzahlen pro Versuch vergleichbare und aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden können. Diese Arbeit leistet hier einen Beitrag, da mit den hier entwickelten Methoden Rhesusaffen typisiert werden können. In Kenntnis ihrer Allel-Ausstattung ist es möglich, gezielt Tiere vor Versuchen auszuwählen.

Die Verbesserung des Rhesusaffenmodells als zur Zeit geeignetsten Tiermodell für die AIDS-Forschung zur Erforschung von AIDS ist eine wesentliche Voraussetzung für die präklinische Impfstoffentwicklung gegen HIV. Ohne einen effektiven Impfstoff besteht kaum Hoffnung der weiterhin beschleunigten Ausbreitung der HIV-Infektion und AIDS in voraussehbarer Zukunft Einhalt zu gebieten.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten die MHC Klasse I-Moleküle des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) charakterisiert werden. Die Verwendung von Rhesusaffen ist in Tiermodellen für die AIDS-Forschung auf absehbare Zeit unverzichtbar. Der MHC-Komplex spielt für die Suszeptibilität gegenüber Infektionskrankheiten eine wichtige Rolle. Dabei zeigt sich, daß die zytotoxische T-Zell-Antwort von zentraler Bedeutung für die Kontrolle der HIV-Replikation ist (Schmitz et al., 1999). Untersuchungen der MHC Klasse I-Moleküle im Rhesusaffen sind eine Voraussetzung zum exakten Studium der Immunpathogenese von Immundefizienzviren.

Zunächst wurden die benötigten Untersuchungsmethoden etabliert und optimiert. Die MHC Mamu Klasse I-Gene wurden mit den Methoden der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) und der Polymerasekettenreaktion mit allelspezifischen Primern (PCR-SSP) charakterisiert. Die DGGE wurde für die Identifizierung der MHC Klasse I A- und I B-Allele verwendet. Insgesamt wurden 12 Rhesusaffen mit teilweise identischen MHC Klasse II-Genen untersucht. Durch DNA-Sequenzierung wurden 8 neue MHC Klasse I-Allele gefunden. Anschließend wurden 15 allelspezifische Primer konstruiert, die in der PCR-SSP eingesetzt wurden. Damit konnten die Allele *Mamu-A*01*, *-A*02*, *-A*04*, *-A*08*, *-A*11*, *-A*1302-1303*, *-B*01*, *-B*07*, *-B*12* und *-B*17* sowie die neuen Allele *NA4*, *NA7*, *NB2*, *NB4*, *NB5* typisiert werden. Mit diesen Methoden wurden die MHC Klasse I-Gene von 94 SIV-infizierten Rhesusaffen charakterisiert. Die gefundenen Allele wurden zur Validierung der Typisierung sequenziert und die Sequenzen mit bereits veröffentlichten verglichen. Anschließend wurde nach einer signifikante Assoziation der MHC Klasse I-Ausstattung mit dem Krankheitsverlauf von AIDS in den SIV-infizierten Tieren gesucht. Die Allele *Mamu-A*01* und *-A*1303* sind signifikant mit einem langsamen Krankheitsverlauf assoziiert. Die Allele *Mamu-A*01* und *NB2* sind signifikant mit einer niedrigeren Virusbeladung assoziiert. Ferner zeigte die Kaplan-Meier-Analyse das Tiere, die neben *Mamu-A*01* noch mindestens ein weiteres protektives Allel besaßen, eine statistisch signifikant längere Überlebenszeit hatten. Die MHC Klasse I-Allele eines Individuums beeinflussen demnach den Infektionsverlauf.

Wie zu erwarten zeigten die Ergebnisse, daß die zur Zeit verfügbaren Kenntnisse über den Rhesusaffen-MHC noch nicht ausreichen, um den Krankheitsverlauf in allen Tieren sicher vorherzusagen. Zusätzlich scheinen andere genetische Faktoren die Suszeptibilität für SIV zu beeinflussen.

6. Literatur

Allen, T.M., Sidney, J., Guercio, M.-F. del, Glickman, R.L., Lensmeyer, G.L., Wiebe, D.A., DeMars, R., Pauza, C.D., Johnson, R.P., Sette, A. & Watkins, D.I.

Characterization of the peptide-binding motif of a rhesus MHC class I molecule (Mamu-A*01) that binds an immunodominant CTL epitope from SIV.

J. Immunol. 1998; 160: 6062-6071

Allen, T.M., O'Connor, D.H., Jing, P., Dzuris, J.L., Mothé, B.R., Vogel, T.U., Dunphy, E., Liebl, M.E., Emerson, C., Wilson, N., Kunstman, K.J., Wang, X., Allison, D.B., Hughes, A.L., Desrosiers, R.C., Altman, J.D., Wolinsky, S.M., Sette, A. & Watkins, D.I.

Tat-specific cytotoxic T lymphocyte select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia.

Nature 2000; 21: 386-390

Allen, T.M., Mothé, B.R., Sidney, J., Jing, P., Dzuris, J.L., Liebl, M.E., Vogel, T.U., O'Connor, D.H., Wang, X., Wussow, M.C., Thomson, J.A., Altman, J.D., Watkins, D.I. & Sette, A.

CD8⁺ lymphocytes from simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques recognize 14 different epitopes bound by the major histocompatibility complex class I molecule Mamu-A*01: implications for vaccine design and testing.

J. Virol. 2001; 75: 738-749

Altman, J., Moss, P.A.H., Goulder, P., Barouch, D., McHeyer-Williams, M., Bell, J.I., McMichael, A.J. & Davis, M.M.

Direct visualization and phenotypic analysis of virus-specific T lymphocytes in HIV-infected individuals.

Science 1996; 274: 94-96

Androlewicz, M.J., Anderson, K.S. & Cresswell, P.

Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90: 9130-9143

Arankalle, V.A., Chada, M.S., Chobe, L.P., Nair, R. & Banerjee, K.

Cross-challenge studies in rhesus monkeys employing different indian isolates of hepatitis E virus.

J. Med. Virol. 1995; 46: 358-363

Argüello, J.R., Little, A.-M., Bohan, E., Goldman, J.M., Marsh, S.G.E. & Madrigal, J.A.

High resolution HLA class I typing by reference strand mediated conformation analysis (RSCA)

Tissue Antigens 1998; 52: 57-66

Arnaiz-Villena, A., Martinez-Laso, J., Alvarez, M., Castro, M.J., Varela, P., Gomez-Casado, E., Suarez, B., Recio, M.J., Vargas-Alarcón, G. & Morales, P.

Primate Mhc-E and -G alleles.

Immunogenetics 1997; 46: 251-266

Baba, T.W., Liska, V., Khimani, A.H., Ray, N.B., Dailey, P.J., Penninck, D., Bronson, R., Greene, M.F., McClure, H.M., Martin, L.N. & Ruprecht, R.M.

Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques.

Nat. Med. 1999; 5: 194-203

Barré-Sinoussi, F., Cherman, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Daguét, C., Axler-Blin, C., Brun-Vézinet, F., Rouzioux, C., Rosenbaum, W. & Montagnier, L.

Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome.

Science 1983; 220: 456-467

Björkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J. & Wiley, D.C.

Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2

Nature 1987a; 329: 506-512, a

Björkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J. & Wiley, D.C.

The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens

Nature 1987b; 329: 512-518

Bontrop, R.E., Otting, N., Sliereendregt, B.L. & Lanchbury, J.S.

Evolution of major histocompatibility complex polymorphisms and T-cell receptor diversity in primates

Immunol. Rev. 1995; 143: 33-

Bontrop, R.E., Otting, N., de Groot, N.G. & Doxiadis, G.G.M.

Major histocompatibility complex class II polymorphisms in primates

Immunological Reviews 1999; 167: 339-350

Borrow, P., Lewicki, H., Wie, X.P., Horwitz, M.S., Peffer, N., Meyers, H., Nelson, J.A., Gairin, J.E., Hahn, B.H., Oldstone, B.A. & Shaw, G.M.

Antiviral pressure exerted by HIV 1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus.

Nat. Med. 1997; 3: 205-211

Bouvier, M. & Wiley, D.C.

Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class-I molecules.

Science 1994; 265: 398-402

Boyson, J.E., McAdam, S.N., Gallimore, A., Golos, T.G., Liu, X., Gotch, F.M., Hughes, A.L. & Watkins, D.I.

The MHC-E locus in macaques is polymorphic and is conserved between macaques and humans.

Immunogenetics 1995; 41: 59-68

Boyson, J.E., Iwanaga, K.K., Golos, T.G. & Watkins, D.I.

Identification of the rhesus monkey HLA-G ortholog. Mamu-G is a pseudogen.

J. Immunol. 1996; 157: 5428-5437

Boyson, J.E., Shufflebotham, C., Cadavid, L.F., Urvater, J.A., Knapp, L.A., Hughes, A.L. & Watkins, D.I.

The MHC class I genes of the rhesus monkey: different evolutionary histories of MHC class I and II genes in primates

J. Immunol. 1996; 156: 4656-4665

Boyson, J.E., Iwanaga, K.K., Golos, T.G. & Watkins, D.I.

Identification of a novel MHC class I gene, Mamu-AG, expressed in the placenta of a primate with an inactivated G locus.

J. Immunol. 1997; 159: 3311-3321

Brodie, S.J., Lewinsohn, D.A., Patterson, B.K., Jiyamapa, D., Krieger, J., Corey, L., Greenberg, P.D. & Riddell, S.R.

In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic T cells.

Nat. Med. 1999; 5: 34-41

Brown, J.H., Jardetsky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L. & Wiley, D.C.

Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1

Nature 1993; 364: 33-39

Bunce, M., O'Neil, C.M. & Barnardo, M.C.

Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3, -DRB4, DRB5, and -DQB1 by PCR with 144 primer mixtures utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP).

Tissue Antigens 1995; 46: 355-367

Buxton, S.E., Benjamin, R.J., Clayberger, C., Parham, P. & Krensky, A.M.

Anchoring pockets in human histocompatibility complex leukocyte antigen (BLA) class I molecules: analysis of the conserved B ("45") pocket of HLA-B27.

J. Exp. Med. 1992; 175: 809-819

Callaghan, C.A. & Bell, J.I.

Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G

Immunol Rev 1998; 163: 129-138

Carrington, M., Nelson, G.W., Martin, M.P., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J.J., Kaslow, R., Buchbinder, S., Hoots, K. & O'Brien, S.J.

HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage.

Science 1999; 283: 1748-1752

Castro, M.J., Morales, P., Fernández-Soria, V., Suarez, B., Recio, M.J., Alvarez, M., Martín-Villa, M. & Arnaiz-Villena, A.

Allelic diversity at the primate MHC-G locus: exon 3 bears stop codons in all Cercopitheciinae sequences.

Immunogenetics 1996; 43: 327-336

Chakrabarti, L., Guyader, M., Alizon, M., Daniel, M.D., Desrosiers, R.C., Tiollais, P. & Sonigo, P.

Sequenc of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses.

Nature 1987; 328: 543-547

Chen, Z.W., McAdam, S.N., Hughes, A.L., Dogon, A.L., Letvin, N.L. & Watkins, D.I.

Molecular cloning of orangutan and gibbon MHC class I cDNA: the HLA-A and -B loci diverged over 30 million years ago.

J. Immunol. 1992; 148: 2547- 2554

Chicz, R.M., Urban, R.G., Gorga, J.C., Vignali, D., Lane, W.S. & Strominger, J.C.

Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles

J. Exp. Med 1993; 178: 27-47

Collins, K.L., Chen, B.K., Kalams, S.A., Walker, B.D. & Baltimore, D.

HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes.

Nature 391: 397-401, 1998

Cooper, S., Erickson, A.L., Adams, E.J., Kansopon, J., Weiner, A.J., Chien, D.Y., Houghton, M., Parham, P. & Walker, C.M.

Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus.

Immunity 1999; 10: 439-449

Daniel, M.D., Letvin, N.L., King, N.W., Kannagi, M., Sehgal, P.K., Hunt, R.D., Kanki, P.J., Essex, M. & Desrosiers, R.C.

Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques.

Science 1985; 228: 1201-1204

Daniel, M.D., Desrosiers, R.C., Letvin, N.L., King, Schmidt, D.K., Sehgal, P.K., & Hunt, R.D.

Simian models for AIDS

Cancer Detec. Prev. Suppl. 1987; 1: 501-507

Dzuris, J.L., Sidney, J., Appella, E., Chesnut, R.W., Watkins, D.I. & Sette, A.

Conserved MHC class I peptide binding motif between humans and rhesus macaques

J. Immunol. 2000; 164: 283-291

Evans, D.T., O'Connor, D.H., Jing, P., Allen, T.M., Horton, H., Venham, J.E., Rudersdorf, R.A., daSilva, J., Pauza, C.D., Bontrop, R.E., DeMars, R., Hughes, A.L. & Watkins, D.I.

Virus-specific CTL responses select for amino acid variation in SIV Env and Nef.

Nat. Med., 1999; 5: 1270-1276

Evans, D.T., Jing, P., Allen, T.M., O'Connor, D.H., Horton, H., Venham, J.E., Piekarczyk, M., Dzuris, J., Dykhuzen, M., Mitchen, J., Rudersdorf, R.A., Pauza, C.D., Bontrop, R.E., DeMars, R. & Watkins, D.I.

Definition of five new simian immunodeficiency virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes and their restricting major histocompatibility complex class I molecules: evidence for an influence on disease progression.

J. Virol. 2000; 74: 7400-7410

Fisher, S.G. & Lerman, L.S.

DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983; 80: 1579-1583

Franchini, G., Gurgo, C., Guo, H.G., Gallo, R.C., Collalti, E., Fagnoli, K.A., Hall, L.F., Wong-Staal, F. & Reitz, M.S.Jr.

Sequenc of simian immunodeficiency virus and its relationship to the human immunodeficiency viruses.

Nature 1987; 328: 539-543

Fremont, D.H., Matsumura, M., Stura, E.A., Peterson, P.A. & Wilson, I.A.

Crystal structure of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2k^b.

Science 1992; 257: 919-927

Fujioka, H., Millet, P., Maeno, Y., Nakazawa, S., Ito, Y., Howard, R.J., Collins, W.E. & Aikawa, M.

A nonhuman primate model for human cerebral malaria: rhesus monkeys experimentally infected with *Plasmodium fragile*.

Exp. Parasitol. 1994; 78: 371-376

Furchner, M., Erickson, A.L., Allen, T., Watkins, D.I., Sette, A., Johnson, P.R. & Walker, C.M.

The simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein contains two epitopes presented by the Mamu-A*01 class I molecule.

J. Virol. 1999; 73: 8035-8039

Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., White, G., Foster, P. & Markham, P.D.

Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patient with AIDS.

Science 1984; 224: 500-503

Garboczi, D.N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q.R., Biddison, W.E. & Wiley, D.C.

Structure of the complex between human T cell receptor, viral peptide and HLA-A2

Nature 1996; 384: 134-141

Garver, J.J., Estop, A.M., Meera Khan, P., Balner, H. & Pearson, P.L.

Evidence of similar organization of the chromosomes carrying the major histocompatibility complex in man and other primates.

Cytogenet. Cell. Genet. 1980; 27: 238-245

Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanler, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A. & Sanyon, A.

Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency.

N. Engl. J. Med. 1981; 305: 1426-1431

Gundlach, B.R., Linhart, H., Dittmer, U., Reiprich, S., Fuchs, D., Fleckenstein, B., Hunsmann, G., Stahl.Hennig, C. & Überla, K.

Construction, replication, and immunogenic properties of a simian immunodeficiency virus expressing interleukin-2.

J. Virol. 1997; 71: 2225-2232

Hartley, J.L. & Gregori, T.J.

Cloning multiple copies of a DNA segment.

Gene 1981; 13: 347-353

Hill, A.V., Allsopp, C.E., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Twumasi, P., Rowe, P.A., Bennett, S., Brewster, D., McMichael, A.J. & Greenwood, B.M.

The immunogenetics of human infectious diseases.

Annu. Rev. Immunol. 1998; 16: 593-617

Hirai, M., Takahashi, E., Ishida, T. & Hori, T.

Chromosomal localization of the major histocompatibility complex (MHC) in the rhesus monkey and chimpanzee by fluorescence in situ hybridization.

Cytogenet. Cell Genet. 1991; 57: 204-205

Horton, H., Rehrauer, W., Meek, E.C., Shultz, M.A., Piekarczyk, M.S., Jing, P., Carter, D.K., Steffen, S.R., Calore, B., Urvater, J.A., Vogel, T.U., Wilson, N.A. & Watkins, D.I.

A common rhesus macaque MHC class I molecule which binds a cytotoxic T-lymphocyte epitope in Nef of simina immunodeficiency virus.

Immunogenetics 2001, 53: 423-426

Hulskotte, E.G., Geritti, A.M. & Osterhaus, A.D.

Towards an HIV-1 vaccine: lessons from studies in macaque model.

Vaccine 1998; 16: 904-915

Hunt, D.F., Michel, H., Dickinson, T.A., Shabanowitz, J., Cox, A.L., Sakaguchi, K., Appella, E., Grey, H.M. & Sette, A.

Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-A^d

Science 1992; 256: 1817-1820

Jaeger, E.E., Bontrop, R.E. & Lanchbury, J.S.

Nucleotide sequences, polymorphism and gene deletion of T cell receptor beta-chain constant region of *Pan troglodytes* and *Macaca mulatta*.

J. Immunol. 1993; 151: 5301-5309

Jardetzky, T.S., Lane, W.S., Robinson, R.A., Madden, D.R. & Wiley, D.C.

Identification of self peptides bound to purified HLA-B27.

Nature 1991; 353: 326-329

Jeannet, M., Sztajzel, R., Carpentier, N., Hirschel, B. & Tiercy, J.M.

HLA antigens are risk factors for development of AIDS.

J. AIDS 1989; 2: 28-32

Jin, X., Bauer, D.E., Tuttleton, S.E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C.E., Safrit, J.T., Mittler, J., Weinberger, L., Kostrikis, L.G., Zhang, L., Perelson, A.S. & Ho, D.D.

Dramatic rise in plasma viremia after CD8⁺ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques.

J. Exp. Med. 1999; 189: 991-998

Johnson, R.P.

Macaque models for AIDS vaccine development

Curr Opin Immunol 1996; 8: 554-560

Kaslow, R.A., Duquesnoy, R., VanRaden, M., Kingsley, L., Marrari, M., Friedman, H., Su, S., Saah, A.J., Detels, R., Phair, J. & Rinaldo, C.

A1, Cw7, B8, DR3 HLA antigen combination associated with rapid decline of T helper lymphocytes in HIV-1 infection. A report from the Multicenter AIDS Cohort Study.

Lancet 1990; 335: 927-930

Kaslow, R.A., Carrington, M., Apple, R., Park, L., Munoz, A., Saah, A.J., Goedert, J.J., Winkler, C., O'Brien, S.J., Rinaldo, C., Detels, R., Blattner, W., Phair, J., Erlich, H. & Mann, D.L.

Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection.

Nat. Med. 1996; 2: 405-411

Khazand, M., Peiberg, C., Nagy, M. & Sauermann, U.

Mhc-DQ-DRB haplotype analysis in the rhesus macaque: evidence for a number of different haplotypes displaying a low allelic polymorphism.

Tissue Antigens 1999; 54: 615-624

Khoo, S.H., Pepper, L., Snowden, N., Hajeer, A.H., Vallely, P., Wilkins, E.G.L., Mandal, B.K. & William, E.R.O.

Tumor necrosis factor c2 microsatellite allele is associated with the rate of HIV disease progression.

AIDS 1997; 11: 423-428

King, N.W., Chalifous, L.V., Ringler, D.J., Wyand, M.S., Sehgal, P.K., Daniel, M.D., Letvin, N.L., Desrosiers, R.C., Blake, B.J. & Hunt, R.D.

Comparative biology of natural and experimental SIVmac infection of macaque monkeys: a review.

J. Ned. Primatol. 1990; 19: 109-118

Klatzmann, D., Barre-Sinoussi, F., Nugeyre, M.T., Danquet, C., Vilmer, E., Griscelli, C., Brun-Veziret, F., Rouzioux, C., Gluckman, J.C., Chermann, J.C. & Montagnier, L.

Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes.

Science 1984; 225: 59-63

Knapp, L.A., Lehmann, E., Piekarczyk, M.S., Urvater, J.A. & Watkins, D.I.

A high frequency of Mamu-A*01 in the rhesus macaque detected by PCR-SSP and direct sequencing

Tissue Antigens 1997; 50: 657-661

Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C. & Ho, D.D.

Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome.

J. Virol. 1994; 68: 4650-4655

Kroner, B.L., Goedert, J.J., Blattner, W.A., Wilson, S.E., Carrington, M.N. & Mann, D.L.

Concordance of human leukocyte antigen haplotype sharing, CD4 decline and AIDS in hemophilic siblings.

Multicenter Hemophilia Cohort and Hemophilia Growth and Development Studies. AIDS 1995; 9: 275-280

Kuroda, M.C., Schmitz, J.E., Barouch, D.H., Craiu, A., Allen, T.M., Sette, A., Watkins, D.I., Forman, M.A. & Letvin, N.L.

Analysis of gag-specific cytotoxic T lymphocytes in SIVmac-infected rhesus monkeys by cell staining with a tetrameric MHC class I/peptide complex.

J. Exp. Med. 1998; 187: 1373-1381

Levinson, G, Hughes, A.L. & Letvin, N.L.

Sequence and diversity of rhesus monkey T-cell receptor B chain genes

Immunogenetics 1992; 35: 75-88

Levy, J.A.

The value of primate models for studying human immunodeficiency virus pathogens.

J. Med. Primatol. 1996; 25: 163-174

Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landies, J.A., Shimabukuro, J.M. & Oshiro, L.S.

Isolation of lymphocytopathic retrovirus from San Francisco patients with AIDS.

Science 1984; 225: 840-842

Lobashevsky, A.L. & Thomas, J.M.

Six Mamu-A locus alleles defined by a polymerase chain reaction sequence specific primer method.

Hum. immunol. 2000; 61: 1013-1020

Loveland, B., Wang, C.R., Yonekawa, H., Hermel, E. & Lindahl, K.F.

Maternally transmitted histocompatibility antigen of mice: a hydrophobic peptide of a mitochondrially encoded protein
Cell 1990; 60: 971-980

Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L. & Wiley, D.C.

The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation.
Nature 1991; 353: 321-325

Maniatis, T., Frisch, E.F. & Sambrook, J.

Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory
New York 1982

Marmur, J. & Doty, P.

Determination of the base composition of desoxyribonucleic acids from its thermal denaturation temperature.
J. Mol. Biol. 1962; 5: 109-118

Masur, H., Michaelis, M.A. & Greene, J.B.

An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia.
N. Engl. J. Med. 1981; 305: 1432-1438

McMichael, A.J. & O'Callaghan, C.A.

A new look at T cells.
J. Exp. Med. 1998; 187: 1367-1371

McNeil, A.J., Yap, P.L., Gore, S.M., Brettell, R.P., McColl, M., Wyld, R., Davidson, S., Weightman, R., Richardson, A.M. & Robertson, J.R.

Association of HLA types A1 B8 DR3 and B27 with rapid and slow progression in HIV disease.
Q. J. Med. 1996; 89: 177-185

Momburg, F., Roelse, J., Hämmerling, G.J. & Neefjes, J.J.

Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter.
J. Exp. Med. 1994; 179: 1613-1623

Mossman, S.P., Bex, F., Berglund, P., Arthos, J., O'Neil, S.P., Riley, D., Maul, D.H., Bruck, C., Momin, P., Burny, A., Fultz, P.N., Mullins, J.I., Liljestrom, P. & Hoover, E.A.

Protection against lethal simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14 disease by a recombinant Semliki Forest virus gp160 vaccine and by a gp120 subunit vaccine.
J. Virol. 1996; 70: 1953-1960

Myers, R.M., Fischer, S.G., Lerman, L.S. & Maniatis, T.

Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis.
Nucleic Acids Res. 1985; 13: 3131-3145

Nath, B.M., Schumann, K.E. & Boyer, J.D.

The chimpanzee and other non-human-primate models in HIV-1 vaccine research
Trends Microbiol 2000; 8: 426-431

Nelson, G.W., Kaslow, R. & Mann, D.L.

Frequency of HLA allele-specific peptide motifs in HIV-1 proteins correlates with the allele's association with relative rates of disease progression after HIV-1 infection.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94: 9802-9807

Newcomb, J.R. & Cresswell, P.

Characterization of endogenous peptides bound to purified HLA-DR molecules and their absence from invariant chain-associated $\alpha\beta$ dimers
J. Immunol. 1992; 150: 499-507

Novembre, F.J., Saucier, M., Anderson, D.C., Klumpp, S.A., O'Neil, S.P., Brown, C.R. 2nd, Hart, C.E., Guenthner, P.C., Swenson, R.B. & McClure, H.M.

Development of AIDS in a chimpanzee infected with human immunodeficiency virus type 1.
J. Virol. 1997; 71: 4086-4091

Ogg, G.S., Jin, X., Bonhoeffer, P., Dunbar, P.R., Nowak, M.A., Segal, J.P., Cao, Y., Rowland-Jones, S., Cerundolo, V., Hurley, A., Markowitz, M., Ho, D.D., Nixon, D.F. & McMichael, A.J.

Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T-lymphocytes and plasma load of viral RNA.
Science 1998; 279: 2103-2106

Okada, K., Boss, J.M., Prentice, H., Spies, T., Mengler, R., Auffray, C., Lillie, J., Grossberger, D., Strominger, J.L.

Gene organization of DC and DX subregions of the human major histocompatibility complex.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1985; 82: 3410-3414

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. & Sekiya, T.

Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86: 2766-2770

Otting, N. & Bontrop, R.E.

Characterization of the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) equivalent of HLA-F.
Immunogenetics 1993; 38: 141- 145

Piot, P., Bartos, M., Ghys, P.D., Walker, N. & Schwartländer, B.

The global impact of HIV/AIDS
Nature 2001; 410: 968-973

Rammensee, H.-G., Friede, T. & Stefanovic, S.

MHC ligands and peptide motifs: first listing
Immunogenetics 1995; 41: 178-228

Rausch, D.M., Murray, E.A. & Eiden, L.E.

The SIV-infested rhesus monkey model for HIV-associated dementia and implications for neurological diseases.

J. Leukocyte Biol. 1999; 65: 466-474

Robinson, S., Charini, W.A., Newberg, M.H., Kuroda, M.J., Lord, C.I. & Letvin, N.L.

A commonly recognized simian immunodeficiency virus Nef epitope presented to cytotoxic T lymphocytes of indian-origin rhesus monkeys by the prevalent major histocompatibility complex class I allele Mamu-A*02.

J. Virology 2001; 75: 10179-10186

Rötzschke, O., Falk, K., Deres, K., Schild, H., Norda, M., Metzger, J., Jung, G. & Rammensee, H.-G.

Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells.

Nature 1990; 348: 252-254

Rojo, S., García, F., Villadangos, J.A. & Castro, J.A.L.

Changes in the repertoire of peptides bound to HLA-B27 subtypes and to site-specific mutants inside and outside pocket B.

J. Exp. Med. 1993; 177: 613-620

Rose, L.M., Richards, T. & Alvord, E.C. Jr.

Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in nonhuman primates: a model of multiple sclerosis.

Lab. Animal Sci. 1994; 44: 508-512

Rowland-Jones, S.L., Dong, T., Fowke, K.R., Kimani, J., Krausa, P., Newell, H., Blanchard, T., Ariyoshi, K., Oyugi, J., Ngugi, E., Bwayo, J., MacDonald, K.S., McMichael, A.J. & Plummer, F.A.

Cytotoxic T cell response to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi.

J. Clin. Invest. 1998; 102: 1758-1765

Rudensky, A.Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S., Barlow, A. & Janeway, Jr. C.A.

Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules

Nature 1991; 353: 622-627

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.

Molecular cloning: A laboratory manual.

Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1989

Saper, M.A., Björkman, P.J. & Wiley, D.C.

Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2,6 Å resolution

J Mol Biol 1991; 219: 277-319

Sauermann, U.

DQ-haplotype analysis in rhesus macaques: implications for the evolution of these genes

Tissue Antigens 1998; 52: 550-557

Sauermann, U., Stahl-Hennig, C., Stolte, N., Mühl, T., Krawczak, M., Spring, M., Fuchs, D., Kaup, F.J., Hunsmann, G. & Sopper, S.

Homozygosity for a conserved MHC class II DQ-DRB haplotype is associated with rapid disease progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques: results from a prospective study.

J Inf Disease 2000; 182: 716-24

Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Santra, S., Sasseville, V.G., Simon, M.A., Lifton, M.A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B.J., Ghrayeb, J., Forman, M.A., Montefiori, D.C., Rieber, E.P., Letvin, N.L. & Reimann, K.A.

Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes.

Science 1999; 283: 857-860

Sealy, P.G. & Southern, E.M.

Gel electrophoresis of DNA. In: Gel electrophoresis of nucleic acids. A practical approach.

D. Rickwood, B.D. Hames (Hrsg), 39-80, IRL, Oxford

Seth, A., Ourmanov, I., Kuroda, M.J., Schmitz, J.E., Carroll, M.W., Wyatt, L.S., Moss, B., Forman, M.A., Hirsch, V.M. & Letvin, N.L.

Recombinant modified vaccinia virus Ankara-simian immunodeficiency virus gag pol elicits cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys detected by a major histocompatibility complex class I/peptide tetramer.

Proc. Natl. Acad. Sci., 1998; 95: 10112-10116

Shepherd, J.C., Schumacher, T.N.M., Ashton-Rickardt, P.D., Imaeda, S., Ploegh, H.L., Janeway, C.A. & Tonegawa, S.

TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective.

Cell 1993; 74: 577-584

Sidney, J., Dzuris, J.L., Newman, M.J., Johnson, R.P., Amitinder, K., Walker, C.M., Appella, E., Mothe, B., Watkins, D.I. & Sette, A.

Definition of the Mamu-A*01 peptide binding specificity: application to the identification of wild-type and optimized ligands from simian immunodeficiency virus regulatory proteins.

J. Immunol. 2000; 165: 6387-6399

Spring, M., Stahl-Hennig, C., Nisslein, T., Locher, C., Fuchs, D., Bodemer, W., Hunsmann, G. & Dittmer, U.

Suppression of viral replication in a long-term nonprogressing rhesus macaque experimentally infected with pathogenic simian immunodeficiency virus (SIV).

Clin. Immunol. and Immunopathol. 1998; 87: 101-105

Slierendregt, B.L., van Noort, J.T., Bakas, R.M., Otting, N., Jonker, M. & Bontrop, R.E.

Evolutionary stability of transspecies major histocompatibility complex class II DRB lineages in humans and rhesus monkeys.

Hum. Immunol. 1992; 35: 29-39

Slierendregt, B.L., Otting, N., Jonker, M. & Bontrop, R.E.

Gel electrophoresis analysis of rhesus macaque major histocompatibility complex class II DR molecules.

Hum. Immunol. 1994; 40: 33-40

Soudeyns, H., Paolucci, S., Chappey, C., Daucher, M.B., Graziosi, C., Vaccarezza, M., Cohen, O.J., Fauci, A.S. & Pantaleo, G.

Selective pressure exerted by immunodominant HIV 1-specific cytotoxic T lymphocytes responses during primary infection drives genetic variation restricted to the cognate epitope. Eur. J. Immunol. 1999; 29: 3629-3635

Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L. & Wiley, D.C.

Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide
Nature 1994; 368: 215-221

Tsarev, S.A., Tsareva, T.S., Emerson, S.U., Govindarajan, S., Shapiro, M., Gerin, J.L. & Purcell, R.H.

Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterolous challenge.
Vaccine 1997; 15: 1834-1838

Urvater, J.A., McAdam, S.N., Loehrke, J.H., Allen, T.A., Moran, J.L., Rowell, T.J., Rojo, S., López de Castro, J.A., Taurog, J.D. & Watkins, D.I.

A high incidence of Shigella-induced arthritis in a primate species: major histocompatibility complex class I molecules associated with resistance and susceptibility, and their relationship to HLA-B27.
Immunogenetics 2000; 51: 314-325

Voss, G. & Letvin, N.L.

Definition of human immunodeficiency virus type 1 gp120 and gp41 cytotoxic T-lymphocyte epitopes and their restricting major histocompatibility complex class I alleles in simian-human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys.
J. Virol 1996; 70: 7335-7340

Walker, C.M., Moody, D.P. & Levy, J.A.

CD8⁺ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication.
Science 1986; 234: 1563-1566

Watkins, D.I.

MHC of nonhuman primates.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1994; 188: 145-159

Watkins, D.I.

The evolution of major histocompatibility class I genes in primates
Crit. Rev. Immunol. 1995; 15: 1-29

Wu, Y., Hayes, V.M., Osinga, J., Mulder, I.M., Looman, W.G., Buys, C.H.C.M. & Hofstra, R.M.W.

Improvement of fragment and primer selection for mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis.
Nucl. Acids Res. 1998; 26: 5432-5440

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (engl. acquired immunodeficiency syndrom)
APC	antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
β_2m	β_2 -Mikroglobulin
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation
cDNA	copy DNA
Ci (μ Ci)	Curie (Mikrocurie)
cm	Zentimeter
CPRC	Caribbean Primate Research Center
CTL	zytotoxische T-Zellen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGGE	denaturierenden Gradientengelelektrophorese
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
H ₂ O-DEPC	doppelt destilliertes Wasser mit Diethylpyrocarbonat behandelt
HLA	humaner MHC (human leukocyte antigen)
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <u>d</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
Eq./ml	RNA-Äquivalente pro Milliliter
EtOH	Ethanol
g (mg, μ g, ng)	Gramm (Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm)
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
kDa	Kilodalton
LABS	Laboratory Animal Breeder and Services of Virginia
LTNP	Langzeitüberlebender (long-term nonprogressor)
m (nm)	Meter (Nanometer)

M (mM, μ M)	molar (millimolar, mikromolar)
mA	Milliampere
Mamu	Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>)
Mb	Megabasen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex)
min	Minute
MW	Molekulargewicht
OD	optische Dichte
PBL	periphere Blutlymphozyten
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PCR-SSP	PCR mit sequenzspezifischen Primern
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionenkonzentration in Wasser
PP	Probenpuffer
RNS / RNA	Ribonukleinsäure / ribonucleic acid
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SIV	Affenimmundefizienzvirus (engl.: simian immunodeficiency virus)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAE _{mod.}	modifizierter TAE-Puffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
wpi	Wochen nach der Infektion (weeks post infection)

Aminosäuren

Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Asparaginsäure	D
Cystein	C
Glutamin	Q
Glutaminsäure	E
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

8. Anhang

Herrn Prof. N. Koch danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.

Herrn Prof. G. Hunsmann danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten innerhalb der Abteilung Virologie und Immunologie und für die Betreuung meiner Dissertation am Deutschen Primatenzentrum.

Herrn Prof. K.-H. Scheidtmann danke ich für die Übernahme des Koreferats dieser Dissertation und Herrn Prof. W. Böhme für die Übernahme der Nebenfachprüfung.

Herrn Prof. M. Krawczak möchte ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung des Datenmaterials danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ulrike Sauer mann die das Thema dieser Arbeit gestellt hat und unter deren direkter Betreuung diese Arbeit entstand.

Herzlichen Dank an alle Mitarbeiter der Abteilung Virologie und Immunologie und der Arbeitsgruppe Primatengenetik für die kollegiale Unterstützung sowie die freundschaftliche Atmosphäre.

Für die Finanzierung dieser Arbeit möchte ich mich bei der Gesellschaft für AIDS-Forschung e.V. recht herzlich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich in jeder erdenklichen Form unterstützt haben und auf deren Hilfe und Zuneigung ich jederzeit zählen kann.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Thorsten Mühl
Anschrift: Marienburger Weg 2
37130 Gleichen-Reinhausen
Geburtsdatum: 7. März 1968
Geburtsort: Bergneustadt
Familienstand: ledig

Ausbildungsdaten

8/74 – 6/78 Gemeinschaftsgrundschule,
Gummersbach-Steinenbrück

7/78 – 5/89 Städtisches Gymnasium Moltkestraße,
Gummersbach,
Abschluß: Abitur

9/89 – 9/92 Ausbildung bei der Kreisverwaltung des
Oberbergischen Kreises, Gummersbach

9/92 – 9/98 Studium der Biologie
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität,
Bonn, Thema der Diplomarbeit:
Antigenprozessierung und Beladung von
MHC Klasse II-Molekülen in verschiedenen
APC
Abschluß: Diplom-Biologe

1/99 – 4/02 Promotionsstudium an der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Dissertationsarbeit am Deutschen
Primatenzentrum, Göttingen
Thema: Charakterisierung von MHC Klasse I
Molekülen aus Rhesusaffen (*Macaca mulatta*)

