

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und
Onkologie)

**Identifikation spenderindividueller MICA-Varianten und ihr
Bindungsverhalten an invariante V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptoren
in computergestützter Bindungssimulation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Heister, David Josef

2020

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Schilbach-Stückle

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Klein

Tag der Disputation: 16.01.2020

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	6
II.	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	8
1	Einleitung	15
1.1	Das native und adaptive Immunsystem	15
1.2	T-Lymphozyten und MHC-Klassen	16
1.3	T-Zell-Rezeptor-Generierung durch somatische DNA-Rekombination...	19
1.4	Complementary-determining region (CDR)	20
1.5	$\alpha\beta$ -TCR tragende Lymphozyten	21
1.6	$\gamma\delta$ -TCR tragende Lymphozyten	22
1.6.1	Entwicklung und Diversität des $\gamma\delta$ -TCR	22
1.6.2	Aufbau und Vorkommen der $\gamma\delta$ -TCRs	24
1.6.3	Antigenerkennung von $\gamma\delta$ -TCRs	25
1.6.4	Funktionen und Aufgaben von $\gamma\delta$ -TCR tragenden Lymphozyten	27
1.6.5	Die Rolle von $\gamma\delta$ -TCR tragenden-Lymphozyten bei Knochenmarkstransplantation (BMT) bzw. Stammzelltransplantationen (HSCT) und Transplantatabstoßungen (GvHD)	29
1.7	Das MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) und MHC class I polypeptide-related sequence B (MICB)	30
1.7.1	Aufbau und Vorkommen von MICA	30
1.7.2	Funktion und Aufgaben von MICA	33
1.7.3	Der <i>mica</i> Polymorphismus	34
1.7.4	Der <i>micb</i> -Polymorphismus	35
1.7.5	Die Rolle von MICA bei Autoimmun- und Tumorerkrankungen ..	36
1.7.6	Die Rolle von MICA bei Graft-versus-Host Reaktion (GvHD)	37

Inhaltsverzeichnis

1.8	Fragestellung	38
2	Material und Methoden.....	41
2.1	Chemikalien und Reagenzien	41
2.2	Geräte	41
2.3	Verbrauchsmaterialien	42
2.4	Kits	43
2.5	Isolierung von PBMCs aus Vollblut gesunder menschlicher Spender	44
2.6	Dichtegradientenzentrifugation	44
2.7	Gewinnen von genomischer DNA	45
2.7.1	Messen des DNA Gehaltes.....	46
2.8	Polymerase-Kettenreaktion.....	46
2.8.1	Primer	47
2.8.2	Enzyme	49
2.9	Gelelektrophorese.....	49
2.9.1	DNA Längenstandard	49
2.9.2	Herstellung des Agarosegels	49
2.9.3	Kontrolle der PCR-Produkte	50
2.10	Probenvorbereitung.....	50
2.11	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	50
2.12	Sequenzier-PCR nach Sanger.....	50
2.13	Aufreinigung der Sequenzierprodukte.....	52
2.14	Auftragen der Proben in den Sequencer.....	52
2.15	Etablierung von <i>in silico</i> Modellen.....	53
2.15.1	T-Zell-Rezeptor	53
2.15.2	MICA.....	53
2.15.3	Zusammenführen von TCR und MICA in räumliche Nähe	54

2.15.4	Identifikation potenzieller Bindungsmöglichkeiten zwischen TCR und MICA anhand der räumlichen Nähe	54
2.16	Bindungssimulation von T-Zell-Rezeptor und MICA.....	55
2.17	Modellauswahlverfahren für detaillierte Auswertung der Bindungssimulation.....	55
2.18	Verwendete statistische Tests	57
2.18.1	Normalverteilungsprüfung.....	58
2.18.2	Prüfverfahren auf statistisch signifikante Unterschiede.....	59
2.19	Verwendete Computerprogramme und Datenbanken.....	59
3	Ergebnis.....	62
3.1	Identifikation von SNPs der genomischen DNA aller Probanden von MICA Exon 2 bis 6	62
3.1.1	<i>mica</i> Exon 2	62
3.1.2	<i>mica</i> Exon 3	66
3.1.3	<i>mica</i> Exon 4	68
3.1.4	<i>mica</i> Exon 5	70
3.1.5	<i>mica</i> Exon 6	72
3.1.6	Gesamtübersicht der Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 2-6.....	72
3.2	Identifikation von SNPs der genomischen DNA aller Probanden von <i>micb</i> Exon 2 bis 6	73
3.2.1	<i>micb</i> Exon 2	73
3.2.2	<i>micb</i> Exon 3	74
3.2.3	<i>micb</i> Exon 4	75
3.2.4	<i>micb</i> Exon 5	76
3.2.5	<i>micb</i> Exon 6	77

3.2.6	Gesamtübersicht der Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 2-6	78
3.3	Zuordnung des spenderindividuellen <i>mica</i> und <i>micb</i> Polymorphismus zu bereits bekannten Varianten	78
3.4	Identifikation interindividueller Gemeinsamkeiten und Unterschiede .	83
3.5	Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Proteins MICA der Probanden durch individuelle SNPs	83
3.6	<i>In silico</i> Modellierung von T-Zell-Rezeptor und Ligand(en)	86
3.6.1	Bindungsmöglichkeiten zwischen TCR und MICA im autologen und allogenen Setting	86
3.6.2	Bindungsmöglichkeiten zwischen MICA und TCR von Proband 01 und 07 im Vergleich	87
3.6.3	Bindungsmöglichkeiten zwischen MICA und TCR von Proband 02 und 05 im Vergleich	100
3.6.4	Simulation eines Energiemodells des TCR mit MICA im autologen Setting vor und nach Bindungssimulation	110
3.6.5	Simulation eines Energiemodells des TCR mit MICA im allogenen Setting vor und nach Bindungssimulation	111
3.6.6	Bestimmung von Unterschieden im Energieniveau im autologen versus allogenen Setting TCR-Liganden-Modell	111
3.6.7	Prüfung des I-sc auf Normalverteilung anhand der Berechnungsnummern	112
3.6.8	Prüfung des I-sc auf Normalverteilung anhand ausgewählter Kriterien zur Auswahl des statistischen Testverfahrens	115
3.6.9	Prüfung auf den statistischen Unterschied der Energieniveaus anhand von Berechnungsnummern	117
3.6.10	Prüfung auf den statistischen Unterschied der Energieniveaus der TCR MICA Bindungsmodelle anhand ausgewählter Kriterien	120
4	Diskussion	122

Inhaltsverzeichnis

5	Zusammenfassung.....	134
6	Anhang.....	136
7	Literaturverzeichnis	193
8	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	216
	Danksagung	217

Abkürzungsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
BCR	Engl. Abkürzung für <i>B-Zell-Rezeptor</i>
BMT	Engl. Abkürzung für <i>bone marrow transplantation</i>
bp	Basenpaare
CD	Engl. Abkürzung für <i>cluster of differentiation</i>
CDR	Engl. Abkürzung für <i>complementarity-determining region</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EBI	European Bioinformatics Institute
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EMBL-EBI	European Molecular Biology Laboratory - Bioinformatics Institute
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
gDNA	genomische DNA
GvHD	Engl. Abkürzung für <i>Graft-versus-Host Disease</i>
HLA	Engl. Abkürzung für <i>human leukocyte antigens</i>
HSCT	Engl. Abkürzung für <i>hematopoietic stem cell transplantation</i>
I_sc	Interface Score
Ig domain	Engl. Abkürzung für <i>Immunglobulin Domäne</i>
Ig-like	Engl. Abkürzung für <i>"Immunglobulin ähnlich"</i>
kb	Kilobasen
matchen	Bedeutung: <i>exakt übereinstimmen, gut zueinanderpassen</i>
MHC	Engl. Abkürzung für <i>major histocompatibility complex</i>
MICA	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i>
MICB	<i>MHC class I polypeptide-related sequence B</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mol	Stoffmenge (6,022*10 ²³ Teilchen)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Engl. Abkürzung für <i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
pmol	Größeneinheit für Stoffmenge: <i>Pikomol</i>
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde(n)
SNP	Engl. Abkürzung für <i>single nucleotide polymorphisms</i>
Taq-Polymerase	<i>DNA-Polymerase des Bakteriums Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCR	Engl. Abkürzung für <i>T-Zell-Rezeptor</i>

Abkürzungsverzeichnis

UV	<i>Ultraviolett</i>
VDW	<i>Van der Waals</i>

II. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1: Schematischer Aufbau eines $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors.....	21
Abb. 2: Schematische Darstellung der Loci für die γ - und δ -Kette beim humanen TCR.....	23
Abb. 3: Verlust des TCR δ -Locus bei Verbindung von V_{α} - und J_{α} -Gensegmenten.	24
Abb. 4: Darstellung der intramolekularen Organisation von Exons und Introns von <i>mica</i> , <i>micb</i> und <i>hla-a</i> im Vergleich.....	32
Abb. 5: Modellauswahl für die weitere Auswertung bei einer ungeraden Gesamtzahl von erzeugten Rezeptor-Liganden-Modellen.	57
Abb. 6: Modellauswahl für die weitere Auswertung bei einer geraden Gesamtzahl von erzeugten Rezeptor-Liganden-Modellen.....	57
Abb. 7: Grafische Darstellung des Chromatogramms von <i>mica</i> Exon 2 Position 54-58 des Probanden Nr. 01.	64
Abb. 8: Grafische Darstellung des Chromatogramms von MICA Exon 4 Position 249-253 des Probanden Nr. 02.	81
Abb. 9: Darstellung der Bindungen zwischen TCR (blau) und MICA (orange). 92	
Abb. 10: Exemplarisch dargestellte 3D-Modelle von MICA Variante *002 und dem T-Zell-Rezeptor des Probanden Nr. 01 in räumlicher Nähe im Vergleich.	110
Abb. 11: Grafische Darstellung aller I_{sc} -Werte von Berechnungsnummer 33569 (exemplarisch).....	114
Abb. 12: Grafische Darstellung aller I_{sc} -Werte von Berechnungsnummer 32522 (exemplarisch).....	115
Abb. 13: Kumulative, grafische Darstellung der I_{sc} -Werte von Proband 01 und 07 gegenübergestellt.....	119
Abb. 14: Kumulative, grafische Darstellung der I_{sc} -Werte von Proband 02 und 05 gegenübergestellt.....	120
Abb. 15: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 2 (Position 1-14).....	136
Abb. 16: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 2 (Position 15-28).....	137

Abb. 17: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 2 (Position 29-42).	138
Abb. 18: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 2 (Position 43-55).	139
Abb. 19: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 2 (Position 56-69).	140
Abb. 20: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 2 (Position 70-83).	141
Abb. 21: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 2 (Position 84-85).	142
Abb. 22: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 3 (Position 86-99).	143
Abb. 23: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 3 (Position 100-113).	144
Abb. 24: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 3 (Position 114-127).	145
Abb. 25: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 3 (Position 128-140).	146
Abb. 26: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 3 (Position 141-155).	147
Abb. 27: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 3 (Position 156-169).	148
Abb. 28: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 3 (Position 170-181).	149
Abb. 29: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 4 (Position 182-195).	150
Abb. 30: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 4 (Position 196-208).	151
Abb. 31: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 4 (Position 209-221).	152
Abb. 32: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 4 (Position 222-234).	153

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 33: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 4 (Position 235-247).	154
Abb. 34: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 4 (Position 248-260).	155
Abb. 35: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 4 (Position 261-274).	156
Abb. 36: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 5 (Position 275-288).	157
Abb. 37: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 5 (Position 289-296).	158
Abb. 38: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 5 (Position 297-309).	159
Abb. 39: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 5 (Position 310-318).	160
Abb. 40: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 6 (Position 320-333).	161
Abb. 41: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 6 (Position 334-346).	162
Abb. 42: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 6 (Position 347-359).	163
Abb. 43: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>mica</i> Exon 6 (Position 360-362).	164
Abb. 44: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 2 (Position 1-13).	165
Abb. 45: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 2 (Position 14-27).	166
Abb. 46: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 2 (Position 28-41).	167
Abb. 47: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 2 (Position 42-55).	168
Abb. 48: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 2 (Position 56-69).	169

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 49: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 2 (Position 70-83).	170
Abb. 50: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 2 (Position 84).	171
Abb. 51: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 3 (Position 85-99).	172
Abb. 52: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 3 (Position 100-113).	173
Abb. 53: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 3 (Position 114-127).	174
Abb. 54: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 3 (Position 128-141).	175
Abb. 55: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 3 (Position 142-155).	176
Abb. 56: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 3 (Position 156-169).	177
Abb. 57: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 3 (Position 170-181).	178
Abb. 58: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 4 (Position 182-195).	179
Abb. 59: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 4 (Position 196-209).	180
Abb. 60: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 4 (Position 210-223).	181
Abb. 61: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 4 (Position 224-237).	182
Abb. 62: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 4 (Position 238-251).	183
Abb. 63: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 4 (Position 252-265).	184
Abb. 64: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 4 (Position 266-274).	185

Abb. 65: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 5 (Position 275-288).	186
Abb. 66: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 5 (Position 289-302).	187
Abb. 67: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 5 (Position 303-316).	188
Abb. 68: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 5 (Position 317-318).	189
Abb. 69: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 6 (Position 319-332).	190
Abb. 70: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 6 (Position 333-346).	191
Abb. 71: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von <i>micb</i> Exon 6 (Position 347-361).	192

Tab. 1: Übersichtsdarstellung bisher bekannter, aktivierender Liganden für $\gamma\delta$ T-Lymphozyten in der Maus und im Menschen.	26
Tab. 2: Liste der verwendeten Primer.	47
Tab. 3: Programmübersicht des Thermocyclers für die PCR.	52
Tab. 4: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von <i>mica</i> Exon 2.	65
Tab. 5: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von <i>mica</i> Exon 3.	67
Tab. 6: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von <i>mica</i> Exon 4.	69
Tab. 7: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von <i>mica</i> Exon 5.	71
Tab. 8: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von <i>mica</i> Exon 6.	72
Tab. 9: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von <i>micb</i> Exon 2.	74
Tab. 10: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von <i>micb</i> Exon 3.	75
Tab. 11: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von <i>micb</i> Exon 4.	76
Tab. 12: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von <i>micb</i> Exon 5.	77
Tab. 13: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von <i>micb</i> Exon 6.	77
Tab. 14: Zuordnung der individuellen MICA Varianten.	82
Tab. 15: Zuordnung der individuellen MICB Varianten.	82
Tab. 16: Gegenüberstellung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Aminosäuren an SNP-Positionen.	85
Tab. 17: Bindungsmöglichkeiten von Proband 01 zwischen MICA Variante *002-01 und T-Zell-Rezeptor (TCR).	90
Tab. 18: Bindungsmöglichkeiten von Proband 01 zwischen MICA Variante *012 und T-Zell-Rezeptor (TCR).	93

Tab. 19: Bindungsmöglichkeiten von Proband 07 zwischen MICA Variante *009 bzw. *018 und T-Zell-Rezeptor (TCR).	94
Tab. 20: Summe der Bindungen von MICA mit TCR aller Modelle des jeweiligen Probanden (Nr. 01 und 07).	95
Tab. 21: Anzahl der Bindungen zwischen MICA / V δ 1-TCRs gezeigt nach CDR(-Region) und non-CDR(-Region) von Proband 01 und 07.	96
Tab. 22: Detaillierte Auflistung der Bindungsanzahl zwischen MICA / V δ 1-TCRs anhand des individuellen Berechnungsmodells 33569.	97
Tab. 23: Detaillierte Auflistung der Bindungsanzahl zwischen MICA / V δ 1-TCRs anhand des individuellen Berechnungsmodells 33570.	98
Tab. 24: Detaillierte Auflistung der Bindungsanzahl zwischen MICA / V δ 1-TCRs anhand des individuellen Berechnungsmodells 32522.	99
Tab. 25: Detaillierte Auflistung der Bindungsanzahl zwischen MICA / V δ 1-TCRs anhand des individuellen Berechnungsmodells 32523.	100
Tab. 26: Bindungsmöglichkeiten von Proband 02 und 05 zwischen MICA Variante *008, *017 bzw. *045 und T-Zell-Rezeptor (TCR).	102
Tab. 27: Summe der Bindungen von MICA mit TCR aller Modelle des jeweiligen Probanden (Nr. 02 und 05).	104
Tab. 28: Anzahl der Bindungen zwischen MICA / V δ 1-TCRs gezeigt nach CDR(-Region) und non-CDR(-Region) von Proband 02 und 05.	105
Tab. 29: Detaillierte Auflistung der Bindungsanzahl zwischen MICA / V δ 1-TCRs anhand des individuellen Berechnungsmodells 33528.	106
Tab. 30: Detaillierte Auflistung der Bindungsanzahl zwischen MICA / V δ 1-TCRs anhand des individuellen Berechnungsmodells 39519.	107
Tab. 31: Detaillierte Auflistung der Bindungsanzahl zwischen MICA / V δ 1-TCRs anhand des individuellen Berechnungsmodells 33571.	108
Tab. 32: Übersichtstabelle statistisch erhobener Werte bezogen auf die Berechnungsnummern (B-Nr.).	113
Tab. 33: Tabellarische Darstellung der Auswahlkriterien für die Prüfung auf Normalverteilung der Energieniveaus.	117
Tab. 34: Tabellarische Darstellung der Auswahlkriterien für die Prüfung auf Unterschiede statistischer Signifikanz im Energieniveau.	121

1 Einleitung

1.1 Das native und adaptive Immunsystem

Der menschliche Organismus ist mit der Geburt einer Vielzahl von pathogenen Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten ausgesetzt. Im Mutterleib, durch die abgeschlossene Fruchtblase geschützt, muss mit der postpartalen Zeitrechnung beim Säugling ein funktionierendes Immunsystem existieren, welches den Menschen vor äußeren Einflüssen schützt, da nicht mehr direkt auf das ausgereifte Immunsystem der Mutter zurückgegriffen werden kann. Dabei wird zwischen Pathogenen und Kommensalen differenziert, denn nicht alle Mikroorganismen schaden dem Menschen. So sind insbesondere die Haut, die Mundschleimhaut, die Konjunktiven und der Gastrointestinaltrakt permanent von Mikroorganismen besiedelt, die in Symbiose mit dem menschlichen Organismus zusammenleben und als Mikrobiome bezeichnet werden. Das menschliche Immunsystem muss in diesem Zusammenhang verschiedene Aufgaben wahrnehmen. Es muss Pathogene erkennen, sie bekämpfen bzw. eliminieren, mögliche Rückstände beseitigen und ein immunologisches Gedächtnis bilden, während gleichzeitig eine Toleranz gegenüber den Kommensalen und den eigenen Zellen gewahrt bleiben muss, um Autoimmunreaktionen zu vermeiden. Das menschliche Immunsystem kann grob in zwei verschiedene Bereiche unterteilt werden. Das angeborene (native) Immunsystem und das erworbene (adaptive) Immunsystem. Beide Teile sind essenziell, um verschiedenste Pathogene abzuwehren und eine ausreichende Immunantwort zu gewährleisten, damit die Homöostase des menschlichen Organismus nicht dauerhaft in sich zusammenbricht. Das angeborene Immunsystem hat die Besonderheit direkt auf Pathogene reagieren zu können. Dies geschieht in der Regel unmittelbar nach Kontakt mit den Pathogenen. Gleichzeitig ist es selbst eine wichtige Komponente, um den extrem effektiven und zielgerichteten zweiten Weg der Immunantwort, die adaptive Immunabwehr, in Gang zu bringen. Hierzu zählen die Lymphozyten, welche sich in B- und T-Lymphozyten aufteilen. Diese sorgen für eine gezielte Immunabwehr, brauchen jedoch im Vergleich mit dem angeborenen Immunsystem, Tage bis Wochen, um aktiv in das Geschehen eingreifen zu können (Murphy and Weaver, 2017).

Die B-Lymphozyten besitzen einen Antigen Rezeptor (BCR), welcher den Antikörpern im Aufbau stark ähnelt. Aufgabe der B-Lymphozyten ist es nach ihrer Aktivierung Antikörper zu bilden, welche für eine gezielte Immunabwehr benötigt werden. Nach der Aktivierung der B-Zelle proliferiert sie und bildet eine Plasmazelle aus. Einige Plasmazellen differenzieren zu Gedächtniszellen aus, welche im Falle einer neuen Infektion mit demselben Pathogen eine schnellere, gezielte Immunabwehr gewährleisten (Murphy and Weaver, 2017).

Die T-Lymphozyten werden in die Klassen der zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen unterteilt:

Zytotoxische T-Zellen eliminieren andere, in der Regel körpereigene Zellen, welche mit Pathogenen, wie z.B. Viren infiziert sind. T-Helferzellen unterstützen das Immunsystem bei einer gezielten Antwort. So können Sie in Form von Zytokinausschüttung andere Immunzellen aktivieren und so unter anderem die Antikörperproduktion der B-Lymphozyten ankurbeln, bzw. Makrophagen in der Elimination von Pathogenen unterstützen. Regulatorische T-Zellen haben die Aufgabe die Immunantwort im Körper zu regulieren, um so eine überaktivierte Immunantwort zu verhindern, damit es nicht zu größeren Schäden an den körpereigenen Zellen im Rahmen der Pathogenabwehr kommt (Murphy and Weaver, 2017).

1.2 T-Lymphozyten und MHC-Klassen

T-Lymphozyten besitzen einen T-Zell-Rezeptor (TCR). Dieser auf der Zelloberfläche befindliche Rezeptor besteht aus zwei verschiedenen Ketten und diese Ketten wiederum aus zwei verschiedenen Regionen.

Bei den Ketten unterscheidet man die α -, β -, γ - und δ -Kette. Diese Ketten charakterisieren die T-Lymphozyten in Ihrer Funktion. Jede dieser Ketten besteht aus einer konstanten Region (Fc-Region) und einer variablen Region, welche die Antigenbindungsstelle darstellt. Die variable Region kann im Gegensatz zur Fc-Region aus einer unvorstellbar großen Kombination aus Aminosäuresequenzen bestehen, um so eine große Heterogenität zu gewährleisten, damit möglichst viele verschiedene Antigene von T-Zellen gebunden und erkannt werden können.

Erst die Kombination der beiden TCR-Ketten bildet eine Bindungsstelle. Die Besonderheit im Vergleich zu B-Lymphozyten liegt darin, dass T-Lymphozyten mit ihrem TCR kein Antigen direkt binden können. Es können nur kurze Peptidfragmente erkannt werden, welche über Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex (MHC)) Moleküle an der Zelloberfläche einer menschlichen Körperzelle präsentiert werden. Humane MHC-Gene werden in drei verschiedene Klassen eingeteilt (MHC Klasse I-III). Dabei wird im Menschen oft anstatt der Begriff MHC, die Bezeichnung human leukocyte antigens (HLA) verwendet. In der MHC Klasse I wird zwischen drei MHC Klasse-I α -Ketten Genen (HLA-A, -B und -C), in der MHC Klasse-II α - und β -Ketten-Gen-Paare (HLA-DR, -DP und -DQ) differenziert (Horton *et al.*, 2004; Murphy and Weaver, 2017).

Die membranständigen MHC-I-Moleküle bestehen aus einer α -Kette mit drei Domänen und einem nicht kovalent gebundenen β_2 -Mikroglobulin, wohingegen MHC-II-Moleküle aus einer α - und β -Kette mit jeweils zwei Domänen bestehen. Sowohl MHC-I- als auch MHC-II-Moleküle erzeugen durch Ihren biochemischen Aufbau eine Furche, in der Peptide gebunden werden können, welche dann wiederum von T-Lymphozyten erkannt werden (Huang and Moody, 2016; Murphy and Weaver, 2017).

MHC-Klasse-I-Moleküle werden im Körper in unterschiedlicher Ausprägung auf allen körperlichen Zellen exprimiert. Eine Ausnahme stellen die Erythrozyten dar. Hier wird MHC-I nur schwach oder gar nicht exprimiert. Dies hat allerdings z.B. für eine Virusinfektion keine Auswirkung, da Erythrozyten kernlos sind und dadurch nicht als Replikationsort für Viren dienen können (Murphy and Weaver, 2017).

MHC-Klasse-II-Moleküle werden nur auf Zellen des Immunsystems exprimiert. Dazu zählen dendritische Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen. Durch die Bindung des TCR an ein über MHC präsentiertes Peptid kommt es zur Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade und daraus resultierend zur gesamten Aktivierung der T-Zelle. Dabei erkennt der TCR sowohl das am MHC Molekül gebundene Peptid, wie auch das MHC Molekül, an welches dieses gebunden ist (Chothia, Boswell and Lesk, 1988; Murphy and Weaver, 2017).

Auch hier ist zu erwähnen, dass der TCR spezifisch für sein jeweiliges Peptid und dem dazugehörigen MHC Molekül ist (MHC Restriktion). MHC Moleküle weisen einen hohen Grad an Polymorphie auf (Murphy and Weaver, 2017).

Jeder Mensch exprimiert mindestens 6 MHC-Moleküle (mindestens 3 verschiedene MHC-Klasse-I- und 3 bis 4 MHC-Klasse-II-Moleküle). Aufgrund des hohen Grades an Polymorphismen auf dem Genlocus für MHC-Moleküle ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, dass auf beiden homologen Chromosomen das gleiche Allel vorhanden ist. Dies führt dazu, dass die menschliche Bevölkerung fast ausschließlich heterozygot für die Gene der MHC-Klasse-I- und II-Moleküle sind und definiert das Repertoire an Peptiden, welche über diese Moleküle präsentiert werden können (Murphy and Weaver, 2017).

Die Bildung von T-Zellprogenitorzellen findet im Knochenmark aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen statt. Von dort aus migrieren die Zellen in den Thymus und werden dort einer Selektion unterzogen. In diesem Stadium werden die T-Zellen noch als doppelt negativ bezeichnet, da sie noch keine Co-Rezeptoren CD4 oder CD8 exprimieren (Murphy and Weaver, 2017; Wagner, 2007).

Im Thymus angelangt, werden die reifenden T-Lymphozyten auf das Erkennen von eigenen MHC-Molekülen getestet. Nur die Zellen, die körpereigene MHC Moleküle erkennen, erhalten ein Überlebenssignal (positive Selektion). Bindet der TCR nicht, wird bei diesem die Apoptose eingeleitet. T-Lymphozyten mit TCRs, die körpereigene Peptide zu stark binden, werden ebenfalls der Apoptose zugeführt (negative Selektion), um autoreaktive Prozesse zu vermeiden (Wagner, 2007). Nach der T-Zellreifung im Thymus zirkulieren die naiven T-Lymphozyten in den lymphatischen Geweben des menschlichen Organismus (Murphy and Weaver, 2017).

Grundsätzlich werden MHC-Klasse-I-Moleküle von CD8⁺ (zytotoxischen) T-Lymphozyten erkannt und MHC-Klasse-II-Moleküle von CD4⁺ T-(Helfer)-Zellen. Diese dienen bei der Bindung als Co-Rezeptoren, welche für die Aktivierung der jeweiligen T-Zellen benötigt werden. CD4 besteht aus einem Protein, welches nur eine einzige Kette mit vier immunglobulinähnlichen (Engl. Abkürzung.: Ig-like)

Domänen aufweist. Dem gegenüber gestellt besteht CD8 aus zwei Ketten (α und β), welche jeweils eine einzelne Ig-like Domäne aufweisen, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Murphy and Weaver, 2017).

1.3 T-Zell-Rezeptor-Generierung durch somatische DNA-Rekombination

Um eine möglichst große Anzahl verschiedener T-Zell-Rezeptoren zu generieren bedarf es einer Technik, die aus vorhandenen „Bausteinen“ neue T-Zell-Rezeptoren generiert, da eine separate Kodierung jedes möglichen Antigenrezeptors (theoretisch ca. 10^{18} unterschiedliche T-Zell-Rezeptoren, in Wirklichkeit einige Potenzen weniger) die Länge des gesamten Genoms (ca. $3 \cdot 10^9$ Nukleotide) bei weitem übersteigen würde. Aus diesem Grund hat die Natur das „gene rearrangement“ entwickelt. Es existieren proteincodierende Genabschnitte für zwei Hauptregionen: Einen für die variable (V) Region des TCR und einen für die konstante (C) Region. Zusätzlich gibt es die D-Region, die weitere Diversität der β und δ -Ketten ermöglicht (Murphy and Weaver, 2017).

Der variable Teil der Rezeptorkette ist wiederum in verschiedene Genbereiche aufgeteilt. Man unterscheidet ein V-Gensegment („variable“, α - oder β -Kette), mit dem mehrere J- („joining“, α - und β -Kette) und D- („diversity“, nur β -Kette) Gensegmente kombiniert werden können. Das „rearrangement“ (Neukombination) erfolgt nicht einfach durch Bruch der Gene an Sollbruchstellen und nachfolgender Verknüpfung, sondern durch Bruch innerhalb einer relativ breiten Genregion und Neuverknüpfung nach Einfügen einer zufälligen Anzahl zufällig gewählter DNA Bausteine (Nukleotide). Die entstehenden Abschnitte sind daher nicht keimbahncodiert, sondern für jede Zelle einzigartig. Der T-Zell-Rezeptor-alpha- (TRA) Ketten Locus liegt auf Chromosom 14 und beherbergt ca. 70-80 V-, sowie 61 J-Segmente, allerdings keine D-Segmente. Der TRB (T-Zell-Rezeptor-beta Ketten) Locus sitzt auf Chromosom 7 und besteht aus 52 V-, 13 J- und 2 D-Segmente. Aus diesen Zahlen ergibt sich rein rechnerisch eine Gesamtzahl von ca. 10^{18} verschiedenen Möglichkeiten der $\alpha\beta$ -TCR-Kombination (Murphy and Weaver, 2017).

Rekombinationssignalsequenzen (recombination signal sequences, RSS) liegen auf konservierten, nicht-codierenden Genabschnitten und können dort von den Rekombinationsaktivierungsgenen 1 und 2 (recombination-activating gene, RAG) codierten Enzymen erkannt werden. Diese erzeugen dann einen Bruch innerhalb der codierenden DNA-Sequenz und sorgen dadurch für eine Möglichkeit der Umlagerung von V(D)J-Gensegmenten. Die dabei entstehenden DNA-Ringstrukturen werden auch als T-Zell-Rezeptor-Exzisionsringe (T-cell receptor excision circles, TRECs) bezeichnet (Murphy and Weaver, 2017; Schatz, 2004).

1.4 Complementary-determining region (CDR)

Wie in 1.3 bereits beschrieben, kommt es aufgrund der Rekombination der V-, D- und J-Gensegmente zu neuen, nicht keimbahncodierten, einzigartigen Neukombinationen. Wie bei den Immunglobulinen, besitzen auch T-Lymphozyten neben diesen sogenannten CDR3-Regionen, die ausschließlich die von MHC Molekülen präsentierten Antigene erkennen, noch complementarity-determining region (CDR) 1 und 2, die stark konserviert für die Bindung an das MHC Molekül verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu ist die CDR3-Region eine hypervariable Region innerhalb der Rezeptorkette. CDR1 und CDR2 sind Keimbahn codiert und liegen im V-Gensegment (Murphy and Weaver, 2017).

In TCR α - und γ -Ketten wird die CDR3-Region durch die Verbindung von einem V- und einem J-Gensegment gebildet, in TCR β - und δ -Ketten durch Kombination von einem V-, einem J- und einem oder 2 D-Gensegmenten (Davis and Bjorkman, 1988).

Die CDR3-Region liegt im Zentrum des Bereichs für die Antigenbindung und legt die räumliche Struktur fest. Gleichzeitig erlaubt die hohe Variabilität bei der Neuordnung nahezu unendliche Möglichkeiten unterschiedlicher TCR Bindungsregionen (Gorski *et al.*, 1994; Murphy and Weaver, 2017). CDR1 und CDR2 flankieren die Bindungsregion (Murphy and Weaver, 2017).

1.5 $\alpha\beta$ -TCR tragende Lymphozyten

Bei dem $\alpha\beta$ -TCR handelt es sich um ein Heterodimer bestehend aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, einer α - und β -Kette, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Jede Kette besteht in ihrem extrazellulären Bereich wiederum aus zwei Immunglobulindomänen, (Engl. Abk.: Ig domain) die wie oben beschrieben als variable (V) bzw. konstante (C) Region bezeichnet werden (s. Abb. 1). Insgesamt ähnelt der strukturelle Aufbau des TCR der Fragment-antigen-binding(-Fab) -Region von humanen Antikörpern (Chothia, Boswell and Lesk, 1988; Murphy and Weaver, 2017).

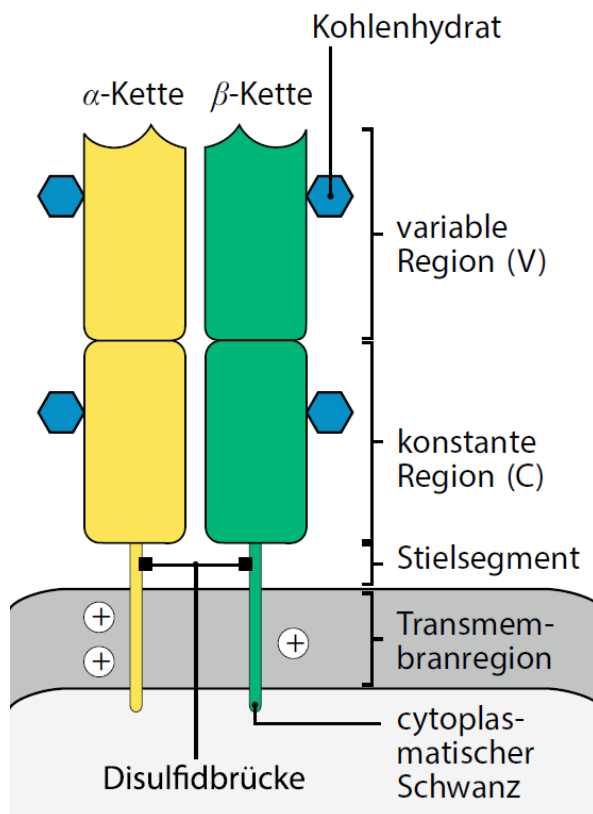


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors.

Der T-Zell-Rezeptor besteht aus einer α - und β -Kette, welche über die Transmembranregion in das Zytoplasma des T-Lymphozyten hineinragt. Jede Kette besteht aus einer konstanten (C) und variablen (V) Region. Die Bindung des Liganden erfolgt über den variablen Teil der jeweiligen Transmembranglykoproteinketten. Die Ketten sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden, an der Cystein beteiligt ist. Entnommen aus Murphy, K. M. and Weaver, C. (2018) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (Lizenznummer: 4594110493985).

1.6 $\gamma\delta$ -TCR tragende Lymphozyten

Die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten stellen eine kleine Subpopulation der T-Lymphozyten im Vergleich zu den $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten dar (Murphy and Weaver, 2017).

Sie kommen vorrangig in epithelialen Geweben vor, also neben dem lymphatischen Gewebe, auch in der Haut und dem weiblichen Genitaltrakt, dem Intestinaltrakt und dem Respirationstrakt (Groh *et al.*, 1998; Murphy and Weaver, 2017; Vantourout and Hayday, 2013). Im Gegensatz zu $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten können $\gamma\delta$ -T-Zellen Antigene direkt ohne die Bindung an MHC-Moleküle erkennen (Adams *et al.*, 2008; Chien, Jores and Crowley, 1996).

Ein Vorteil dieses Bindungsverhaltens könnte es sein, schneller und direkt auf Antigene reagieren zu können, welche durch verschiedene Zellen präsentiert werden. Viele Liganden, die durch $\gamma\delta$ -T-Zellen erkannt werden können, wie unter anderem die MHC-Klasse-I-ähnlichen MIC-Proteine (MICA und MICB), scheinen bei Zellstress vermehrt exprimiert zu werden. Das Erkennen dieser Moleküle ist der Grund, warum man $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht ausschließlich zum angeborenen oder erworbenen Immunsystem einordnet. Kristallografisch weist die Struktur von $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptoren im Vergleich zu $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptoren eine hohe Ähnlichkeit auf, zeigt jedoch deutliche Unterschiede in der räumlichen Orientierung im direkten Vergleich bei Bindung, beispielsweise an dem nichtklassischen MHC-Klasse-I-Molekül T22 (Murphy and Weaver, 2017).

1.6.1 Entwicklung und Diversität des $\gamma\delta$ -TCR

Die Organisation der TCR γ - und TCR δ -Loci ähnelt stark denen des TCR α - und TCR β -Locus. Allerdings gibt es auch deutliche Unterschiede. Besonders erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass sich die codierenden Gensegmente für die δ -Kette innerhalb des TCR α -Lokus zwischen den V_α - und J_α -Gensegmenten befinden (s. Abb. 2) (Chien *et al.*, 1987; Murphy and Weaver, 2017). Daraus resultierend führt jegliches Rearrangement im α Locus unweigerlich zu einem Verlust des δ -Lokus (s. Abb. 3). Sowohl der TCR γ , wie auch TCR δ weisen deutlich weniger V-Gensegmente im Vergleich zu TCR α und TCR β auf, was allerdings durch eine erhöhte junktionale Variabilität kompensiert wird. Die J-Region codiert für die Aminosäuren der Epitopbinderegion des TCR.

Da $\gamma\delta$ -TCRs im Gegensatz zu $\alpha\beta$ -TCRs nicht MHC restringiert sind, können diese direkt mit Liganden interagieren, also unabhängig von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) binden und darauf reagieren (Allison and Havran, 1991; Champagne, 2011; Murphy and Weaver, 2017).

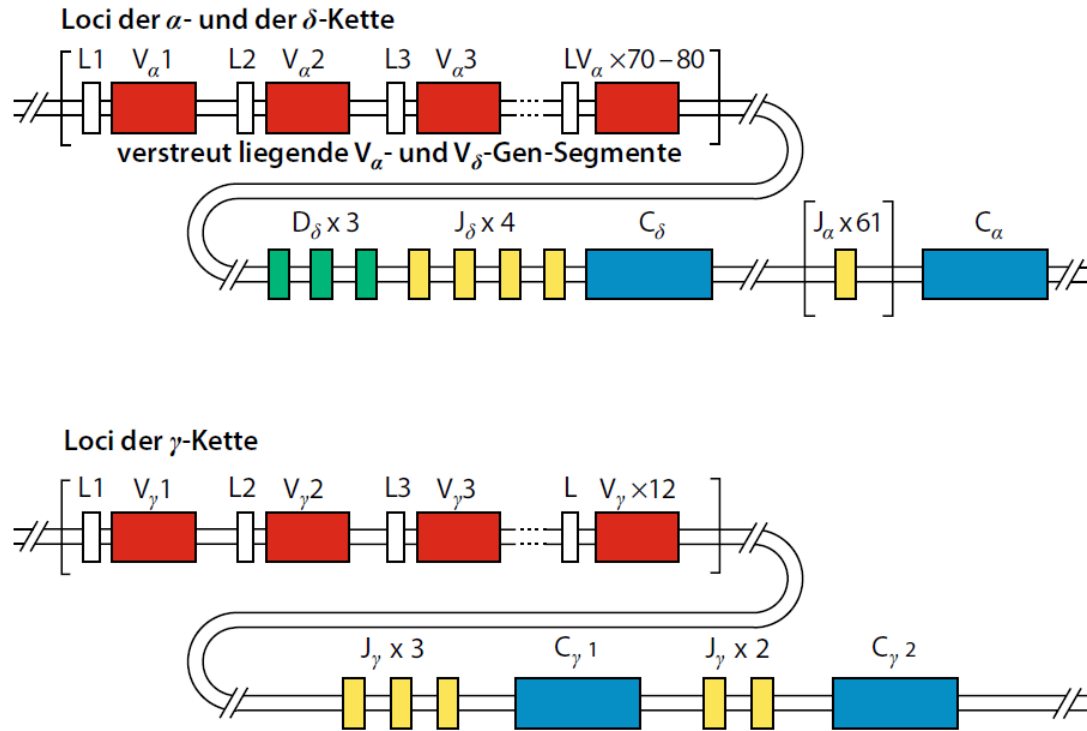


Abb. 2: Schematische Darstellung der Loci für die γ - und δ -Kette beim humanen TCR.

Sowohl γ - wie auch δ -Kette besitzen V -, D -, J -Gensegmente, wie auch C -Gene. Hervorzuheben ist die Einzigartigkeit, dass der codierende Anteil für die δ -Kette vollständig im Locus für die α -Kette liegt. So liegen die D_δ -, J_δ - und C_δ -Gensegmente zwischen dem Cluster von V_α - und J_α -Gensegmenten. Der $TCR\gamma$ - und $TCR\beta$ -Locus ist nahezu identisch und weist jeweils 2C- mit jeweils 3 davor geschalteten J-Gensegmenten auf. Erwähnenswert ist zudem, dass der $TCR\delta$ -Locus der Maus umfangreicher ist, als der des Menschen. Entnommen aus Murphy, K. and Weaver, C. (2018) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (Lizenznummer: 4592561457558).

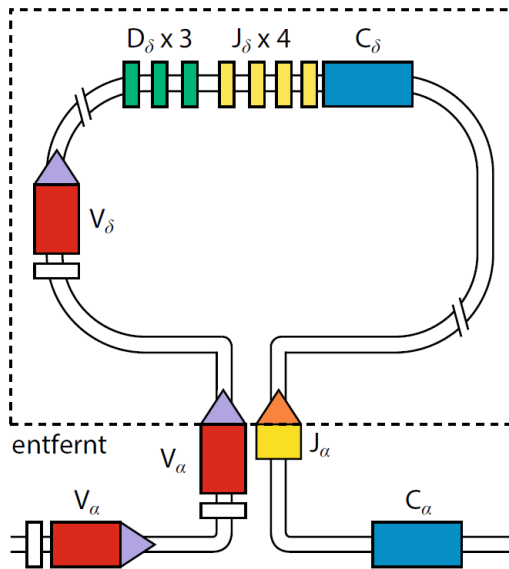


Abb. 3: Verlust des TCR δ -Locus bei Verbindung von V α - und J α -Gensegmenten.

Kommt es aufgrund von Genrekombinationen zu einer Verbindung von V α - und J α -Gensegmenten führt dies unweigerlich zu einem vollständigen Verlust des TCR δ -Locus. Daraus resultierend verhindert dies die Ausbildung einer δ -Kette und in Folge die Bildung eines $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptors. Entnommen aus Murphy, K. and Weaver, C. (2018) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (Lizenznummer: 4592561457558).

1.6.2 Aufbau und Vorkommen der $\gamma\delta$ -TCRs

Der Aufbau des $\gamma\delta$ -TCR ähnelt dem des $\alpha\beta$ -TCR und weist ebenfalls eine heterodimere Struktur auf. Auch die kristallografische Struktur des $\gamma\delta$ -TCR ähnelt der eines $\alpha\beta$ -TCR, weist jedoch bei genauerer Betrachtung Unterschiede im Aufbau der TCR-Gene auf. So beinhalten der TCR γ - und TCR δ - Locus weniger V-Gensegmente, welche allerdings eventuell durch die erhöhte Verknüpfungsvariabilität in den δ -Ketten des TCR kompensiert werden. Aus diesem Grund nutzen $\gamma\delta$ -T-Zellen die Möglichkeit der N-Nukleotid Insertion um eine hohe Verbindungsvielfalt an bis zu 3 V/D/J-Verbindungsstellen zu erzeugen und bilden damit die complementarity-determining region 3 (CDR3), welche eine höhere Ähnlichkeit mit der variablen Region von Immunglobulinen als mit dem $\alpha\beta$ -TCR aufweist (Murphy and Weaver, 2017).

Im postnatalen Thymus machen V δ 1- und V δ 2-Subpopulationen mit einem über die Lebenszeit nahezu konstanten Anteil von 80% und 15% den größten Anteil an V δ -Ketten der $\gamma\delta$ -T-Zellen aus (Casorati *et al.*, 1989; Parker *et al.*, 1990; Schilbach *et al.*, 2008). Anders sieht es im Blutkreislauf aus, wo der prozentuale

Anteil der V δ 2-Subpopulationen von 25% im Nabelschnurblut auf über 70% im Blutkreislauf des Erwachsenen ansteigt und damit den größten Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen in diesem Kompartiment ausmachen. Dem gegenüber steht der Anteil an V δ 1-Subpopulationen, welcher in den gleichen Kompartimenten von 50% auf weniger als 30% sinkt (Borst *et al.*, 1989; Casorati *et al.*, 1989; Haas, Pereira and Tonegawa, 1993; Parker *et al.*, 1990). Hervorzuheben ist, dass die V δ 1-Subpopulationen einen Anteil von 70-90% der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Epithel des Intestinaltraktes ausmacht (Groh *et al.*, 1998) und sich zum Großteil gewebständig aufhalten. In diesem Zusammenhang ist beeindruckend, dass der Anteil von im Blut zirkulierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen auf eine bedeutende Gesamtmenge (bis zu 60% Gesamtmenge aller T-Lymphozyten) während einer Infektion ansteigen kann (Balbi *et al.*, 1993; Bertotto *et al.*, 1993; Chien, Meyer and Bonneville, 2014; Hara *et al.*, 1992; Maria *et al.*, 1992; Perera *et al.*, 1994; Poquet *et al.*, 1998; Raziuddin *et al.*, 1992; Scalise *et al.*, 1992; Sumida *et al.*, 1992). Dieser Proliferationsreiz könnte durch antigene Faktoren getriggert sein, die vom Pathogen exprimiert werden (Bertotto *et al.*, 1993). Der Vollständigkeit wegen muss jedoch erwähnt werden, dass es auch einzelne Hinweise gibt, welche auf eine Reduktion, insbesondere der V δ 2-T-Zellen bei einer Infektion hindeuten (Carvalho *et al.*, 2002).

1.6.3 Antigenerkennung von $\gamma\delta$ -TCRs

Im Gegensatz zu $\alpha\beta$ -TCRs, die Peptide primär über MHC-I- oder MHC-II-Molekülen präsentiert bekommen, besitzt nur ein kleiner Prozentsatz $\gamma\delta$ -Ketten tragender TCRs diese Eigenschaft (Murphy and Weaver, 2017). $\gamma\delta$ -T-Zellen binden Antigene überwiegend direkt (MHC-unabhängig), um eine entsprechende Immunantwort einzuleiten. Zu diesen Molekülen gehören unter anderem ungewöhnliche Nucleotide („unorthodox nucleotides“), Phospholipide, Hitzeschockproteine („Heat-Shock-Proteins“, HSP), MHC-Klasse-1b-Moleküle, Non-Peptide-Ligands, wie beispielsweise phosphorylierte Moleküle oder Lipidantigene der Mycobakterien oder kurze Tetanustoxinpeptide (Guo *et al.*, 1995; Holoshitz *et al.*, 1992; Kozbor *et al.*, 1989; Murphy and Weaver, 2017).

In 1.6.2 wurde bereits erwähnt, dass humane $\gamma\delta$ -T-Zellen aus zwei großen Familien bestehen: $V\delta 1^+$ - und $V\delta 2^+$ -Ketten exprimierende $\gamma\delta$ -T-Zellen (Haas, Pereira and Tonegawa, 1993).

Im Peripherblut zirkulierende $V\delta 2$ -T-Zellen weisen einen invarianten TCR auf und besitzen fast ausschließlich den identischen $V\gamma 9^+ V\delta 2^+$ T-Zell-Rezeptor (Morita *et al.*, 2007). Diese erkennen zudem die MHC-Gen assoziierten Moleküle BTN3A1 (Harly *et al.*, 2012; Rhodes *et al.*, 2001) und RAET1E/ULBP4 (Kong *et al.*, 2009; Naruse *et al.*, 2011). Wie in Kapitel 1.7 näher beschrieben sind $V\delta 1^+ \gamma\delta$ T-Lymphozyten in der Lage MIC-Proteine wie MICA und MICB (MHC class I polypeptide-related sequence A and B) zu erkennen und zu binden (Groh *et al.*, 1996; Groh *et al.*, 1998; Groh *et al.*, 1999; Steinle, Groh and Spies, 1998; Wu, Groh and Spies, 2002). Weitere spezifische Liganden sind unter anderem CD1-Moleküle. Bei diesen kann die Bindung unabhängig von Lipiden bzw. Glykolipiden erfolgen („unbeladen“), jedoch können auch beladene CD1 Moleküle erkannt werden, wie beispielsweise CD1d präsentierte Sulfatide (Davey *et al.*, 2018; Luoma *et al.*, 2013; Spada *et al.*, 2000; Uldrich *et al.*, 2013). Weitere identifizierte Liganden für $\gamma\delta$ -TCRs können der Tabelle Tab. 1 entnommen werden.

Tab. 1: Übersichtsdarstellung bisher bekannter, aktivierender Liganden für $\gamma\delta$ T-Lymphozyten in der Maus und im Menschen.

*BTN3A1 scheint für die Erkennung der „Phosphoantigene“ HMB-PP und IPP essentiell zu sein und damit kein direkter, sondern ein indirekter Ligand für $\gamma\delta$ T-Lymphozyten zu sein (Vermijlen *et al.*, 2018). Entnommen aus Murphy, K. M. and Weaver, C. (2018) (Verlag: Springer Nature, Lizenznummer: 4600771291161) und modifiziert nach Dai *et al.*, 2012; Kemal Aydintug *et al.*, 2014; Rellahan *et al.*, 1991; Romain *et al.*, 2013; Schild *et al.*, 1994; Vermijlen *et al.*, 2018; Vidović *et al.*, 1989; Willcox *et al.*, 2012; Willcox and Willcox, 2019; Zeng *et al.*, 2014.*

$\gamma\delta$ -T-Zellen aktivierende Liganden		
Liganden	Spezies	$\gamma\delta$ Untergruppe
T10/T22 (MHC-Klasse Ib)	Maus	Verschiedene
I-E ^K (MHC Klasse II)	Maus	Klone
Cardiolipin	Maus	Verschiedene
Keratinocyten	Maus	dETC-V γ 5V δ 1
HSV-gI (lösliches Protein)	Maus	V γ 2V δ 8
Skint-1 (Butyrophilin ähnliches Molekül)	Maus	V γ 5V δ 1
I-A ^d (MHC Klasse II)	Maus	Klone

Qa-1 (MHC Klasse I ähnlich)	Maus	$\gamma\delta$ -T-Zell hybridoma
Insulin B:9-23 (freies Peptid)	Maus	$\gamma\delta$ -T-Zell hybridoma
Cyanine 3 (Hapten)	Maus / Mensch	Verschiedene
4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl (Hapten)	Maus / Mensch	Verschiedene
Phycoerythrin (lösliches Protein)	Maus / Mensch	Verschiedene
BTNL1–BTNL6 & BTNL3–BTNL8	Maus / Mensch	V γ 7(Maus) V γ 4 (Mensch)
MIC-A/MIC-B (MHC-ähnlich)	Mensch	Klone
ULBP4 (Oberflächenprotein)	Mensch	V γ 9V δ 2
CD1-Sulfatid (CD1c, CD1d)	Mensch	V γ 1
EPCR (Endothelprotein-C- Rezeptor)	Mensch	V γ 4V δ 5
Alkylamine	Mensch	V γ 9V δ 2
HLA-B*5802	Mensch	Klone
Schwere Beta2-Mikroglobulin freie HLA Ketten (MHC Klasse I)	Mensch	V γ 9V δ 3
BTN3A1 (Butyrophilin ähnliches Molekül)	Mensch	V γ 9V δ 2
hMSH2 (Oberflächenprotein)	Mensch	V δ 2
EphA2 (Oberflächenprotein)	Mensch	V δ 2 ^{neg}
Annexin A1 (Oberflächenprotein)	Mensch	V δ 2 ^{neg}
Annexin A2 (Oberflächenprotein)	Mensch	V δ 3
Histidyl-tRNA synthetase (lösliches Protein)	Mensch	V γ 3V δ 2
[HMB-PP (“Phosphoantigen”)]	Mensch	V γ 9V δ 2
[IPP (“Phosphoantigen”)]	Mensch	V γ 9V δ 2
R-phycoerythrin	Mensch	V δ 1

1.6.4 Funktionen und Aufgaben von $\gamma\delta$ -TCR tragenden Lymphozyten

Erstmalig fanden $\gamma\delta$ -TCRs Erwähnung im Jahr 1986 durch Brenner *et al.* Allerdings war zu diesem Zeitpunkt die Aufgabe und Funktion dieser T-Zell-Subpopulation noch völlig unbekannt (Brenner *et al.*, 1986). Auch über 30 Jahre später ist diese Frage noch nicht abschließend geklärt, allerdings hat sich gezeigt, dass $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten sowohl zytokinsezernierende, wie auch zytotoxische bzw. zytolytische Eigenschaften besitzen (Haas, Pereira and Tonegawa, 1993; Lang *et al.*, 1995; Munk, Gatrill and Kaufmann, 1990; Subauste

et al., 1995; Tsukaguchi, Balaji and Boom, 1995). So kann es, unter anderem in der Maus bzw. dem Menschen, zur Ausschüttung von Th1-typischen Zytokinen wie IFN- γ und Interleukin-2 (IL-2), wie auch Th2-typischen Zytokinen wie Interleukin-4 (IL-4), sowie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) bei Kontakt mit spezifischen Krankheitserregern oder Oberflächenproteinen auf virusinfizierten Zellen kommen (Brandes, Willmann and Moser, 2005; Chien, Meyer and Bonneville, 2014; Ferrick *et al.*, 1995; Follows *et al.*, 1992; Lang *et al.*, 1995; Munk, Gatrill and Kaufmann, 1990; Nishimura *et al.*, 1995; Skeen and Ziegler, 1995; Subauste *et al.*, 1995; Tsukaguchi, Balaji and Boom, 1995). Des Weiteren wurde bei GvHD nach Hauttransplantation die Produktion von IL-17A durch V γ 4⁺ $\gamma\delta$ -T-Zellen beobachtet (Li *et al.*, 2017). $\gamma\delta$ -T-Zellen zeigen ebenfalls antigenpräsentierende Eigenschaften, welche sowohl in der Potenz und Effizienz denen von Dendritischen Zellen und damit bekannten antigenpräsentierenden Zellen (engl.: „antigen presenting cells (APC)“) ähneln (Moser and Brandes, 2006).

Zudem scheinen $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten auch regulatorische Eigenschaften auf die menschliche Homöostase zu besitzen. Die Depletion von $\gamma\delta$ -T-Zellen führte in früheren Knock-out-Experimenten zu einer generell effizienteren antiviralen und antitumoralen Immunantwort (Kaufmann, 1996). Daneben beeinflusst die Anwesenheit von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten unter anderem die Sekretion von TNF- α durch Makrophagen in der Maus positiv bei Kontakt mit Lipopolysacchariden (Nishimura *et al.*, 1995). Die Eigenschaft, dass $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten primär auf bei Zellstress exprimierte Moleküle reagieren können, aber auch direkt auf Pathogene, führte dazu, dass diese T-Lymphozyten als „transitionale Immunität“ bezeichnet werden. Dies verdeutlicht, dass eine genaue Zuordnung in das angeborene bzw. adaptive Immunsystem nicht möglich ist und sich bei dieser Zellpopulation ein Mischbild zeigt (Murphy and Weaver, 2017).

1.6.5 Die Rolle von $\gamma\delta$ -TCR tragenden-Lymphozyten bei Knochenmarkstransplantation (BMT) bzw. Stammzelltransplantationen (HSCT) und Transplantatabstoßungen (GvHD)

Wie in 1.6.4 bereits näher erläutert, haben $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten vielfältige Aufgaben in der Immunabwehr von Pathogenen, sodass eine genaue Einordnung in angeborene oder erworbene Immunabwehr schwierig erscheint (Murphy and Weaver, 2017). Die bisherigen Publikationen zum Thema $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten und ihre Rolle bei Knochenmarkstransplantationen (BMT: Bone marrow transplantation) bzw. Stammzelltransplantation (HSCT: Hematopoietic stem cell transplantation) und Transplantatabstoßungen (GvHD: Graft-versus-Host Disease) lassen kein einheitliches Bild zu (Pabst *et al.*, 2007).

So gibt es Versuchsstudien an Mäusen, welche einerseits einen protektiven Effekt von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten gegen GvHD zeigen, wenn im Verlauf $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten zwei Wochen nach Stammzelltransplantation infundiert wurden (Drobyski, Vodanovic-Jankovic and Klein, 2000). Diese Befunde werden untermauert durch Beobachtungen, die zeigen, dass eine erniedrigte Gesamtzahl von $\gamma\delta$ -T-Zellen nach humaner Knochenmarkstransplantation das Risiko für eine GVHD steigert (Yabe *et al.*, 1994).

Kontrastiert werden die Befunde von Berichten, in denen eine letale GvHD beschrieben wird, nachdem $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten infundiert wurden, (Blazar *et al.*, 1996) bzw. eine erhöhte Anzahl von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten im Wirtsorganismus vorhanden waren (Maeda *et al.*, 2005; Pabst *et al.*, 2007; Viale, Ferrini and Bacigalupo, 1992). Als dritte Möglichkeit wird eine fehlende Korrelation zwischen Vorkommen von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten und GvHD erwähnt (Anderson *et al.*, 2004). Perko *et al.* (2015) resümieren nach ihrer Studie, dass eine erhöhte Anzahl an $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten eine signifikante Reduktion von Infektionen nach einer HSCT zur Folge hat. Godder *et al.* (2007) geben eine um den Faktor 4 verbesserte Chance an, krankheitsfrei zu bleiben, nach einer fehlangepassten Stammzelltransplantation bei akuten Hochrisiko-Leukämien, wenn eine erhöhte Gesamtzahl von zirkulierenden $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten vorliegt, ohne das Risiko einer

GvHD zu erhöhen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Lamb *et al.* (1996).

Auch wenn heute abschließend noch keine endgültige Aussage über einen Vorteil oder Nachteil einer erhöhten Gesamtzahl von im Organismus zirkulierender $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten nach HSCT getroffen werden kann, so fassen Minculescu and Sengelov (2015) in ihrer Übersichtsarbeit zusammen, dass nach bisherigen Gesichtspunkten $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten hinsichtlich antiviraler und antileukämischer Aktivität in zukünftigen Transplantationsbedingungen, insbesondere in der frühen Phase der Immunregeneration, durchaus vorteilhafte Effekte haben könnten.

1.7 Das MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) und MHC class I polypeptide-related sequence B (MICB)

MICA und MICB sind von Ihrem biochemischen Aufbau prinzipiell der Familie der MHC-Moleküle (s.1.2) zuzuordnen. Im Menschen sind bisher sechs MIC-Gene identifiziert worden, von denen allerdings bisher nur MICA und MICB eine Funktion zugeordnet werden konnten. Bei den verbliebenen vier handelt sich um Pseudogene (Frigoul and Lefranc, 2005).

Sowohl *mica* wie auch *micb* sind auf Chromosom 6 an Position 6p21.3 lokalisiert. Dabei weist *mica* eine Größe von 46,4 Kilobasen (kb) und *micb* eine Größe von 70kb auf (Bahram *et al.*, 1994; Mizuki *et al.*, 1997). *Mica* und *micb* werden besonders in Fibroblasten und Epithelien des Gastrointestinaltraktes exprimiert. In diesem Zusammenhang geht man davon aus, dass MIC-Proteine besonders bei Zellstress, wie zum Beispiel durch Virusinfekte induziert, an der Oberfläche hochreguliert werden (Bahram *et al.*, 1994; Groh *et al.*, 1996; Groh *et al.*, 1998).

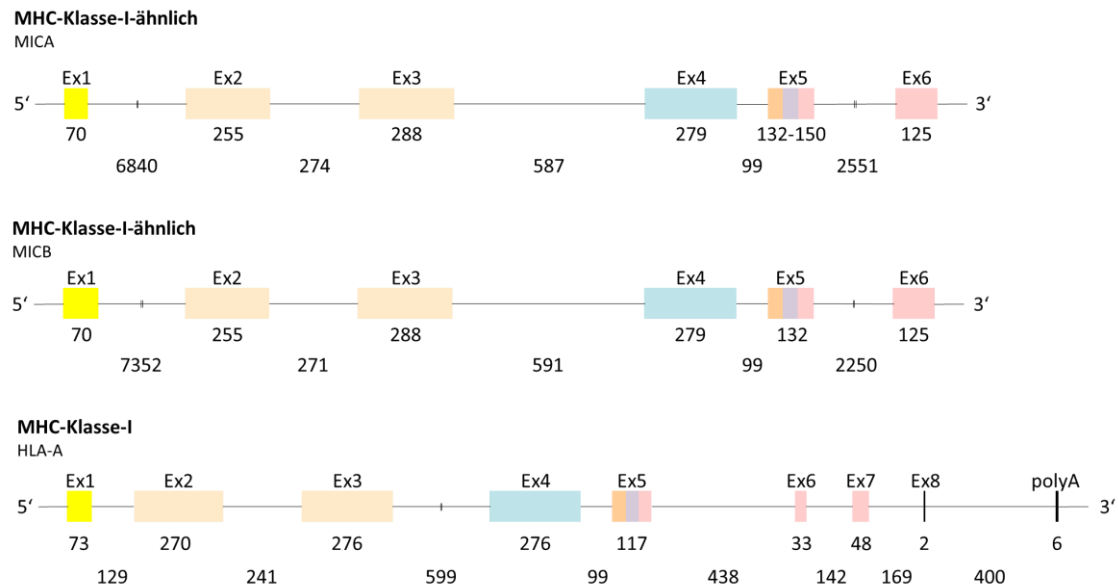
1.7.1 Aufbau und Vorkommen von MICA

Bei MICA handelt es sich um ein hoch glykosiliertes Protein, welches ohne die Anwesenheit von Peptiden oder Beta-2-Microglobulin gebildet werden kann. Es präsentiert selbst keine Antigene (Xu *et al.*, 2011) und findet sich primär in der basolateralen Membran in intestinalem Epithel (Groh *et al.*, 1996), wie auch in

geringen Maßen im Thymus (Groh *et al.*, 1999; Hübner *et al.*, 2003) und wird zudem in Epithel assoziierten Tumoren gebildet (Groh *et al.*, 1999; Vetter *et al.*, 2004), MICA ist vornehmlich in der Zellmembran in Bereichen von Lipid Rafts konzentriert, dabei handelt es sich um Cholesterin und Sphingolipid reiche Abschnitte in der Plasmamembran (Eleme *et al.*, 2004).

Das *Mica* Gen besteht aus sechs Exons und fünf Introns. Bei Exon 1 handelt es sich um das Signalpeptid (L-Region) mit einer Länge von 70 bp. Gefolgt von einem sehr langen Intron mit 6840 bp. Exon 2 und Exon 3 besitzen eine Länge von 255 bp, bzw. 288 bp und codieren für die G-Alpha1-Like-Domain mit 85 Aminosäuren bzw. G-Alpha2-Like-Domain mit 96 Aminosäuren. Getrennt werden beide Exone durch ein Intron mit 274 bp. Nach Exon 3 folgt ein Intron mit einer Länge von 587 bp. Exon 4 codiert mit einer Länge von 279 bp die C-Like-Domain mit 93 Aminosäuren und wird durch ein Intron von 99 bp Länge von Exon 5 getrennt. Eine Sonderstellung besitzt das Exon 5. Es weist eine Variable Länge von 132 bp bis 150 bp auf und codiert daraus resultierend für 44 bis 50 Aminosäuren. Der Grund liegt in einem Mikrosatellitenpolymorphismus. Dort findet man eine variable Menge der Basenabfolge GCT – codierend für Alanin (insgesamt 4-10-mal). Exon 5 codiert für die Connecting-Region (12 Aminosäuren), Transmembrane-Region (19-25 Aminosäuren, aufgrund des Mikrosatellitenpolymorphismus) und Intrazytoplasmatische-Region (13 Aminosäuren). Exon 6 codiert mit einer Länge von 125 bp bzw. 42 Aminosäuren für die Intrazytoplasmatische-Region. Exon 5 und 6 werden durch ein 2551 bp großes Intron voneinander getrennt. Insgesamt codiert *mica* für maximal 1149 bis 1167 Nukleotide bzw. 383 bis 389 Aminosäuren. Der Grund für die variable Länge der Gensequenz von MICA findet sich im Exon 5, aufgrund der unterschiedlichen Anzahl des GCT-Repeats (s. Abb. 4) (Carillon *et al.*, 2005; Frigoul and Lefranc, 2005; Lefranc, 2003; Lefranc *et al.*, 2015).

Einleitung



Farbe	Regionen und Domänen
Yellow	L-Region
Orange	G-Domain
Cyan	C-Like-Domain
Light Orange	Connecting-Region
Purple	Transmembrane-Region
Pink	Intracytoplasmatic-Region

Abb. 4: Darstellung der intramolekularen Organisation von Exons und Introns von *mica*, *micb* und *hla-a* im Vergleich.

Intron/Exon-Organisationsstruktur von *mica*, *micb* und *hla-a* im Vergleich. Die Länge von *mica* Exon 5 variiert von 132-150 bp aufgrund des Polymorphismus eines Mikrosatelliten in diesem Bereich (Fodil et al., 1999).

Angabe der Exon- und Intronlänge in Basenpaaren (bp). Die Farben entsprechen der IMGT (International ImMunoGeneTics) „Color menu for regions and domains“ (<http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/RepresentationRules/colormenu.php#GENE>).

Abbildung modifiziert nach Frigoul and Lefranc (2005).

Die Gensequenzen codierend für MICA und MICB sind zu ca. 91% identisch in ihrer Sequenz (Bahram et al., 1994). Das codierende Gen für MICB besteht aus sechs Exons und fünf Introns. Exon 1, welches gleichzeitig die L-Region darstellt, besitzt wie *mica* eine Länge von 70 bp. Es folgt ein Intron mit einer Länge von 7352 bp. Exon 2 und Exon 3 bilden die G-Alpha1-Like-Domain und G-Alpha2-Like-Domain mit einer Länge von 255, respektive 288 bp. Getrennt durch ein Intron mit einer Länge von 271 bp. Exon 3 und Exon 4 werden durch ein Intron

mit einer Länge von 591 bp getrennt. Exon 4 bildet mit einer Länge von 279 bp die C-Like-Domain. Es folgt ein Intron mit einer Länge von 99 bp. Exon 5 bildet mit 132 bp die Connecting-Region, Transmembrane-Region und einen Teil der Intrazytoplasmatischen-Region. Exon 5 und Exon 6 werden durch ein Intron mit einer Länge von 2250 bp voneinander getrennt. Exon 6 bildet den restlichen Teil der Intrazytoplasmatischen-Region mit einer Länge von 125 bp. Insgesamt codiert das Gen *micb* für maximal 1149 Nukleotide bzw. 383 Aminosäuren (s. Abb. 4) (Carillon and Frigoul, 2005; Lefranc, 2003; Lefranc *et al.*, 2015).

1.7.2 Funktion und Aufgaben von MICA

Wie in 1.7 bereits erwähnt wird *mica* bei Zellstress vermehrt exprimiert. Dabei scheint die Regulation der *mica*-Expression von heat shock motifs in der Promoterregion abhängig zu sein, wie sie bereits in HSP70-Genen gefunden wurden (Groh *et al.*, 1996; Groh *et al.*, 1998; Hunt and Morimoto, 1985).

Eine erhöhte *mica* Expression konnte bisher unter anderem bei Endothelzellen und Fibroblasten im Rahmen einer Infektion mit dem humanen Zytomegalievirus (CMV), *Mycobakterium tuberculosis* und *Escherichia coli* Bakterium beobachtet werden (Das *et al.*, 2001; Groh *et al.*, 1996; Groh *et al.*, 2001; Tieng *et al.*, 2002). Allerdings wurde auch in Tumoren eine vermehrte Expression von *mica* nachgewiesen (Groh *et al.*, 1999).

Der bekannteste identifizierte Rezeptor für MICA ist NKG2D (Bauer *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Wu, Groh and Spies, 2002). Der NKG2D-Rezeptor wird an den Zelloberflächen von natürlichen Killerzellen (NK), sowie CD8⁺ αβ T-Lymphozyten und γδ T-Lymphozyten exprimiert (Groh *et al.*, 2001). Es wird davon ausgegangen, dass der NKG2D-Rezeptor durch Bindung von Liganden auf menschlichen NK-Zellen sowohl Zytotoxizität, wie auch die Ausschüttung von Zytokinen vermittelt (Vivier, Tomasello and Paul, 2002).

Als Besonderheit zeigt sich, dass MICA auch direkt von T-Lymphozyten, ohne die Anwesenheit von NKG2D erkannt werden kann (Li *et al.*, 1999) und ein Ligand von Vδ1⁺ γδ T-Lymphozyten ist, wobei die genaue Rolle dieser T-Lymphozyten noch nicht bekannt ist (s. 1.6.4) (Groh *et al.*, 1999; Steinle, Groh and Spies, 1998; Wu, Groh and Spies, 2002).

1.7.3 Der *mica* Polymorphismus

Bis zum 18.01.2017 sind insgesamt 107 verschiedene *mica* Allele in der IPD-IMGT/HLA Datenbank des European Bioinformatics Institute als Teil der European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) identifiziert und publiziert worden. Allerdings werden auch hier Varianten berücksichtigt, die auf Sequenzebene zum Teil unterschiedliche Basenabfolgen aufweisen, jedoch keine Änderung der Aminosäuresequenz nach sich ziehen. Zum genannten Zeitpunkt werden 85 verschiedene *mica* Allele unterschieden, die für jeweils unterschiedliche Proteinsequenzen codieren. In der Datenbank sind diese Allele fortlaufend durchnummeriert (von MICA *001 bis *087), wobei die Bezeichnungen MICA*003 und MICA*021 keinen Datenbankeintrag besitzen (Robinson *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2013; Robinson *et al.*, 2015).

Frigoul and Lefranc haben im Jahr 2005 mit Ihrer umfangreichen Publikation „MICA: Standardized IMGT allele nomenclature, polymorphism and disease“ die Forschungsentwicklung von MICA in den 90er- und 2000-er Jahren näher beleuchtet und die Nomenklatur vereinheitlicht.

Die ersten fünf Varianten von MICA (MICA*001 bis MICA*005) wurden erstmalig von Bahram *et al.*, 1994 beschrieben. Im Jahre 1996 kamen durch Fodil *et al.* die Varianten MICA*006 bis MICA*016 hinzu, gefolgt von Mizuki *et al.* im Jahr 1997. In dieser Publikation wurden die Besonderheiten des Exon 5 beschrieben. Hier kann es an Position 295 zu einer Insertion von Guanin(G) kommen, was eine Leserasterverschiebung (engl. frame shift) zur Folge hat. Dieser frame shift kann im Verlauf zu einem Stopcodon und damit folgend zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsequenz führen.

Das verkürzte MICA Protein zeigt geänderte Eigenschaften, da ein Teil der intrazytoplasmatischen Basensequenz und daraus resultierend des Proteins fehlt. Daraus ergibt sich, dass bei der Variante MICA*008 das Protein in gelöster Form vorliegt und nach posttranslationalen Modifikationen entweder mittels GPI-Anker an der Zellmembran adhäriert oder via Exozytose freigesetzt wird (Ashiru *et al.*, 2013).

Wie schon in 1.7.1 beschrieben findet sich hier ebenfalls ein Mikrosatellitenpolymorphismus. Ab Position 293 findet man ein Short Tandem

Repeat („STR“) von 4,5,6 oder 9 Basentriplets „GCT“, die für die Aminosäure Alanin (Ala, A) codieren. In den darauffolgenden Jahren wurden durch zahlreiche Arbeitsgruppen weitere *mica* Allele gefunden (unter anderem durch Ban *et al.*, 2001; Fodil *et al.*, 1999; Komatsu-Wakui *et al.*, 1999; Mitsuishi Y, 1999; Obuchi *et al.*, 2001; Perez-Rodriguez *et al.*, 2000; Perez-Rodriguez *et al.*, 2002; Petersdorf *et al.*, 1999; Quiroga *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2001; Rueda *et al.*, 2002; Visser *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 1999; Zwirner NW, Molinero LL, Fuertes MB and Fainboim L., 2003).

Eine Auflistung der einzelnen SNPs mit ihren Positions-, Basen- und Aminosäurenaustausch ist den unten aufgeführten Tabellen zu entnehmen (Tab. 4, Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

Bei der Sequenz *mica* Exon 5 ist auf einige Besonderheiten hinzuweisen. Hier ist es möglich, dass man an der Position 295 die Insertion eines Glycins(G) feststellt. In der Folge kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu einer Änderung der nachfolgend codierten Aminosäuren. An der Insertionsstelle wird aus einem GCT ein GGC(T), was eine Änderung der codierten Aminosäure von Alanin (A) zu Glycin (G) nach sich zieht.

Ebenfalls findet man ab der Position 297 (s. Abb. 37) eine Besonderheit. Hier kann es zur Insertion eines oder mehrerer GCT-Repeats kommen, welche für die Aminosäure Alanin (A) codieren. Bisher bekannt ist eine maximale Wiederholungsfrequenz in Höhe von sechs GCT-Repeats. Hierbei kommt es allerdings zu keiner Verschiebung des Leserasters.

1.7.4 Der *micb*-Polymorphismus

Bis zum 18.01.2017 sind 31 (von MICB*001 bis MICB*031) verschiedene *micb* Allele in der IPD-IMGT/HLA Datenbank des European Bioinformatics Institute als Teil der European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) verzeichnet. Insgesamt werden zum genannten Zeitpunkt 39 verschiedene *micb* Allele unterschieden, allerdings werden auch hier Varianten berücksichtigt, die auf Sequenzebene zum Teil unterschiedliche Basenabfolgen aufweisen, allerdings keine Änderung der Aminosäuresequenz nach sich ziehen (Robinson *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2013; Robinson *et al.*, 2015).

Eine Auflistung der einzelnen SNPs mit ihren Positions-, Basen- und Aminosäureaustausch ist den unten aufgeführten Tabellen zu entnehmen (Tab. 9, Tab. 10, Tab. 11, Tab. 12, Tab. 13).

1.7.5 Die Rolle von MICA bei Autoimmun- und Tumorerkrankungen

Mit Beginn der Entdeckung von MICA und der Frage nach der Funktion dieses Proteins, haben sich sehr schnell Theorien über die Assoziation mit Autoimmunerkrankungen gebildet (Choy and Phipps, 2010; Frigoul and Lefranc, 2005). Eines der ersten autoimmunen Krankheitsbilder, die in diesem Zusammenhang ins Gespräch gebracht wurden, war der Morbus (M.) Behcet. Hierbei handelt es sich um eine Multisystemerkrankung im Rahmen einer leukozytoklastischen Vaskulitis, welche Arterien und Venen befällt und in ca. 70% mit HLA-B51 assoziiert ist (Herold, 2016). Erstmals wurde ein starkes Kopplungsungleichgewicht (engl. linkage disequilibrium) zwischen MICA und HLA-B im Jahr 1997 von Mizuki *et al.* beschrieben. Im weiteren Verlauf der Forschung zeigten sich in verschiedenen anderen Populationen ebenfalls Assoziationen mit HLA-B51 und MICA hinsichtlich Morbus Behcet (Gonzalez-Escribano *et al.*, 1999; Mizuki *et al.*, 1999; Wallace *et al.*, 1999; Yabuki *et al.*, 1999).

Allerdings zeigte ebenfalls Mizuki *et al.* im Jahr 2000, dass M. Behcet auch nur durch das alleinig erkrankte Gen HLA-B51 zur Ausprägung kommt. Im weiteren Verlauf kamen hier ebenfalls andere Studien zu dem Ergebnis, dass es zum Teil zu starken Assoziationen zwischen MICA und M. Behcet kommt, allerdings an der Krankheitsentwicklung vermutlich primär HLA-B51 beteiligt ist (Cohen *et al.*, 2002; Salvarani *et al.*, 2001). Reviews und Metanalysen aus dem Jahr 2016 mit zum Teil über 1500 an M. Behcet erkrankten Patienten und über 2000 Kontrollpatienten kommen zu dem Schluss, dass MICA und hier insbesondere das Vorliegen des variablen Alles *mica**A6 (sechs GCT/AGC-Wiederholungen) in der Transmembranregion des Exon 5 in Populationen mit selektiver ethnischer Herkunft (Bevölkerung im Nahen Osten, sowie ostasiatische und kaukasische Populationen) als Risikofaktor angesehen werden kann an M. Behcet zu erkranken. Allerdings sei in den nächsten Jahren weitere Forschung notwendig,

um die genauen Zusammenhänge besser zu verstehen (Wei, Zhang and Li, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

Weitere Erkrankungen wie zum Beispiel Rheumatoide Arthritis (Achour *et al.*, 2014; Groh *et al.*, 2003; Kirsten *et al.*, 2009), Colitis Ulcerosa (Orchard *et al.*, 2001), Zöliakie (Hüe *et al.*, 2004; Lopez-Vazquez *et al.*, 2002), Diabetes mellitus Typ I (Gambelunghe *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2003), Spondylitis ankylosans (Amroun *et al.*, 2005), Psoriasis-Arthritis (Gonzalez *et al.*, 1999), Morbus Addison (Gambelunghe *et al.*, 1999), Sjörgen-Syndrom (Carapito *et al.*, 2017) und Systemischer Lupus Erythematodes (Yoshida *et al.*, 2011) werden ebenfalls mit MICA in Verbindung gebracht.

Allerdings zeigen sich in anderen Studien oftmals gegenteilige Ergebnisse in Hinblick auf Assoziation zwischen MICA und den einzelnen Erkrankungen (Bilbao *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2000; Schrambach *et al.*, 2007).

Ebenfalls wird MICA unter anderem als protektiver Faktor bei rheumatoider Arthritis diskutiert (Kirsten *et al.*, 2009).

Groh *et al.*, 1999 und Vetter *et al.*, 2002 berichten beide von einer erhöhten Expression von *mica* auf der Zelloberfläche von epithelialen Tumorzellen. Auch ca. 20 Jahre nach den ersten Erkenntnissen kommen Zhao *et al.* im Rahmen ihrer Metaanalyse zu der Schlussfolgerung, dass die Oberflächenexpression von *mica* ein prognostischer Marker für das Überleben von Patienten sein könnte, die an verschiedenen Malignomarten erkrankt sind. Allerdings wird auch hier auf die Limitation dieser Metaanalyse hingewiesen. Dem entgegen steht eine Studie von Ghadially *et al.* aus dem Jahr 2017, die ebenfalls über eine starke Expression von *mica* in Bezug auf Tumorzellen berichten, allerdings nicht auf der Zelloberfläche, sondern intrazellulär.

1.7.6 Die Rolle von MICA bei Graft-versus-Host Reaktion (GvHD)

Aufgrund der Verknüpfung von MICA mit Autoimmunerkrankungen (s. 1.7.5) liegt der Verdacht nahe, dass MICA auch bei Abstoßungsreaktionen, insbesondere nach Stammzelltransplantationen (engl Abk. HSCT) eine Rolle spielen könnte. Dabei schädigen alloreaktive T-Lymphozyten des Organ- bzw. Knochenmarkspenders die Organe des Empfängers. Differenziert wird zwischen

akuter (innerhalb von 100 Tagen) und chronischer (länger als 100 Tage) GvHD nach Transplantation (Herold, 2016).

Verschiedene Arbeiten zeigten in den letzten Jahren (unter Betrachtung geringer Fallzahlen), dass MICA einen Einfluss auf die Entstehung und die Ausprägung von GvHD, insbesondere bei HSCT, trotz HLA-Matching, haben kann (Askar *et al.*, 2014; Boukouaci *et al.*, 2009; Isernhagen *et al.*, 2015; Parmar *et al.*, 2009).

Im Zusammenhang mit Organtransplantationen, insbesondere Nierentransplantation, sind in der Vergangenheit mehrere Arbeiten entstanden, die einen Zusammenhang zwischen Anti-MICA-Antikörpern und akuten, sowie chronischen Abstoßungsreaktionen bzw. Transplantatversagen vermuten lassen (Cox *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2011; Panigrahi *et al.*, 2007; Sanchez-Zapardiel *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2006).

Anderson *et al.* gaben in Ihrer Untersuchung im Jahr 2009 an, dass sie davon ausgehen, dass MICA keine Relevanz bei GvHD besitzt. Allerdings muss die Aussagefähigkeit aufgrund der Patientenauswahl und Patientenzahl (n=38 Spender-Empfänger-Paare) kritisch betrachtet werden.

Die zum Zeitpunkt der Veröffentlichung bisher größte Studie mit über 900 Spender-Empfänger-Paaren von Carapito *et al.* aus dem Jahr 2016 kommt aufgrund ihrer Ergebnisse zu dem Schluss, dass die Sequenz von *mica* als zusätzlicher Marker zum „matchen“ von Transplantatspender und -empfänger herangezogen werden sollte.

1.8 Fragestellung

MICA ist ein Molekül, welches von Zellen vermehrt bei Zellstress exprimiert wird. Dabei ist es irrelevant, ob dieser „Stress“ durch ein Bakterium oder einen Virus, bzw. Dysfunktion oder Transformation ausgelöst wird. In den letzten Jahren verdichteten sich zudem die Hinweise auf eine Beteiligung von MICA und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten hinsichtlich Autoimmunerkrankungen (Achour *et al.*, 2014; Amroun *et al.*, 2005; Carapito *et al.*, 2017; Chen and Freedman, 2011; Choy and Phipps, 2010; Freedman *et al.*, 1991; Frigoul and Lefranc, 2005; Gambelunghe *et al.*, 1999; Gambelunghe *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 1999; Gonzalez-Escribano *et al.*, 1999; Groh *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2003; Hüe *et al.*, 2004; Kirsten *et al.*,

2009; Lopez-Vazquez *et al.*, 2002; Mizuki *et al.*, 1997; Mizuki *et al.*, 1999; Orchard *et al.*, 2001; Papotto *et al.*, 2018; Shiromizu and Jancic, 2018; Wallace *et al.*, 1999; Wei, Zhang and Li, 2016; Yabuki *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2011; Zeine *et al.*, 1998) sowie GvHD (Askar *et al.*, 2014; Boukouaci *et al.*, 2009; Cox *et al.*, 2011; Drobyski, Vodanovic-Jankovic and Klein, 2000; Isernhagen *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2011; Maeda *et al.*, 2005; Minculescu and Sengelov, 2015; Pabst *et al.*, 2007; Panigrahi *et al.*, 2007; Parmar *et al.*, 2009; Sanchez-Zapardiel *et al.*, 2013; Viale, Ferrini and Bacigalupo, 1992; Yabe *et al.*, 1994; Zou *et al.*, 2006).

Da MICA ein Ligand für V δ 1- $\gamma\delta$ -TCR ist, stellt sich die Frage, ob MICA im Zusammenspiel mit $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten für mögliche Transplantatabstoßungen (GvHD), insbesondere nach Stammzelltransplantation, verantwortlich sein könnte. Bisher konnte durch Studien noch keine sichere Aussage dazu getroffen werden, ob eine hohe Expression von zelloberflächenständigem *mica* eine Abstoßung triggert und ob aus diesen Gründen ein „Matching“ zwischen Spender und Empfänger auf die exprimierte MICA-Variante Sinn machen könnte.

Aufgrund von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe unter der Leitung von Frau Prof. Schilbach konnten Probanden identifiziert werden, deren V δ 1⁺-T-Lymphozyten einen identischen $\gamma\delta$ -TCR aufweisen. Auf Basis dieser Voraussetzungen konnte eine Analyse auf die MICA-Variante der Probanden stattfinden und der Versuch unternommen werden, eine *in silico* Modellierung von individuellem TCR und MICA-Ligand durchzuführen. Aufgrund von potenziell zukünftig aufkommenden Fragestellungen wurden die Probanden ebenfalls auf ihre individuelle *mica*-Sequenz hin untersucht.

Es stellt sich nun die klinisch und wissenschaftlich relevante Frage, ob es möglich ist, eine computerbasierte Analyse zu etablieren, mittels derer sich das Bindungsverhalten von individuellen TCRs mit autologem und allogenen MICA anhand der freiwerdenden Energie bei Eingehen einer Bindung von Rezeptor und Ligand erfassen lässt und ob diese Energie sich signifikant interindividuell unterscheidet. Dieses Ergebnis könnte dazu beitragen, die Wahrscheinlichkeit einer potenziellen GvHD bereits vor Transplantation zu berechnen bzw. vorherzusagen und daraus resultierend mögliche Komplikationen nach

Transplantation zu vermeiden, sowie die Relevanz eines Matchings von spender- und empfängerindividuellen MICA bei Transplantationsplanung vorzunehmen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz)
5x DNA Loading Buffer Blue	Bioline GmbH (Luckenwalde, Deutschland)
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
GelRed® Nucleic Acid Gel Stain	Biotium (Fremont, Kalifornien, USA)
Heparin-Natrium 25.000	Ratiopharm® (Ulm, Deutschland)
Hi-Di™ Formamid	Life Technologies™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
HyperLadder™ 50bp	Bioline GmbH (Luckenwalde, Deutschland)
JumpStart Taq ReadyMix (s. 2.8.2)	Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
BD Pharm Lyse™ (Lysepuffer)	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Primer (s.2.8.1)	Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland)
SeaKem® LE Agarose	Biozym® (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
TAE Puffer (10x)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
Water Molecular Biology Reagent W4502	Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)

2.2 Geräte

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz)
3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystem® (Foster City, Kalifornien, USA)
Beheizbares Wasserbad	Köttermann (Uetze, Deutschland)
Eismaschine	Scotsman® (Veron Hills, Illinois, USA)
Gefrierschrank -20° (Froster Labex® 95)	Kirsch (Willstätt-Sand, Deutschland)
GeneAmp® PCR System 9700 (PCR)	Applied Biosystem® (Foster City, Kalifornien, USA)
Kühlschrank (FKU-1800)	Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland)
Laborwaage BP121S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Microzentrifuge	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Mikrowelle	De'Longhi (Treviso, Italien)

Mini Electrophoresis Power Supply E132	Consort, Cleaver Scientific (Rugby, Warwickshire, Vereinigtes Königreich)
Minicell EC370M (Electrophoretic Gel System)	EC Apparatus Corporation (Nicht bekannt)
NanoDrop 2000	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
Odyssey Fc Imager	Li-Cor Biosciences® (Lincoln, Nebraska, USA)
PerfectBlue™ Horizontal Minigelsystems	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Pipettierhilfen Pipetboy acu	Integra Biosciences AG (Biebertal, Deutschland)
Accu-Jet®	Brand® (Wertheim, Deutschland)
PowerPac 1000 Electrophoresis Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien, USA)
Vortexer REAX top	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Waage CPA22025-0CE	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Werkbank Hera safe (steril)	Heraeus GmbH (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus GmbH (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Rotanta 46 RSC	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge Rotixa 50 RS	

2.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz)
BD Microlance TM 3 20G	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Flat PCR Tube 8-Cap Strips 0,2ml	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien, USA)
Handschuhe Nitrile Powder-Free	Abena® GmbH (Oberderdingen, Deutschland)
Kanüle Sterican®	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystem® (Waltham, Massachusetts, USA)
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Gen-Sequenzierung)	Applied Biosystem® (Foster City, Kalifornien, USA)
Parafilm M	Bemis Company Inc. (Neeah, Wisconsin, USA)
PCR Reaktionsgefäße Thermo-Strups™ 8-Tube Strips, white	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)

	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien, USA)
Pipetten: P2, P10, P20, P100, P200, P1000 0,5-10 µl (Reference®) 2-20 µl (Transferpette®-12)	Gilson® Inc. (Middleton, Wisconsin, USA) Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) Brand® (Wertheim, Deutschland)
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym® (Hessisch Oldendorf, Deutschland) Starlab International GmbH (Hamburg, Deutschland)
Plate Septa 96-Well	Applied Biosystem® (Waltham, Massachusetts, USA)
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2,0ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One International GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Safety-Multifly®-Kanüle	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Spritze BD Plastipak TM (50 ml)	Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Spritze BD Platipak TM (50ml)	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Stabpipetten Corning® Costar® Stripette® (1ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA)
Sterile Spritzen (2, 10, 20 ml), Luer Solo	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Verschiedene Glaswaren	Schott Duran® (Wertheim/Main, Deutschland)

2.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz)
BigDye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)
DNA Clean & Concentrator-25	Zymo-Research (Irvine, Kalifornien, USA)
DNA Sequencing Clean-up Kit	Zymo-Research (Irvine, Kalifornien, USA)
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen N.V. (Venlo, Niederlande)
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen N.V. (Venlo, Niederlande)

2.5 Isolierung von PBMCs aus Vollblut gesunder menschlicher Spender

Die experimentelle Durchführung der Versuche erfolgte nach Zustimmung durch die Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum Tübingen (Aktenzeichen: 105/2017BO2). Den zur freiwilligen Blutspende eingewilligten gesunden Spendern wurde durch geschultes Personal unter sterilen Bedingungen ca. 5-20 ml Vollblut mit Hilfe einer Butterflynadel abgenommen. Die zur Blutabnahme verwendete Spritze wurde zuvor durch die Aspiration von Heparin präpariert, um die Gerinnung des Blutes zu vermeiden.

2.6 Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation dient der Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut. Dieses Trennverfahren nutzt das unterschiedliche Sedimentationsverhalten von Blutbestandteilen in einem Dichtegradienten.

Das Vollblut wurde im Verhältnis 2,5-4:1 mit 1-fach PBS gemischt. Anschließend wurde das Gemisch vorsichtig auf Ficoll im Verhältnis 1:2-3, 1 Teil Ficoll zu 2-3 Teilen PBS-Blut-Gemisch geschichtet. Die so hergestellte Schichtung aus Ficoll und PBS-Blut-Gemisch wurde anschließend für 15 Minuten bei 799 g ohne Bremse zentrifugiert, damit es zu keiner Zerstörung des Konzentrationsgradienten kam. Anschließend wurde der Überstand mittels Absaugereinheit bis ca. 1,5 cm oberhalb des Buffy Coats abgesaugt. Bei dem Buffy Coat handelt es sich um einen Lymphozytenring, welcher durch die Dichtegradientenzentrifugation deutlich vom Blutplasma und den Erythrozyten abzugrenzen ist und die gewünschten mononukleären Zellen enthält. Mit einer Pipette wurde der Lymphozytenring abgenommen und in ein 50 ml Falcon Tube überführt. Danach wurde das Falcon Tube mit PBS bis zur 50 ml Marke aufgefüllt. Das Lymphozyten-PBS-Gemisch wurde nun zentrifugiert (450 g, Raumtemperatur (RT), 12 Minuten). Nach dem Waschen wurde der Überstand erneut bis zum Zellpellet abgenommen. Durch Hinzugabe von 1-fach konzentriertem Lysepuffer zum Zellpellet und abwarten einer zweiminütigen

Inkubationszeit wurden die vorhandenen Erythrozyten lysiert. Anschließend wurde das Falcon-Tube auf ein Volumen von 10 ml mittels PBS aufgefüllt und bei RT für 10 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Nach dem Waschen wurde der Überstand erneut verworfen und das Zellpellet in ca. 2 ml PBS resuspendiert. Nach dem Anfärben der Zellen mittels Trypanblau wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt.

2.7 Gewinnen von genomischer DNA

Die Gewinnung von gDNA anhand von PBMNCs erfolgte anhand des „Appendix B: Protocoll for Cultured Cells“, QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook 02/2015, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland.

Maximal $5 \cdot 10^6$ der wie in Abschnitt 2.6 gewonnenen Zellen wurden in 200 μ l Puffer AL in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gelöst und für 15 Sekunden gevortext. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten bei 56°C inkubiert. Danach wurden 200 μ l 100% Ethanol hinzugegeben und das Ganze durch kurzes Vortexen miteinander vermischt. Der Alkohol sorgt dafür, dass die DNA präzipitiert und an der anschließend verwendeten Anionenaustauschersäule (Mini spin column) bindet.

Das Zelllysat wurde anschließend auf ein QIAamp Mini spin column pipettiert, welches sich in einem 2 ml Sammelgefäß befand und bei 6000 g für eine Minute zentrifugiert. Bei diesem Schritt bindet die DNA an die Säule. Das Eluat wurde verworfen und die Säule anschließend mit 500 μ l AW1 Puffer gewaschen. Erneut wurde, wie oben beschrieben, zentrifugiert und das Eluat verworfen. Danach wurden 500 μ l AW2 Puffer hinzugegeben und mit maximal möglicher Drehzahl \geq 20000 g für 3 Minuten bei RT zentrifugiert, um die so gereinigte Säule zu trocknen. In einem optionalen weiteren Zentrifugationsschritt wurde die Trocknung sichergestellt. Die QIAamp Mini spin column mit der gebundenen gDNA wurde in ein neues 2 ml Sammelgefäß gestellt und erneut mit maximaler Geschwindigkeit für eine Minute zentrifugiert.

Anschließend wurde es in ein steriles, autoklaviertes 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt und 200 μ l AE Puffer hinzugegeben. Nach einer Minute Inkubationszeit wurde erneut mit 6000 g bei RT zentrifugiert, um die gDNA zu eluieren.

2.7.1 Messen des DNA Gehaltes

Die qualitative und quantitative Bestimmung der unter Punkt 2.7 isolierten DNA erfolgte mit dem Gerät Nanodrop 2000 der Firma Thermofisher Scientific.

Zur Nullwertmessung wurde AE-Puffer (s. 2.7) genutzt. Anschließend wurde der DNA-Gehalt spektralphotometrisch bestimmt.

2.8 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR, handelt es sich um ein Verfahren, welches dafür genutzt wird, Erbgut wie DNA abschnittsweise zu amplifizieren. Dabei wird die DNA-Matrize mit Hilfe von Primern (bestehend aus Oligonucleotiden), komplementär zu dem zu amplifizierenden DNA-Abschnitten eingegrenzt. Die Durchführung der PCR erfolgt in Thermozyklern, welche die DNA auf Temperaturen von ca. 94°C erhitzt, damit es zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA kommt. Anschließend wird durch Abkühlung die optimale Hybridisierungstemperatur (abhängig von der Schmelztemperatur des Primers) erreicht, damit es zur Anlagerung des Primers an die komplementäre Stelle des DNA-Einzelstranges kommt. Durch Nutzung von Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTPs) und der DNA-Polymerase, welche für den Einbau der dNTPs zuständig ist, kommt es zur kontinuierlichen Verlängerung der komplementären Basenpaare an den Enden der Primer. Als DNA-Polymerase kommt häufig die hitzestabile DNA-Polymerase des Bakterium *Thermus aquaticus* (sog. Taq-Polymerase) zum Einsatz. Wiederholt kommt es zu einem erneuten Anstieg der Temperatur auf ca. 72°C, um die optimale Elongationstemperatur für die DNA-Polymerase zu erreichen. Der Abbruch der Amplifikation erfolgt, wenn die Elongationsbedingungen nicht mehr gegeben sind (z.B. durch Temperaturveränderungen). Im Folgenden wiederholen sich die einzelnen Schritte (Denaturierung, Annealing, Elongation (Synthese)) im Regelfall 20 bis maximal 40 mal. Nach Abschluss der eingestellten Zykluszahl wird das Produkt auf eine konstante Temperatur von 4°C heruntergekühlt.

2.8.1 Primer

Die Auswahl der Primer erfolgte anhand von Datenbanken und Publikationen, in denen bereits publizierte Primer auf Konsistenz geprüft und gegebenenfalls leicht modifiziert wurden oder durch das Designen von eigenen Primersequenzen (s. Tab. 2). Die Verifizierung der ausgewählten bzw. erstellten Primer erfolgte mithilfe des Programm Primer-BLAST von NCBI (Ye *et al.*, 2012). Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics GmbH. Die Primer wurden als Lyophilisat geliefert und durch die Verwendung von sterilem molekularbiologisch reinem Wasser auf eine Konzentration von 20 pmol/ μ l verdünnt. Anschließend erfolgte die Aliquotierung und Lagerung bei -20°C.

Tab. 2: Liste der verwendeten Primer.

Primer	Sequenz (5' nach 3')	Amplifikat	Quelle:
MICA Forward	CCCCCTTCTTCTGTTTCATGG	2607 bp	Modifiziert nach Field <i>et al.</i> , 2008
MICA Reverse	TGACTCTGAAGCACCAGCAC		Field <i>et al.</i> , 2008
MICA-Exon 2 Forward	TCCTGCCCAGGAAGGTT	490 bp	
MICA Exon 2 Reverse	CTGCTGAGTTCCACTGAC		
MICA Exon 3 Forward	AGGAATGGGGGTCAGTGGAA	537 bp	
MICA Exon 3 Reverse	GAGGGTTTCCCTGGACACAT		
MICA Exon 4 Forward	CTGTTCCCTCTCCCCTCCTTA	397 bp	
MICA Exon 4 Reverse	CCATCCCTGCTGTCCCTAC		
MICA Exon 5 Forward	GTAGGGACAGCAGGGATGG	284 bp	Selbst designed mithilfe von Frau Katja Kühn
MICA Exon 5 Reverse	CATGCCTATCTTTGCAGGAG		PMCID: PMC3628399 E. W. Petersdorf

Material und Methoden

MICA Exon 6 Forward	AATAAACACAACACTGCACCC	254 bp	Obuchi <i>et al.</i> , 2001	
MICA Exon 6 Reverse	AGGCACCAAGAGGGAAAGTG		Obuchi <i>et al.</i> , 2001	
MICB Forward (1)	GGACAGCAGACCTGTGTGTTA	2037 bp	Field <i>et al.</i> , 2008	
MICB Reverse (1)	AAAGGAGCTTTCCCATCTCC			
MICB Forward (2)	GACCTTCCTTCCAMCACTGC (M= A oder C)	4937 bp	Ying <i>et al.</i> , 2013	
MICB Reverse (2)	AGTGAATGCCCTCAGCAAAC			
MICB-Exon 2 Forward	GGACAGCAGACCTGTGTGTTA	462 bp	Field <i>et al.</i> , 2008	
MICB Exon 2 Reverse	GCCTCCCTGACCCTATTCC			
MICB Exon 3 Forward	GAGTAATGGGAGGCCTTCT	640 bp		
MICB Exon 3 Reverse	TGCATCCATAGCACAGGG			
MICB Exon 4 Forward	CAGGAGTCCACCCTTGACAT	657 bp		
MICB Exon 4 Reverse	CGTTGACTCTGAAGCACCCAG			
MICB Exon 5 Forward	Entspricht dem Primer MICB Exon 4 Forward	803 bp		
MICB Exon 5 Reverse	AAAGGAGCTTTCCCATCTC			Modifiziert nach Field <i>et al.</i> , 2008
MICB Exon 6 Forward	GGTCCTGGATCAACACCCA	174 bp		Selbst designed mithilfe von Frau Katja Kühn
MICB Exon 6 Reverse	AGAGGGAAAGTGCTGGTGAG			Modifiziert nach Ying <i>et al.</i> , 2013

2.8.2 Enzyme

JumpStart Taq ReadyMix - 20 mM Tris-HCl, - 100 mM KCl, - 3 mM MgCl ₂ , - 0,002% Gelatin, - 0,4 mM von jeder dNTP, - stabilizers, - 0,1 unit/ µl Taq DNA Polymerase - JumpStart Taq antibody	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
---	--

2.9 Gelelektrophorese

2.9.1 DNA Längenstandard

Als DNA-Längenstandard wurde das Produkt "HyperLadder™ 50bp" der Firma Bioline (Luckenwalde, Deutschland) verwendet. Dieser zeigt starke Banden bei 300, 1000 und 2000 Basenpaaren (bp).

2.9.2 Herstellung des Agarosegels

Zur Herstellung des Agarosegels wurde 1-1,6 g Agarose in 100 ml, 1-fach TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) durch Erwärmen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 40°C und Zugabe von 1 µl Gel-Red wurde die Agarose-TAE-Puffer-Lösung in eine Gelkammer gegossen. Danach wurden zum Erzeugen von Geltaschen ein oder mehrere Kämmen in das Gel eingelassen. Gel-Red interkaliert in doppelsträngige DNA und fluoresziert unter UV Licht, wodurch eine photometrische Detektion der dsDNA-Amplikons ermöglicht wird.

Vorhandene Luftblasen im Gel wurden mittels einer Pipettenspitze entfernt. Das Gel härtete bei RT für 30-40 Minuten aus. Als Laufpuffer wurde 1-fach TAE-Puffer verwendet, welcher bis zur empfohlenen Mengenanzeige in der Laufkammer aufgefüllt wurde. Die Laufzeit betrug je nach Agarosegehalt (zwischen 1% und 1,6%), sowie Spannung von 80-135 V, zwischen 1 h und 2,5 h.

2.9.3 Kontrolle der PCR-Produkte

Die Qualitätskontrolle und Fotodokumentation der PCR-amplifizierten MICA- und MICB-Gensequenzen (s. 2.8) erfolgte anhand der in 2.9.2 durchgeführten Gelelektrophoresen mithilfe des Li-Cor Odyssey® Fc Imaging Systems.

2.10 Probenvorbereitung

Aus den 2.8 gewonnen Produkten wurden jeweils 2 µl entnommen und anschließend mit dem in 2.9.2 erwähnten Loading Dye im Verhältnis 1:1 vermischt. Als Loading Dye wurde „5x DNA Loading Buffer Blue“ der Firma Bioline (Luckenwalde, Deutschland) verwendet. Der 5-fach konzentrierte Loading Dye wurde auf eine 1-fache Konzentration verdünnt.

2.11 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte aus Punkt 2.8 erfolgte nach der Gebrauchsanweisung des Produktes DNA Clean & Concentrator-25 der Firma Zymo-Research.

Das Prinzip basiert auf der Bindung von DNA durch einen Bindungspuffer („Binding-Buffer“), auf einer Säule. Durch mehrmaliges Spülen dieser Matrix mit dem mitgelieferten Waschpuffer („Wash-Buffer“) werden überschüssige Enzyme, dNTPs und residuelle genomische DNA entfernt. Durch anschließendes Lösen der nun aufgereinigten cDNA mittels eines Lösungspuffers („Elution-Buffer“) von der Membran, kann nun eine Weiterverarbeitung stattfinden. Es wurde wie empfohlen ein DNA-Bindungspuffer : DNA -Verhältnis von 5 : 1 verwendet.

2.12 Sequenzier-PCR nach Sanger

Die Sequenzierung nach Sanger nutzt unter anderem die Methode der Polymerase-Kettenreaktion. Der zu sequenzierenden DNA werden eine DNA-Polymerase, Desoxynucleotidtriphosphate (Guanin, Adenin, Thymin, Zytosin), sowie Kettenabbruchnukleotide hinzugegeben. Bei den Kettenabbruchnukleotiden handelt es sich um Didesoxynucleotidtriphosphate, welche keine 3'-Hydroxylgruppe besitzen. Sobald eines dieser vier Nucleotide

angehängt wird, kann die Polymerase keine weiteren Nukleotidbausteine anknüpfen und es kommt zum Kettenabbruch. Dies hat zur Folge, dass es zu unterschiedlich langen DNA-Fragmenten kommt, welche mit dem entsprechenden Abbruchnukleotid endet.

Durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen kann jedes Abbruchnukleotid mit einer anderen Farbe markiert werden und so die Menge der Ansätze auf einen reduziert werden. Die so neu erzeugten DNA-Fragmente werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Eine Auswertung erfolgt unter zur Hilfenahme eines Lasers, welcher die Fluochrome anregt. Das vom Fluorophor emittierte Licht kann mittels eines Detektors erfasst werden. Die Abfolge der Farbsignale wird am Detektor registriert und als Elektropherogramm dargestellt. Dies entspricht der Basenabfolge des DNA-Stranges.

Die Sequenzierung nach Sanger erfolgte modifiziert nach dem Protokoll „Generating high-quality data using the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ der Firma Applied Biosystems™ für jeden Probanden für *mica*- und *micb* Exon 2-6. Zunächst wurden in PCR-Tubes jeweils 1 µl Forward- oder Reverse-Primer für *mica* oder *micb* Exon 2-6 in der Konzentration von 3,2 pmol/µl vorgelegt. Anschließend wurde in jedes PCR-Tube 1 µl DNA-Template bei einer Konzentration von 5 ng/µl, 0,5 µl BigDye-Puffer und 1,75 µl 5-fach Sequenzierungs-Puffer (beides ThermoFisher Scientific), sowie 4,75 µl-steriles H₂O (beides Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Thermocycler für 5 Minuten bei 98°C denaturiert und anschließend in einem Kühlblock (-20°C) heruntertemperiert. Jetzt wurden 1 µl BigDye (ThermoFisher Scientific) hinzu pipettiert und anschließend das in Tabelle (s. Tab. 3) dargestellte Programm im Thermocycler durchlaufen.

Zur Auswertung der Sequenzierung wurde das Gerät 3130xl Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystem® verwendet.

Tab. 3: Programmübersicht des Thermocyclers für die PCR.

Temp. (°C)	98	98	50	60	4
Zeit (min:sek)	1:00	0:20	0:10	4:00	∞
Wiederholung	1x	25 x			Bis Abschalten Gerät

2.13 Aufreinigung der Sequenzierprodukte

Die Aufreinigung der Sequenzierprodukte erfolgte mithilfe des „Sequencing Clean-Up Kit“ der Firma Zymo Research. Es wurde nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll (Vers. 1.0.0) vorgegangen. Zu den Produkten nach der Sequenzier-PCR wurde 240 µl Bindungspuffer hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch in ein zuvor vorbereitetes Sammelgefäß mit einem Zymo-Spin IB Column überführt. Es erfolgte die Zentrifugation für 30 Sekunden mit ca. 10k bis 16k g bei Raumtemperatur. Das Eluat wurde anschließend verworfen und 300 µl Waschpuffer hinzu pipettiert. Es erfolgte erneut die Zentrifugation unter den bereits zuvor beschriebenen Bedingungen. Anschließend wurde das Eluat verworfen. Das Zymo-Spin IB Column wurde nun in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und anschließend 15 µl Formamid zum Lösen des Sequenzierproduktes hinzugegeben. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation unter den bereits zuvor beschriebenen Bedingungen. Das aufgereinigte Sequenzierprodukt befand sich nun in dem Eppendorfgefäß und war für die Sequenzierung bereit.

2.14 Auftragen der Proben in den Sequencer

Die in 2.8 aufgereinigten Sequenzierprodukte wurden in eine 96-Well-Platte (Applied Biosystems) überführt, welche zuvor mit einem Septum (Applied Biosystems) abgedeckt wurde. Anschließend wurde die Platte in den Sequenzierer geladen und das Auslesen der Sequenzierprodukte initiiert.

2.15 Etablierung von *in silico* Modellen

Die *in silico* Modelle wurden anhand der gewonnenen DNA-Sequenzen (s. 2.5 - 2.14), wie bereits vorbekannte T-Zell-Rezeptorsequenzen der einzelnen Probanden erstellt.

2.15.1 T-Zell-Rezeptor

Die verwendeten Sequenzen sind durch wissenschaftliche Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Schilbach identifiziert und bisher noch nicht publiziert worden.

Die Auswahl zu untersuchender V δ 1⁺-T-Zell-Rezeptoren unterschiedlicher Spender erfolgte durch Identifikation der jeweils epitopbindenden Region, der CDR3-Region. Aufgrund des Nachweises von identischen CDR3-Sequenzen von V δ 1⁺-T-Zell-Rezeptoren in den T-Zellpopulationen der Probanden Nr. 1 und 7, sowie 2 und 5 wurden diese zum Vergleich herangezogen, da die Probanden ebenfalls teilweise unterschiedliche MICA-Varianten aufwiesen.

Die Modellierung der spenderindividuellen T-Zell-Rezeptoren erfolgte mit Hilfe des CPHmodels 3.2 Server (s. 2.19) (Nielsen *et al.*, 2010).

2.15.2 MICA

Die Kristallstruktur mit der Bezeichnung, 1HYR (Li *et al.*, 2001), welche die Bindung von MICA (Exon 2-4) in Komplex mit dem Rezeptor NKG2D (s. 2.19) einer natürlichen Killerzelle darstellt, diente als Vorlage für die *in silico* Modellierung spenderindividueller MICA-Proteine. Aus dieser Vorlage wurde der Rezeptor entfernt, sodass nur noch MICA als verbleibender Ligand dargestellt wird. Hier wurde unter zu Hilfenahme des Programms Chimera (s. 2.19) das bisher existierende MICA-Modell an die bereits identifizierte, spenderindividuelle Aminosäuresequenz des Oberflächenproteins adaptiert indem, wenn notwendig, ein Austausch von Aminosäuren in den Exons 2-4 vorgenommen wurde.

Exon 1 von *mica* codiert für ein Signalpeptid bzw. die Signalsequenz, welche ausschließlich Informationen für den Transport des Proteins MICA beinhaltet. Diese Signalsequenz ist am Zielort nicht an der Proteinfunktion beteiligt.

Mica Exon 5 codiert für die Verbindungs-Region (Connecting-Region), die Transmembran-Region (Transmembrane-Region) und einen Teil der intrazytoplasmatischen-Region (Intracytoplasmatic-Region). Im Modell 1HYR (MICA in Komplex mit dem Rezeptor NKG2D) ist der von Exon 5 codierte Proteinabschnitt von MICA nicht an der Ligandenbindung beteiligt. Ein direkter Einfluss aufs Bindungsverhalten ist daher unwahrscheinlich.

Mica Exon 6 weist eine große räumliche Distanz zum T-Zell-Rezeptorbindungsbereich auf und codiert für den restlichen intrazytoplasmatisch gelegenen Teil des Proteins MICA (s. 1.7.1). Aus diesem Grund ist eine direkte Einflussnahme der codierten Aminosäuresequenz von *mica* Exon 1 und Exon 6 auf das Bindungsverhalten nicht anzunehmen.

Aufgrund von Funktionen und Lage *mica* Exon 1 bzw. 6 codierter Proteinsequenzen hat sich das Model 1HYR, das die Proteinanteile von Exon 2 bis 4 umfasst, als geeignet für die Bindungssimulation erwiesen.

2.15.3 Zusammenführen von TCR und MICA in räumliche Nähe

Bei der in 2.15.2 beschriebene Matrize handelt es sich um eine Kristallstruktur, welches ein MICA in Bindung mit dem Rezeptor NKG2D zeigt. Um den TCR und MICA in räumliche Nähe für eine mögliche Bindung zu bringen, wurde der NKG2D-Rezeptor durch den TCR ersetzt. Dies geschah individuell für die jeweilige TCR-Sequenz. Dieser Schritt war nötig, um die in 2.16 durchgeführte Simulation zu ermöglichen.

2.15.4 Identifikation potenzieller Bindungsmöglichkeiten zwischen TCR und MICA anhand der räumlichen Nähe

Für die Identifizierung möglicher Kontaktstellen zwischen TCR und MICA wurde das Programm UCSF Chimera in der Version 1.12 verwendet (Pettersen *et al.*, 2004). Es wurden alle Kontaktstellen zwischen Atomen von TCR und Ligand (MICA) mit einem Van der Waals (VDW) overlap von $\geq -0,4\text{\AA}$ und einer Toleranz von $0,0\text{\AA}$ für potenzielle Wasserstoffbrückenbindungen verwendet. Der overlap ist definiert durch die Summe der VDW radii (r_{VDWi} , r_{VDWj}) abzüglich der Distanz

zwischen beiden Atomen (d_{ij}) und abzüglich der erlaubten Distanz für potenzielle Wasserstoffbrückenbindungen ($allowance_{ij}$):

$$\text{Overlap}_{ij} = r_{VDW_i} + r_{VDW_j} - d_{ij} - allowance_{ij}$$

2.16 Bindungssimulation von T-Zell-Rezeptor und MICA

Für die Bindung wurde das Programm ROSIE RosettaDock, „docking2“ verwendet (Chaudhury *et al.*, 2011; Lyskov *et al.*, 2013; Lyskov and Gray, 2008). Hierbei handelt es sich um einen Algorithmus, welcher Rezeptor und Ligand um maximal ca. 3 Å zueinander hin und voneinander weg, 8 Å gegeneinander verschiebt und um 8° verkippen können. Ebenfalls ist eine komplette 360° Drehung um das Zentrum der zwei Proteine möglich. Es werden insgesamt ca. 1000 zufällige Bindungsmodelle erstellt.

2.17 Modellauswahlverfahren für detaillierte Auswertung der Bindungssimulation

Da wie bereits beschrieben (s. 2.16) ca. 1000 potenzielle Modelle durch begrenzte, zufällige Bewegungen im Raum pro Rezeptor-Liganden-Interaktion berechnet werden, befindet sich das Modell, welches der Realität am nächsten kommt, vermutlich weder im Bereich des besten I_sc-Scores (je kleiner desto besser) noch des schlechtesten.

Die I_sc-Werte wurden der Größe nach sortiert und anschließend der Median bestimmt. Jedem I_sc-Wert kann nur ein einziges Modell zugeordnet werden. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf das Modell für die weitere Auswertung genutzt, welches dem Median (I_sc-Wert) eindeutig zugeordnet werden konnte. Anhand dieses Modells wurden die potenziellen Interaktionsmöglichkeiten zwischen den einzelnen Aminosäuren identifiziert (s. Abb. 5).

Konnte kein eindeutiger Median ermittelt werden (gerade Gesamtzahl an erzeugten Modellen), wurde sowohl das Modell oberhalb (Obermedian), wie auch unterhalb (Untermedian) des theoretisch bestimmten Medians herangezogen (s. Abb. 6).

Zur Erläuterung der oben genannten Vorgehensweise ein hypothetisches Beispiel:

- Sind insgesamt 9 Modelle (ungerade Anzahl) erzeugt worden, gibt es insgesamt 9 I_{sc} -Werte (Z.b. -1, -2, -3, [...], -9). Hier würde bei nach Größe sortierten I_{sc} -Werten der Median bei „-5“ liegen. Dem I_{sc} -Wert „-5“ kann beispielsweise das erzeugte Modell Nr. 1 spezifisch zugeordnet werden. Dieses Modell wird für das weitere Vorgehen herangezogen (s. Abb. 5).
- Sind insgesamt 10 Modelle (gerade Anzahl) erzeugt worden, gibt es insgesamt 10 I_{sc} -Werte (Z.b. -1, -2, -3, [...], -10). Hier würde bei nach Größe sortierten I_{sc} -Werten der Median zwischen „-5“ und „-6“ liegen. Damit bildet der Wert „-6“ den so genannten Untermedian und „-5“ den Obermedian. Bei diesen Voraussetzungen würde der Median normalerweise aus dem arithmetischen Mittel von Unter- und Obermedian gebildet. In diesem Fall würde der Median theoretisch bei „-5,5“ liegen. Da dieses Vorgehen in unserem Fall nicht praktikabel ist (da dem theoretischen I_{sc} -Wert von „-5,5“ ist kein Modell zugeordnet ist) wurden die Modelle genutzt, die den I_{sc} -Werten „-5“ (Obermedian) und „-6“ (Untermedian) zugeordnet sind. Dem I_{sc} -Wert „-5“ kann beispielsweise das erzeugte Modell Nr. 9 und dem I_{sc} -Wert „-6“ das erzeugte Modell Nr. 4 spezifisch zugeordnet werden. Schlussfolgernd werden Modell-Nr. „4“ und „9“ für die weitere Auswertung herangezogen (s. Abb. 6).

Abb. 5: Modellauswahl für die weitere Auswertung bei einer ungeraden Gesamtzahl von erzeugten Rezeptor-Liganden-Modellen.

Die Auswahl erfolgte in 2 Schritten. Zunächst wurden die Rohdaten nach I_sc-Wert aufsteigend sortiert. Anschließend wurde der Median anhand der neu sortierten I_sc-Werte bestimmt. In diesem Beispiel wird der Median bei dem I_sc-Wert von -5 bestimmt. Diesem Wert kann das Modell mit der Nummer 1 zugeordnet werden.

Daten unsortiert		Daten nach I_sc sortiert		Bestimmung Median	
I_sc	Modell-Nr.	I_sc	Modell-Nr.	I_sc	Modell-Nr.
-5	1	-9	6	-9	6
-6	4	-8	3	-8	3
-9	6	-7	8	-7	8
-8	3	-6	4	-6	4
-4	9	-5	1	-5	1
-2	7	-4	9	-4	9
-1	2	-3	5	-3	5
-3	5	-2	7	-2	7
-7	8	-1	2	-1	2

Abb. 6: Modellauswahl für die weitere Auswertung bei einer geraden Gesamtzahl von erzeugten Rezeptor-Liganden-Modellen.

Die Auswahl erfolgte in 2 Schritten. Zunächst wurden die Rohdaten nach I_sc-Wert aufsteigend sortiert. Anschließend wurde der Median anhand der neu sortierten I_sc-Werte bestimmt. In diesem Beispiel wird der Untermedian bei dem I_sc-Wert von -6 und der Obermedian bei -6 bestimmt. Diesen Werten kann das Modell mit der Nummer 4 und 9 zugeordnet werden.

Daten unsortiert		Daten nach I_sc sortiert		Bestimmung Median	
I_sc	Modell-Nr.	I_sc	Modell-Nr.	I_sc	Modell-Nr.
-9	3	-10	7	-10	7
-3	5	-9	3	-9	3
-4	1	-8	6	-8	6
-8	6	-7	10	-7	10
-5	9	-6	4	-6	4
-10	7	-5	9	-5	9
-1	2	-4	1	-4	1
-7	10	-3	5	-3	5
-6	4	-2	8	-2	8
-2	8	-1	2	-1	2

2.18 Verwendete statistische Tests

Die statistische Beratung erfolgte durch das Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie. Aufbauend auf dieser Beratung wurde zur

statistischen Auswertung der Shapiro-W-Wilk-Test zur Prüfung der I_{sc} -Werte auf Normalverteilung genutzt (nähere Erläuterung s. 2.18.1).

Zur Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede der freiwerdenden Energien durch die Bindung von Rezeptor und Ligand zwischen den Probanden wurde der Wilcoxon-Test als nichtparametrisches Testverfahren verwendet (nähere Erläuterung s. 2.18.2).

Zusätzlich wurden zur Auswertung der Median, Schiefe und Kurtosis als statistische Marker herangezogen. Eine optische Auswertung der Daten erfolgte mittels Histogrammen mit Normalverteilungskurve, Box-Plots nach explorativer Datenanalyse (EDA) und Q-Q-Diagramme (s. 2.18.1).

2.18.1 Normalverteilungsprüfung

Die Prüfung auf normalverteilte Werte kann unter anderem durch eine Sichtkontrolle mit Hilfe von grafischen Methoden wie Histogramm, Boxplots und Q-Q-Plots erfolgen. Die Einordnung und Interpretation dieser Ergebnisse sind vom Untersucher abhängig, da es keine genauen Zahlenwerte gibt, die eine Bestätigung oder Ablehnung einer Normalverteilung bei diesen Untersuchungsmethoden ermöglichen. Sie dient der ersten Einschätzung der Datenwerte. Die numerische/analytische Prüfung erfolgte unter anderem anhand von Schiefe und Kurtosis (Wölbung), sowie spezifischen Tests zur Prüfung auf Normalverteilung wie z.B. dem Shapiro-Wilk-Test, der im Vergleich zu anderen Test wie dem Kolmogorov-Smirnov-Test, Lilliefors-Test und Anderson-Darling-Test die größte Testpower aufweist (Mohd Razali and Yap, 2011; Yap and Sim, 2011).

Die Schiefe gibt dabei das Ausmaß an, wie weit die Symmetrie der Daten von einer Normalverteilung abweicht. Ein Wert von „0“ stellt den Idealwert dar, die Symmetrie wäre exakt einer Normalverteilungskurve gleich. Positive Werte geben die Tendenz zu einer linkssteilen- oder rechtsschiefen-Verteilung an und negative Werte sprechen für eine rechtssteile- oder linksschiefe-Verteilung.

Ähnlich verhält es sich mit der Kurtosis. Sie zeigt an, ob eine Datenmenge normalgipflig, flachgipflig oder steilgipflig verteilt ist. Auch hier gibt der Wert „0“

an, dass kein Unterschied zu einer Gauß-Kurve besteht. Ein Wert >0 zeigt einen flachen und Werte <0 einen spitzen Verlauf der Verteilung an.

Allerdings handelt es sich bei Schiefe und Kurtosis ebenfalls um Werte, die in Zusammenschau mit der grafischen Auswertung das Vorliegen einer Normalverteilung be- oder entkräften kann.

Zur weiteren Überprüfung auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-W-Test genutzt. Dabei handelt es sich um ein statistischen Signifikanztest, der prüft, ob eine Gaußsche Normalverteilung bei der zu prüfenden Grundgesamtheit einer Stichprobe vorliegt. Die Nullhypothese (H_0) besagt bei diesem Test, dass die Daten normalverteilt sind, also eine Gaußsche Normalverteilung vorliegt. Dem gegenüber steht die Alternativhypothese (H_1), die aussagt, dass keine Normalverteilung gegeben ist.

Die Variable „ $<W$ “ entspricht dabei dem Signifikanzniveau „ α “ und wurde auf 5% festgelegt ($<W = \alpha = <0,05$). Beträgt nun das Ergebnis $<W$ eines Shapiro-Wilk-W-Test bei einer vorliegenden Datenmenge einen Wert von $\geq 0,05$ kann H_0 nicht abgelehnt werden. Bei Werten $<0,05$ sollte die Nullhypothese verworfen und stattdessen die Alternativhypothese angenommen werden.

2.18.2 Prüfverfahren auf statistisch signifikante Unterschiede

Für die Testung auf statistisch signifikante Unterschiede im Energieniveau wird aufgrund der in 3.6.7 erläuterten Gründe der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Kurzform: Wilcoxon-Test) verwendet. Dieser testet auf Unterschiede zentraler Tendenzen zweier abhängiger Stichproben. Dies setzt voraus, dass man von einer gepaarten Stichprobe ausgehen kann, was aufgrund der verwendeten, identischen T-Zell-Rezeptor-Sequenz der Fall ist. Die Nullhypothese H_0 besagt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den getesteten Variablen vorliegt. Die Alternativhypothese H_1 besagt, dass ein signifikanter Unterschied vorhanden ist.

2.19 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Als Textverarbeitungsprogramm wurde Microsoft® Word® 2016, zum Erstellen von Tabellen und Diagrammen Microsoft® Excel® 2016 (Fa. Microsoft

Deutschland GmbH, Stuttgart, Deutschland) verwendet. Zum Zitieren wurde das Programm Citavi® in der Version 6 genutzt (Fa. Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz). Des Weiteren wurde zum Erstellen oder Bearbeiten von Grafiken Microsoft® Powerpoint® 2016 genutzt (Fa. Microsoft Deutschland GmbH, Stuttgart, Deutschland).

Die fotografische Darstellung und Auswertung der Agarosegele (s. 2.9) erfolgte durch das Programm Image Studio in der Version 4.0.21 der Firma Li-Cor verwendet (Lincoln, Nebraska, USA).

Die quantitative und qualitative Auswertung der isolierten gDNA erfolgte mit dem Programm NanoDrop 2000 Version 1.6 (ThermoFisher Scientific).

Die Visualisierung und manuelle Qualitätskontrolle der Sequenzierungen erfolgte durch das Programm Chromas der Version 2.6 (Fa. Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia).

Für die grafische Darstellung und Modellierung der 3D-Modelle wurde das Programm UCSF Chimera, Version 1.11 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, University of California, San Francisco, United States of America) genutzt.

Zum Erstellen der spezifischen T-Zell-Rezeptoren anhand von Sequenzen wurde der CPHmodels 3.2 Server (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, Lyngby, Dänemark) genutzt.

Zur Auswertung und Qualitätskontrolle der Sequenzierung wurde das Programm 3130xl Genetic Analyzer Data Collection Version 3.0 und Sequencing Analysis 5.3 (beide Applied Biosystems®) verwendet.

Für die Basen- und Aminosäuresequenz, sowie unterschiedlichen Varianten von MICA und MICB wurde die Datenbank des European Bioinformatics Institute als Teil der European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) genutzt (Robinson *et al.*, 2015).

Das Designen der Primer erfolgte mit Hilfe des Programms Primer-Blast (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, United States of America) (Ye *et al.*, 2012).

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms JMP der Firma SAS Institute in den Versionen 13.x und 14.x (Cary, North Carolina, USA).

Die Bindungssimulation erfolgte mit Hilfe des Berechnungsalgorithmus „docking2“ von ROSIE Rosetta (Chaudhury *et al.*, 2007; Daily *et al.*, 2005; Gray, Moughon and Kortemme *et al.*, 2003; Gray, Moughon and Wang *et al.*, 2003; Sivasubramanian *et al.*, 2006; Sivasubramanian, Maynard and Gray, 2008; Wang, Schueler-Furman and Baker, 2005).

3 Ergebnis

3.1 Identifikation von SNPs der genomischen DNA aller Probanden von MICA Exon 2 bis 6

Die Auswertung der Ergebnisse der Sequenzierung von *mica* Exon 2 bis 6 erfolgte anhand der Datenbank des European Bioinformatics Institute als Teil der European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) mit dem Stand vom 18.01.2017.

So waren bis zum Untersuchungszeitpunkt bereits 13 SNPs im Exon 2, 23 SNPs im Exon 3, 26 SNPs im Exon 4, 10 SNPs im Exon 5 und 6 SNPs im Exon 6 identifiziert und dokumentiert worden (Robinson *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2013; Robinson *et al.*, 2015).

Als Referenzvariante galt MICA*001. Alle SNPs wurden anhand dieser Variante abgeleitet. Exemplarisch wurden im Folgenden die SNPs des Probanden Nr.01 beschrieben. Die SNPs aller Probanden wurden grafisch anhand eines multiplen Alignments dargestellt (s. Abb. 15 bis Abb. 43).

3.1.1 *mica* Exon 2

Durch die Untersuchung der Sequenzen von Proband Nr. 01 wurden 4 SNPs an den Stellen 14 (s. Abb. 15), 24 (s. Abb. 16), 56 und 64 (s. Abb. 19) festgestellt. Dabei ist anzumerken, dass es sich um biallelische Stellen handelt, da die gesamte DNA isoliert wurde und genomische Loci damit immer als biallelisch betrachtet werden müssen. Das heißt, dass sowohl die Sequenz wie in Variante MICA*001 beschrieben, als auch der beschriebene Basenaustausch vorhanden waren. An Position 14 konnte sowohl das Basentriplett TGG, wie auch GGG nachgewiesen werden. Dadurch kommt es zu einer Änderung der Aminosäure von einem Tryptophan (W) zu einem Glycin (G) und daraus folgend zu einer Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaft von einer unpolaren bzw. hydrophoben zu einer polaren bzw. neutral geladenen Aminosäure. An Position 24 konnte sowohl die Basenabfolge ACT, codierend für ein Threonin (T), wie auch GCT, codierend für ein Alanin (A) festgestellt werden. Hier kommt es wie an Position 14 ebenfalls zu einer Änderung der Aminosäureeigenschaften,

allerdings von einer polaren bzw. neutral geladenen zu einer unpolaren bzw. hydrophoben Aminosäure. An Position 56 und 64 konnte eine Veränderung der Basenabfolge AAT zu AAC (s. Abb. 7), bzw. AGA zu AGG identifiziert werden, allerdings kommt es zu keiner Änderung der codierenden Aminosäure. So codieren beide Sequenzabfolgen an Position 56 für die Aminosäure Asparagin (N) bzw. Arginin (R) an Position 64.

In Tab. 4 sind die in der individuellen Gensequenz der Probanden detektierten SNPs für *mica* Exon 2 tabellarisch aufgelistet.

Als Besonderheit ist noch anzumerken, dass es im Exon 1 an Position 1 einen SNP gibt, der *mica* Exon 1 und 2 überspannt. Da Exon 1 als Signalpeptid im Rahmen dieser Arbeit nicht sequenziert wurde, ist über ein Vorhandensein, beziehungsweise Nichtvorhandensein bei den Probanden keine Aussage möglich.

Ergebnis

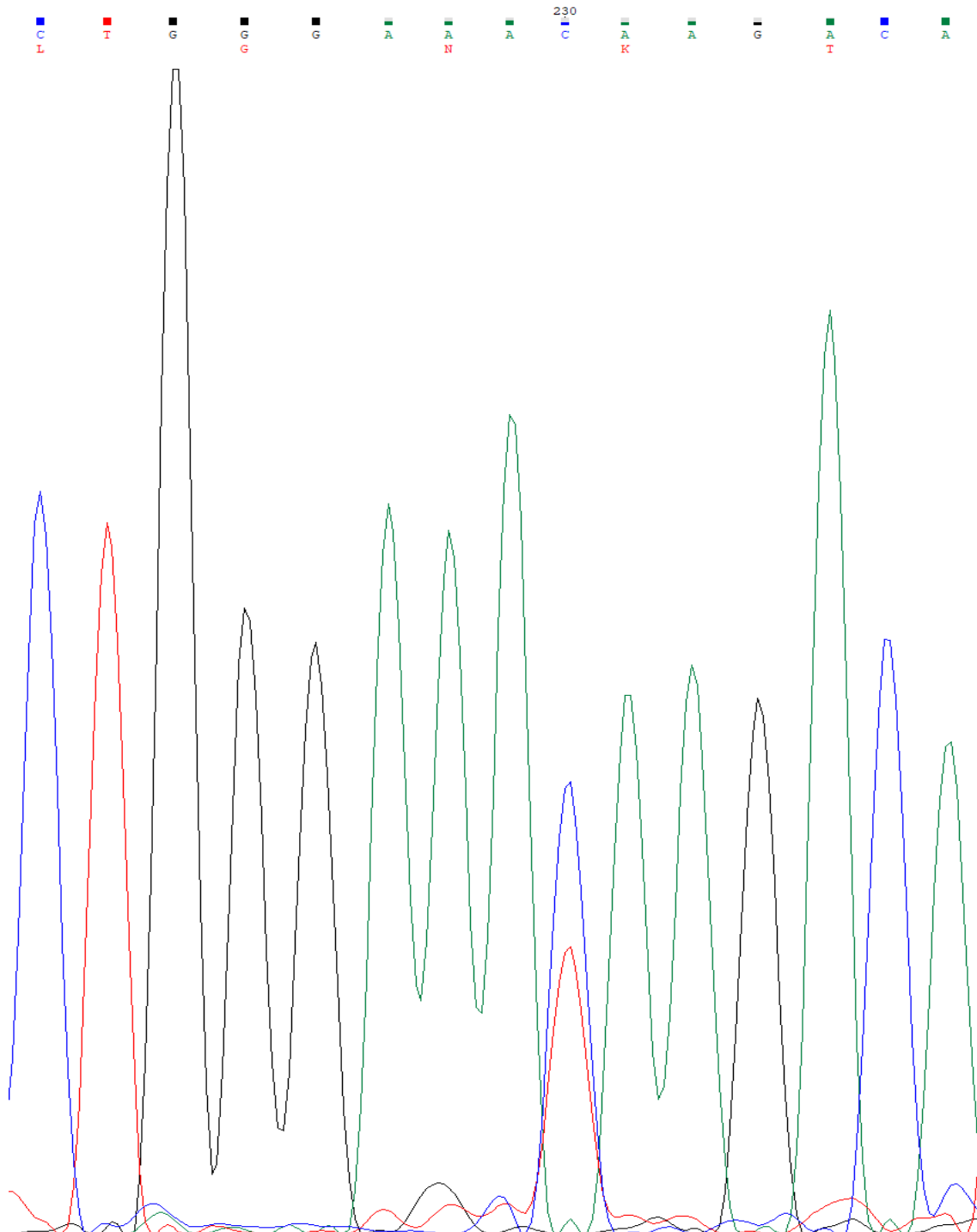


Abb. 7: Grafische Darstellung des Chromatogramms von *mica* Exon 2 Position 54-58 des Probanden Nr. 01.

An Aminosäureposition 56 findet man an im dazugehörigen Basentriplet, genauer an der 3. Position des Basentriplets ein Signal für die Base Cytosin (Basenabfolge: „AAC“), wie auch Thymin (Basenabfolge: „AAT“).

Ergebnis

Tab. 4: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von *mica* Exon 2.

Eine vorhandene Variante ist in Grün dargestellt. Ist die Variante bei dem Probanden nicht vorhanden, wird dies in Rot dargestellt. „BA“ steht für „biallelisch und zeigt an, dass der jeweilige Proband an dieser Stelle beide Sequenzen aufweist. Ein „=“ gibt an, dass es zu keiner Veränderung der ursprünglichen Aminosäure kommt. Das „?“ zeigt in diesem speziellen Fall an, dass eine genaue Aussage aufgrund des überspannen des SNP von Exon 1 und Exon 2 nicht möglich ist (Erläuterung s. 3.1.1).

MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09
A	2	1	GAG	GAA	Glu(E)	=									
A	2	1	GAG	-AG	Glu(E)	Deletion	?	?	?	?	?	?	?	?	?
A	2	6	CGT	CGC	Arg(R)	=									
A	2	6	CGT	CCT	Arg(R)	Pro(P)									
A	2	14	TGG	GGG	Trp(W)	Gly(G)	BA				BA				BA
A	2	14	TGG	CGG	Trp(W)	Arg(R)									
A	2	23	CTC	CTT	Leu(L)	=		BA			BA		BA	BA	BA
A	2	24	ACT	GCT	Thr(T)	Ala(A)	BA						BA	BA	
A	2	26	GTA	GGA	Val(V)	Gly(G)									
A	2	36	TGT	TAT	Cys(C)	Tyr(Y)		BA			BA		BA	BA	BA
A	2	38	AGG	AGC	Arg(R)	Ser(S)									
A	2	39	CAG	TAG	Gln(Q)	STOP									
A	2	55	GGA	GGG	Gly(G)	=									
A	2	56	AAT	AAC	Asn(N)	=	BA								
A	2	64	AGA	AGG	Arg(R)	=	BA						BA	BA	
A	2	69	AAC	AAT	Asn(N)	=									
MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09

3.1.2 *mica* Exon 3

Bei der Sequenzierung von *mica* Exon 3 des Probanden Nr.01 fanden sich 2 SNPs im Vergleich zur Variante*001. Das betrifft die Positionen 125 (s. Abb. 24) und 156 (s. Abb. 27) in der publizierten Referenz-Nukleotidsequenz für *mica* Exon 3. An der Stelle 125 findet sich eine Änderung der Basenabfolge von AAG zu GAG, was einen Aminosäureaustausch von Lys(K) zu Glutamat(E) zur Folge hat und daraus resultierend zu einem Austausch von einer basischen zu einer sauren Aminosäure führt. An Position 156 ist sowohl die Basenabfolge CAC, wie auch CTC zu finden. Aufgrund der unterschiedlichen Basentriplets an Position 156 wird sowohl für Histidin(H), wie auch Leucin(L) und damit für eine basische und unpolare bzw. hydrophobe Aminosäure codiert.

In Tab. 5 sind die in der individuellen Gensequenz der Probanden detektierten SNPs für *mica* Exon 3 tabellarisch aufgelistet.

Ergebnis

Tab. 5: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von *mica* Exon 3.

Eine vorhandene Variante ist in Grün dargestellt. Ist die Variante bei dem Probanden nicht vorhanden, wird dies in Rot dargestellt. „BA“ steht für „biallelisch und zeigt an, dass der jeweilige Proband an dieser Stelle beide Sequenzen aufweist. Ein „=“ gibt an, dass es zu keiner Veränderung der ursprünglichen Aminosäure kommt.

MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09
A	3	86	GGC	GGT	Gly(G)	=									
A	3	90	CTC	TTC	Leu(L)	Phe(F)									
A	3	91	CAG	CGG	Gln(Q)	Arg(R)					BA				BA
A	3	93	ATT	ATG	Ile(I)	Met(M)									
A	3	102	AAC	AGC	Asn(N)	Ser(S)									
A	3	105	AGG	AAG	Arg(R)	Lys(K)									
A	3	112	TAC	TAT	Tyr(Y)	=									
A	3	114	GGG	AGG	Gly(G)	Arg(R)									
A	3	122	CTG	GTG	Leu(L)	Val(V)						BA	BA		
A	3	124	ACT	TCT	Thr(T)	Ser(S)									
A	3	125	AAG	GAG	Lys(K)	Glu(E)									
A	3	129	ATG	GTG	Met(M)	Val(V)		BA				BA		BA	BA
A	3	130	CCC	TCC	Pro(P)	Ser(S)									
A	3	139	GCC	GCA	Ala(A)	=									
A	3	142	GTC	ATC	Val(V)	Ile(I)									
A	3	151	ATG	GTG	Met(M)	Val(V)									
A	3	156	CAC	CTC	His(H)	Leu(L)	BA								
A	3	156	CAC	CGC	His(H)	Arg(R)									

Ergebnis

MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09
A	3	169	CGG	TGG	Arg(R)	Trp(W)									
A	3	173	AAA	GAA	Lys(K)	Glu(E)		BA			BA		BA	BA	BA
A	3	174	TCC	TCT	Ser(S)	=									
A	3	175	GGC	AGC	Gly(G)	Ser(S)						BA	BA		
A	3	175	GGC	GGT	Gly(G)	=									
A	3	176	GTA	ATA	Val(V)	Ile(I)									
A	3	181	ACA	AGA	Thr(T)	Arg(R)						BA			
MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09

3.1.3 *mica* Exon 4

Die Sequenz von *mica* Exon 4 des Probanden Nr. 1 stimmte an den untersuchten Stellen exakt mit der Variante MICA*001 überein.

In Tab. 6 sind die in der individuellen Gensequenz der Probanden detektierten SNPs für *mica* Exon 4 tabellarisch aufgelistet.

Ergebnis

Tab. 6: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von *mica* Exon 4.

Eine vorhandene Variante ist in Grün dargestellt. Ist die Variante bei dem Probanden nicht vorhanden, wird dies in Rot dargestellt. „BA“ steht für „biallelisch und zeigt an, dass der jeweilige Proband an dieser Stelle beide Sequenzen aufweist. Ein „=“ gibt an, dass es zu keiner Veränderung der ursprünglichen Aminosäure kommt.

MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09
A	4	190	CGC	TGC	Arg(R)	Cys(C)									
A	4	191	AGC	AGT	Ser(S)	=		BA							
A	4	193	GCC	GCA	Ala(A)	=									
A	4	198	ATT	ATC	Ile(I)	=		BA			BA		BA	BA	BA
A	4	205	TCT	TCC	Ser(S)	=		BA			BA		BA	BA	BA
A	4	206	GGC	AGC	Gly(G)	Ser(S)		BA			BA		BA	BA	BA
A	4	208	TAT	TGT	Tyr(Y)	Cys(C)									
A	4	210	TGG	CGG	Trp(W)	Arg(R)		BA			BA		BA	BA	BA
A	4	213	ACA	ATA	Thr(T)	Ile(I)		BA			BA	BA		BA	BA
A	4	215	AGC	ACC	Ser(S)	Thr(T)		BA			BA		BA	BA	BA
A	4	221	GTA	CTA	Val(V)	Leu(L)									
A	4	230	TGG	TCG	Trp(W)	Ser(S)									
A	4	244	TGG	TGA	Trp(W)	STOP									
A	4	245	GTG	GCG	Val(V)	Ala(A)									
A	4	247	ACC	ACT	Thr(T)	=									
A	4	250	TGC	CGC	Cys(C)	Arg(R)									
A	4	251	CAA	GAA	Gln(Q)	Glu(E)									
A	4	251	CAA	CGA	Gln(Q)	Arg(R)		BA			BA	BA		BA	BA

Ergebnis

MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09
A	4	253	GAG	AAG	Glu(E)	Lys(K)									
A	4	254	GAG	GCG	Glu(E)	Ala(A)									
A	4	255	CAG	CAA	Gln(Q)	=									
A	4	256	AGG	AAG	Arg(R)	Lys(K)									
A	4	256	AGG	AGT	Arg(R)	Ser(S)									
A	4	265	GGG	AGG	Gly(G)	Arg(R)									
A	4	268	AGC	GGC	Ser(S)	Gly(G)									
A	4	269	ACT	ATT	Thr(T)	Ile(I)									
A	4	271	CCT	GCT	Pro(P)	Ala(A)									
A	4	275	S. MICA*001	Deletion	S.MICA*001	Frameshift					BA				BA
MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09

3.1.4 *mica* Exon 5

Bei der Sequenz *mica* Exon 5 ist zunächst auf einige Besonderheiten hinzuweisen. Hier ist es möglich, dass man an der Position 295 die Insertion der Base Guanin feststellt. In der Folge kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters und damit einer Änderung der nachfolgend codierten Aminosäuren kommt. An der Insertionsstelle wird aus einem GCT ein GGC(T), was eine Änderung der codierten Aminosäure von Alanin (A) zu Glycin (G) nach sich zieht. Bei der Analyse des Probanden Nr. 01 zeigte sich keine Insertion an dieser Stelle. Ebenfalls findet man ab der Position 297 (s. Abb. 37) eine Besonderheit. Hier kann es zur Insertion eines oder mehrerer GCT-Repeats kommen, welche für die Aminosäure Alanin (A) codieren. Bisher bekannt ist eine maximale Wiederholungsfrequenz in Höhe von sechs GCT-Repeats. Hierbei kommt es allerdings zu keiner Verschiebung des Leserasters. Im Fall von Proband Nr. 01 findet sich sowohl eine Sequenz ohne Insertion von GCT, wie auch eine Sequenz mit fünf Repeats, also eine fünfmalige Insertion der Aminosäure Alanin(A) im Vergleich zur beschriebenen MICA Variante*001.

Ergebnis

Zudem weist der bisher beschriebene Proband eine biallelische Sequenz an Position 304 und 306 (s. Abb. 38) auf. An der Position 304 ist sowohl das Basentriplett TAT, wie auch TAC zu finden. Aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes codieren beide Basentriplets für die gleiche Aminosäure Tyrosin(Y).

Ein anderes Bild zeigt sich an der Position 306. Hier kann das Basentriplett CGT, wie auch TGT nachgewiesen werden. Es kommt zu einer Kodierung der Aminosäuren Arginin(R) oder auch Cystein(C), also einer basischen und damit polaren bzw. neutral geladenen Aminosäure.

In Tab. 7 sind die in der individuellen Gensequenz der Probanden detektierten SNPs für *mica* Exon 5 tabellarisch aufgelistet.

Tab. 7: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von *mica* Exon 5.

Eine vorhandene Variante ist in Grün dargestellt. Ist die Variante bei dem Probanden nicht vorhanden, wird dies in Rot dargestellt. „BA“ steht für „biallelisch und zeigt an, dass der jeweilige Proband an dieser Stelle beide Sequenzen aufweist. An Position 295 bedeutet „-“, dass keine Insertion vorliegt, „+“, dass sie vorhanden ist. Ein „=“ gibt an, dass es zu keiner Veränderung der ursprünglichen Aminosäure kommt. Die Zahlen an Position 297 geben an, wie viele Repeats vorliegen. Dabei weist der „/“ auf Biallelität hin. Die Spalten sind von oben nach unten zu lesen. So ergibt sich beispielsweise bei Proband Nr. 02 eine Sequenz ohne Insertion und ohne Repeat und eine Sequenz mit Insertion und einem Repeat.

MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09
A	5	275-318	S. MICA*001	Deletion	S.MICA*001	Deletion									
A	5	288	CAT	CAC	His(H)	=									
A	5	295	GCT	G <u>G</u> GCT (Insert.)	Ala(A)	Gly(G) - Frameshift	-/-	-/+	-	-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+
A	5	Ab 297	S. MICA*001	GCT (Repeat)	S. MICA*001	Repeats (x-fach)	0/5	0/1	5	5	5/1	2/1	0/2	0/1	5/1
A	5	304	TAT	TAC	Tyr(Y)	=	BA				BA				BA
A	5	305	GTC	ATC	Val(V)	Ile(I)									
A	5	306	CGT	TGT	Arg(R)	Cys (C)	BA				BA				BA
A	5	309-318	S. MICA*001	Deletion	S.MICA*001	Deletion									
A	5	316-318	S. MICA*001	Deletion	S.MICA*001	Deletion									
A	5	316	GAG	GAT	Glu(E)	Asp(D)									
MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09

3.1.5 *mica* Exon 6

Bei der Sequenz von *mica* Exon 6 fand sich wie bei *mica* Exon 4 keine Abweichung der Basenabfolge in Vergleich mit der Variante MICA*001 bei Proband Nr. 01.

In Tab. 8 sind die in der individuellen Gensequenz der Probanden detektierten SNPs für *mica* Exon 6 tabellarisch aufgelistet.

Tab. 8: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von *mica* Exon 6.

Eine vorhandene Variante ist in Grün dargestellt. Ist die Variante bei dem Probanden nicht vorhanden, wird dies in Rot dargestellt. „BA“ steht für „biallelisch und zeigt an, dass der jeweilige Proband an dieser Stelle beide Sequenzen aufweist. Ein „=“ gibt an, dass es zu keiner Veränderung der ursprünglichen Aminosäure kommt.

MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09
A	6	319-361	S. MICA*001	Deletion	S.MICA*001	Deletion									
A	6	333	ACG	ATG	Thr(T)	Met(M)									
A	6	350	GAT	GCT	Asp(D)	Ala(A)		BA			BA		BA	BA	BA
A	6	354	ACT	GCT	Thr(T)	Ala(A)									
A	6	359	GGC	GGT	Gly(Y)	=									
A	6	360	GCC	ACC	Ala(A)	Thr(T)		BA			BA	BA	BA		BA
MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09

3.1.6 Gesamtübersicht der Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *mica* Exon 2-6.

Die grafische Gesamtübersicht der Basen- bzw. Aminosäuresequenz für *mica* Exon 2-6 aller Probanden ist aus den Abbildungen (Abb. 15 bis Abb. 43) des Anhangs zu entnehmen.

3.2 Identifikation von SNPs der genomischen DNA aller Probanden von *micb* Exon 2 bis 6

Wie schon bei *mica* (s. 3.1) erfolgte die Auswertung der Ergebnisse von *micb* Exon 2 bis 6 äquivalent anhand der Datenbank des European Bioinformatics Institute als Teil der European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI) mit dem Stand vom 18.01.2017.

So waren bis zum Untersuchungszeitpunkt bereits 11 SNPs im Exon 2, 5 SNPs im Exon 3, 11 SNPs im Exon 4, 2 SNPs im Exon 5 und 3 SNPs im Exon 6 identifiziert und dokumentiert worden (Robinson *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2013; Robinson *et al.*, 2015).

Als Referenzvariante galt in diesem Fall MICB*001 und alle SNPs wurden anhand dieser Variante abgeleitet. Exemplarisch wurden wie analog zur Auswertung von MICA (s. 3.1) die SNPs des Probanden Nr.01 beschrieben und die SNPs der anderen Probanden anhand eines multiplen Alignment grafisch dargestellt (s. Abb. 44 bis Abb. 71).

3.2.1 *micb* Exon 2

Bei Proband Nr. 01 findet sich an der Position 16 eine Änderung der Basensequenz von GAA zu GGA. Dies hat einen Aminosäureaustausch vom sauren Glutamat(E) zum polar oder neutral geladenen Glycin(G) zur Folge. An Position 52 weist der Proband eine Biallelität auf. Hier findet sich sowohl das Basentriplett GAT, wie auch AAT. In Folge kommt es zu einer Kodierung der Aminosäuren Asparaginsäure(D), wie auch polar/neutral geladenen Asparagin (N).

In Tab. 9 sind die in der individuellen Gensequenz der Probanden detektierten SNPs für *micb* Exon 2 tabellarisch aufgelistet.

Tab. 9: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von *micb* Exon 2.

Eine vorhandene Variante ist in Grün dargestellt. Ist die Variante bei dem Probanden nicht vorhanden, wird dies in Rot dargestellt. „BA“ steht für „biallelisch und zeigt an, dass der jeweilige Proband an dieser Stelle beide Sequenzen aufweist. Ein „=“ gibt an, dass es zu keiner Veränderung der ursprünglichen Aminosäure kommt.

MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09
B	2	6	CGT	CAT	Arg(R)	His(H)									
B	2	16	GAA	GGA	Glu(E)	Gly(G)									
B	2	32	CCC	TCC	Pro(P)	Ser(S)									
B	2	41	CGC	TGC	Arg(R)	Cys(C)									
B	2	44	AAG	AAA	Lys(K)	=									
B	2	45	CCC	CAC	Pro(P)	His(H)									
B	2	52	GAT	AAT	Asp(D)	Asn(N)	BA			BA		BA			
B	2	57	AAG	GAG	Lys(K)	Glu(E)			BA				BA		BA
B	2	65	GAC	GGC	Asp(D)	Gly(G)									
B	2	78	ACT	ACC	Thr(T)	=									
B	2	82	GAC	GGC	Asp(D)	Gly(G)									
MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09

3.2.2 *micb* Exon 3

Bei der Sequenz von *micb* Exon 3 findet sich keine Abweichung der Basenabfolge im Vergleich mit der Variante MICB*001 bei Proband Nr. 01.

In Tab. 10 sind die in der individuellen Gensequenz der Probanden detektierten SNPs für *micb* Exon 3 tabellarisch aufgelistet.

Tab. 10: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von *micb* Exon 3.

Eine vorhandene Variante ist in Grün dargestellt. Ist die Variante bei dem Probanden nicht vorhanden, wird dies in Rot dargestellt. „BA“ steht für „biallelisch und zeigt an, dass der jeweilige Proband an dieser Stelle beide Sequenzen aufweist.

MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09	
B	3	98	ATC	ATG	Ile(I)	Met(M)										BA
B	3	102	AGC	AGA	Ser(S)	Arg(R)										
B	3	113	GAT	AAT	Asp(D)	Asn(N)			BA					BA		BA
B	3	147	AAG	GAG	Lys(K)	Glu(E)										
B	3	170	CGA	TGA	Arg(R)	STOP										

3.2.3 *micb* Exon 4

Bei der Sequenz von *micb* Exon 4 findet sich wie bei Exon 3 keine Abweichung der Basenabfolge in Vergleich mit der Variante MICB*001 bei Proband Nr. 01.

In Tab. 11 sind die in der individuellen Gensequenz der Probanden detektierten SNPs für *micb* Exon 4 tabellarisch aufgelistet.

Tab. 11: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von *micb* Exon 4.

Eine vorhandene Variante ist in Grün dargestellt. Ist die Variante bei dem Probanden nicht vorhanden, wird dies in Rot dargestellt. „BA“ steht für „biallelisch und zeigt an, dass der jeweilige Proband an dieser Stelle beide Sequenzen aufweist. Ein „=“ gibt an, dass es zu keiner Veränderung der ursprünglichen Aminosäure kommt.

MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09
B	4	189	ACC	ATC	Thr(T)	Ile(I)					BA				BA
B	4	192	GAG	AAG	Glu(E)	Lys(K)									
B	4	210	CGG	CGA	Arg(R)	=									
B	4	221	GTA	TTA	Val(V)	Leu(L)									
B	4	231	GGG	GGT	Gly(G)	=									
B	4	243	ACC	ACG	Thr(T)	=									
B	4	253	GAG	AAG	Glu(E)	Lys(K)									
B	4	256	AGG	AAG	Arg(R)	Lys(K)									
B	4	265	GGG	AGG	Gly(G)	Arg(R)									
B	4	267	CAC	CAT	His(H)	=									
B	4	268	GGC	AGC	Gly(G)	Ser(S)									
MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09

3.2.4 *micb* Exon 5

An der Position 277 (s. Abb. 65) weist der Proband Nr. 01 eine Änderung der Basenabfolge von GTG zu GCG auf. Dies bewirkt einen Aminosäureaustausch von Valin(V) zu Alanin(A). Hier kommt es zu keiner Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaft des Proteins durch den Aminosäureaustausch.

In Tab. 12 sind die in der individuellen Gensequenz der Probanden detektierten SNPs für *micb* Exon 5 tabellarisch aufgelistet.

Tab. 12: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von *micb* Exon 5.

Eine vorhandene Variante ist in Grün dargestellt. Ist die Variante bei dem Probanden nicht vorhanden, wird dies in Rot dargestellt.

MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09
B	5	Ab 275	S. MICB*001	Deletion	S. MICB*001	Deletion									
B	5	277	GTG	GCG	Val(V)	Ala(A)									

3.2.5 *micb* Exon 6

Bei Proband Nr.01 kann an Position 360 (s. Abb. 71) eine Biallelität identifiziert werden. Die Sequenz weist an dieser Position einen SNP für das Basentriplett GCC, wie auch ACC auf. Daraus resultierend codieren die Basenabfolgen für die unpolare/hydrophobe Aminosäuren Alanin(A), wie auch die polar/neutral geladene Aminosäure Threonin(T).

In Tab. 13 sind die in der individuellen Gensequenz der Probanden detektierten SNPs für *micb* Exon 6 tabellarisch aufgelistet.

Tab. 13: Übersichtsdarstellung der individuell vorhandenen SNPs von *micb* Exon 6.

Eine vorhandene Variante ist in Grün dargestellt. Ist die Variante bei dem Probanden nicht vorhanden, wird dies in Rot dargestellt. „BA“ steht für „biallelisch und zeigt an, dass der jeweilige Proband an dieser Stelle beide Sequenzen aufweist. Ein „=“ gibt an, dass es zu keiner Veränderung der ursprünglichen Aminosäure kommt.

MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. Seq.	Neue Seq.	Ursprüng. AS.	Neue AS.	01	02	03	04	05	06	07	08	09
B	6	Ab 319	S. MICB*001	Deletion	S. MICB*001	Deletion									
B	6	355	GGT	GGC	Gly(G)	=									
B	6	360	GCC	ACC	Ala(A)	Thr(T)	BA			BA	BA	BA			

3.2.6 Gesamtübersicht der Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 2-6

Die grafische Gesamtübersicht der Basen- bzw. Aminosäuresequenz für *micb* Exon 2-6 aller Probanden ist aus den Abbildungen (Abb. 44 bis Abb. 71) des Anhangs zu entnehmen.

3.3 Zuordnung des spenderindividuellen *mica* und *micb* Polymorphismus zu bereits bekannten Varianten

Die Zuordnung bereits bekannter MICA- und MICB-Varianten erfolgte anhand der zur Verfügung stehenden Datenbank des EMBL-EBI (s. 2.19) vom Datenstand des 18.01.2017. (Robinson *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2013; Robinson *et al.*, 2015)

Bestimmte Differenzierungen unter den einzelnen Varianten wie MICA*008:01:01, *008:01:02 und *008:04, sowie MICB*002:01:01, *002:01:02, *004:01:01, *004:01:02 und *005:02:01, *005:02:02, *005:02:03, *005:02:04 sind nur durch eine Sequenzierung des Signalpeptides in Exon 1 möglich, auf welches hier verzichtet wurde, da es funktionell nicht relevant ist. Aus diesem Grund ist bei einigen Probanden die Differenzierung ihrer allelischen Varianten auf eine Untervariante nicht immer zweifelsfrei möglich. Die Varianten werden unter MICA*008:01/04, sowie MICB*002:01, *004:01 und *005:02 zusammengefasst. Zudem ist durch einen SNP der Exon 1 (Signalpeptid) und Exon 2 (Position 1) überspannt und durch ein 6840 Basenpaaren großes Intron unterbrochen ist, eine genaue Differenzierung der Variante nicht möglich, da *mica* Exon 1 nicht sequenziert wurde.

Dem Proband Nr. 01 konnten näherungsweise am ehesten die Varianten MICA*002:01 und *012:01 anhand der identifizierten Proteinsequenz mithilfe der von EMBL-EBI (s. 2.19) zur Verfügung gestellten Datenbank zugeordnet werden. Allerdings ist an Position 56 (s. Abb. 7 und Abb. 19) in Exon 2 ein eindeutiger biallelischer SNP vorhanden, der zu keiner der beiden oben genannten Varianten vereinbar ist. Im Abgleich mit anderen bekannten Varianten kam es zu diversen Konflikten mit anderen bekannten SNP-Stellen des Probanden. Bei MICB muss

es sich um die Variante *004:01 oder *028 und *005:02 oder *010 bei Proband Nr. 01 handeln.

Bei Zuordnung der Varianten von MICA des Probanden Nr. 02 ergibt sich die Variante *008:01/04. Die andere Variante ist wie bei Proband Nr. 01 nur näherungsweise zuzuordnen. Hierbei handelt es sich um die Variante *045, welche allerdings in Konflikt mit einem SNP in Exon 4 an Position 251 steht. An dieser Stelle müsste für die bekannte Variante 045 ein Basentriplet vorliegen, welches für die Aminosäure Glutaminsäure codiert. Allerdings findet sich bei dem Probanden ein SNP für die Aminosäuren Arginin und Glutamin (s. Abb. 8). Der Abgleich mit anderen Varianten zeigte sich aufgrund der sequenzierten SNP konfliktreicher als mit der Variante *045. In Gesamtschau der Konstellation von vorhandenen SNPs bei diesem Probanden könnte hier eine neue MICA-Variante vorliegen. Bei MICB ist dem Probanden eindeutig die Variante *004:01 zuzuordnen.

Proband Nr. 03 kann aufgrund der fehlenden, biallelischen SNPs in MICA die Variante *002:01 zugeordnet werden. Ebenso konnten MICB die beiden Varianten *002:01 und *005:02 eindeutig zugeordnet werden.

Proband Nr. 04 konnte ebenfalls wie Nr. 03 die MICA Variante *002:01 eindeutig zugeordnet werden, allerdings handelt es sich bei MICB um die Variante *004:01 oder *028 und *005:02 oder *010.

Proband Nr. 05 ist eindeutig den MICA Varianten *008:01/04 und *017 zuzuordnen. Bei MICB handelt es sich um die Varianten *003 und *005:02.

Proband Nr. 06 kann bei MICA eindeutig die Variante *008:01/04 und bei MICB *004:01 oder *028 und *005:02 oder *010 zugeordnet werden. Für eine genauere Differenzierung ist die Sequenz des Signalpeptides notwendig.

Die Variante *018:01 kann dem Probanden Nr. 07 eindeutig zugeordnet werden. Als zweite Variante kommt am Ehesten die Variante *009:01 in Betracht, wenn man davon ausgeht, dass im Exon 1 keine Deletion vorliegt, allerdings ist eine genaue Differenzierung aufgrund des übergreifenden SNP von Exon 1 zu Exon 2 Position 1 nicht möglich. Bei MICB ist eine genaue Zuordnung der Variante *002:01 möglich. Die zweite Variante beschränkt sich auf *005:02 oder *021N.

Ergebnis

Proband Nr. 08 kann die MICA Variante *008:01/04 und *018:01 zugeordnet werden. Bei MICB handelt es sich um die Variante *005:02.

Zum Genotyp des Probanden Nr. 09 passen die Varianten *008:01/04 und *017. Bei MICB sind die Varianten *005 und *008 der Sequenzierung am Ähnlichsten. Allerdings gibt es einen SNP in Exon 4 an Position 189, welches nicht zu den beiden oben genannten Varianten passt. Die Zuordnung zu einer anderen Variante, die besser passt, ist nicht möglich. Möglicherweise stellt der Nachweis dieses SNP eine neue Genvariante dar.

Eine tabellarische Übersichtsdarstellung ist den Tabellen Tab. 14 und Tab. 15 zu entnehmen.

Ergebnis

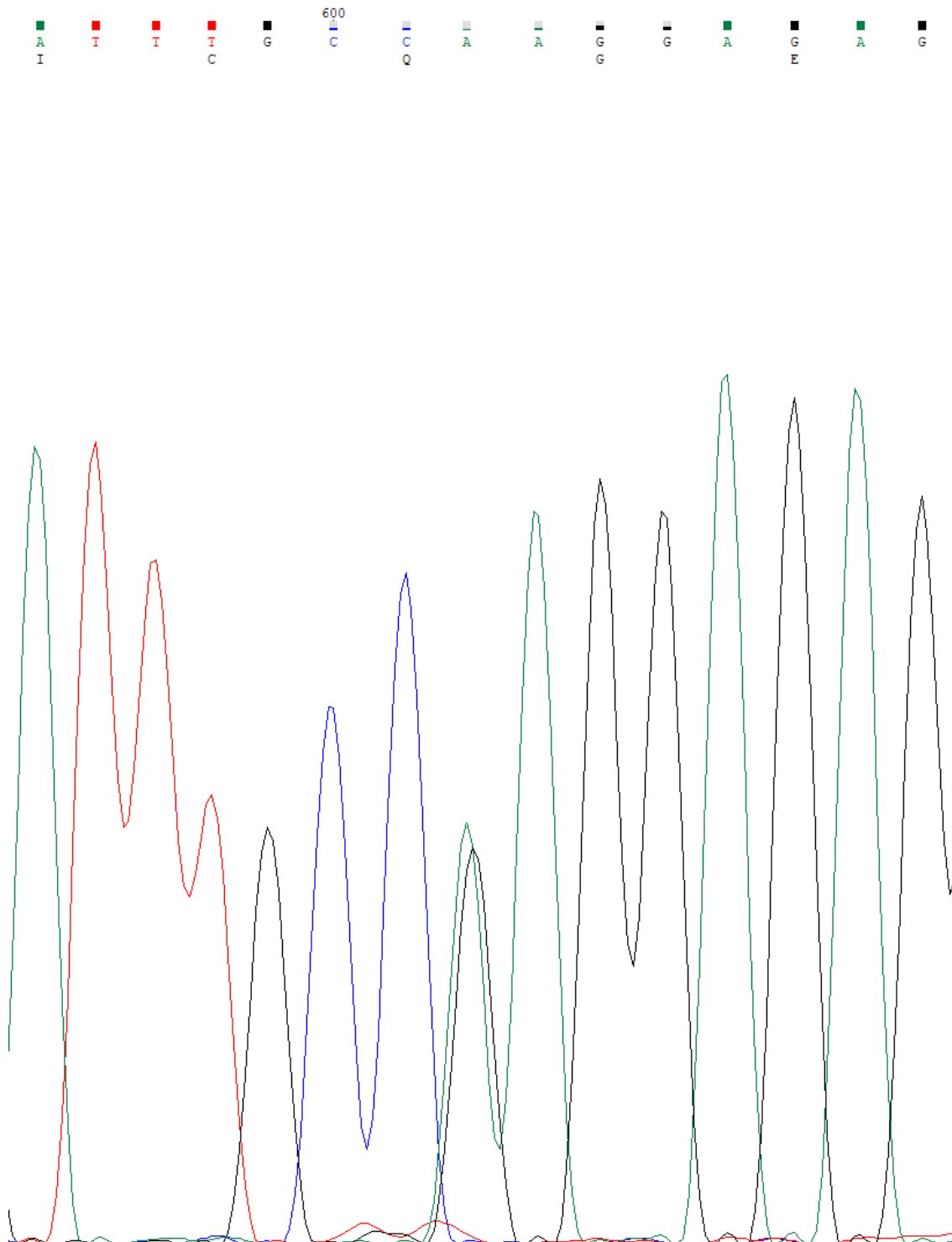


Abb. 8: Grafische Darstellung des Chromatogramms von MICA Exon 4 Position 249-253 des Probanden Nr. 02.

An Aminosäureposition 251 findet man im dazugehörigen Basentriplet ein Signal für die Base Alanin (Basenabfolge: „CAA“), wie auch Guanin (Basenabfolge: „CGA“).

Ergebnis

Tab. 14: Zuordnung der individuellen MICA Varianten.

Eine vorhandene Variante ist in Grün dargestellt. Ist die Variante bei dem Probanden nicht vorhanden, wird dies in Rot dargestellt.

Proband	01	02	03	04	05	06	07	08	09
MICA*002:01									
MICA*004									
MICA*008:01:01									
MICA*008:01:02									
MICA*008:04									
MICA*009:01									
MICA*012:01									
MICA*017									
MICA*018:01									
MICA*045									

Tab. 15: Zuordnung der individuellen MICB Varianten.

Eine vorhandene Variante ist in Grün dargestellt. Ist die Variante bei dem Probanden nicht vorhanden, wird dies in Rot dargestellt. Die Zahl in den Feldern gibt die jeweiligen Kombinationsmöglichkeiten bei mehreren MICB-Varianten an.

Exemplarisch an Proband Nr.01: Hier kann die Kombination aus Variante MICB*004:01/02 oder MICB*028 und Variante MICB*005:02:01-04 oder MICB*010 vorliegen.

Proband	01	02	03	04	05	06	07	08	09
MICB*002:01:01							1		
MICB*002:01:02							1		
MICB*003									
MICB*004:01:01	1			1		1			
MICB*004:01:02	1			1		1			
MICB*005:02:01	2			2		2	2		
MICB*005:02:02	2			2		2	2		
MICB*005:02:03	2			2		2	2		
MICB*005:02:04	2			2		2	2		
MICB*007									
MICB*008									
MICB*010	2			2		2			
MICB*021N							2		
MICB*028	1			1		1			

3.4 Identifikation interindividueller Gemeinsamkeiten und Unterschiede

Anhand der gewonnenen Sequenzen der Probanden von *mica* und *micb* fand die Identifikation interindividueller Gemeinsamkeiten und Unterschiede hinsichtlich der bekannten SNPs statt. Zur verbesserten Übersicht werden die Sequenzen im Vergleich mit der MICA- und MICB- Variante*001 durch ein multiples Alignment dargestellt. Gemeinsamkeiten und Unterschiede werden durch unterschiedliche Farbkodierung hervorgehoben. Die Darstellung des multiplen Alignments erfolgt sowohl in der Basen- als auch der Proteinsequenz. Die grafische Darstellung der interindividuellen Gemeinsamkeiten und Unterschiede können für *mica* Exon 2-6 den Abbildungen Abb. 15 bis Abb. 43 und für *micb* Exon 2-6 den Abbildungen Abb. 44 bis Abb. 71) des Anhangs zu entnommen werden.

3.5 Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Proteins MICA der Probanden durch individuelle SNPs

Durch den Basenaustausch in der individuellen Proteinsequenz von MICA kommt es teilweise zum Austausch der codierten Aminosäure (s. 3.1).

In der Datenbank waren zum Zeitpunkt der Auswertung insgesamt 107 verschiedene *mica* Allele in der IPD-IMGT/HLA Datenbank des EMBL-EBI beschrieben. Diese Varianten zeichneten sich durch unterschiedliche SNPs in Ihrer Basensequenz aus, die dann teilweise zur Kodierung anderer Aminosäuren führten. Allerdings gab es auch Variantengruppen, die gleiche SNPs in bestimmten Sequenzbereichen aufwiesen und daraus resultierend eine analoge Aminosäuresequenz zeigten.

Ein Austausch der Aminosäure durch einen SNP kann zu einer Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften führen. In Tabelle Tab. 16 sind potenzielle Änderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften von identifizierten SNPs der Probanden Nr. 01, 02, 05 und 07 im Protein MICA abgebildet, da diese Probanden ab Abschnitt 3.6 zur weiteren Auswertung herangezogen wurden. Aus diesem Grund sind Proband Nr. 01 und 07, sowie 02 und 05 vergleichsweise gegenübergestellt. In der Tabelle Tab. 16 sticht in der Auflistung der SNPs die Position 275 heraus, bei der es zu einer Verschiebung

des Leserasters kommt (beispielsweise bei Proband Nr. 05). Da hier unmittelbar das Exon 4 und Exon 5 trennende Intron beginnt, kommt es zu keiner Änderung in den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Proteins MICA. Zudem kommt es häufig beim Aminosäureaustausch zu keiner Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften.

Bei beiden Paarungen zeigt sich, dass es keinen SNP gibt, der bei einem der Probanden homozygot vorhanden und bei dem anderen homozygot nicht vorhanden ist. Es gibt Fälle, in denen ein Proband den SNP homozygot nicht aufweist, der zugeordnete Vergleichspartner an gleicher Position allerdings in seiner *mica*-Sequenz heterozygot für die ursprüngliche, wie auch die neue bzw. alternative Aminosäure codiert.

Dies kann beispielsweise an SNP-Position 173 (*mica* Exon 3) näher erläutert werden: Proband Nr. 01 codiert an dieser Stelle ausschließlich für die Aminosäure Lysin, welche basische Eigenschaften aufweist. Dem gegenübergestellt codiert Proband Nr. 07 sowohl für die Aminosäure Lysin (basisch) und Glutaminsäure, welche chemisch „saure“ Eigenschaften zeigt.

Durch diese häufige „bialellische“ Kodierung, bzw. heterozygote Basenabfolge (SNP) sind individuell spezifische, biochemische Unterschiede im Molekül MICA im Vergleich zwischen den Probanden begrenzt. Daraus schlussfolgernd erscheint ein starker Unterschied in den physikalisch-chemischen Eigenschaften des individuell exprimierten MICA-Proteins unwahrscheinlich, was ein ähnliches Bindungsverhalten der verschiedenen MICA-Varianten mit dem T-Zell-Rezeptor vermuten lässt.

Ergebnis

Tab. 16: Gegenüberstellung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Aminosäuren an SNP-Positionen.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften („Eig.“) der ursprünglichen („ursprüngl.“) und neuen Aminosäure („AS“) an der SNP-Position sind gegenübergestellt und farblich einheitlich gekennzeichnet. Eine vorhandene Variante ist in Grün dargestellt. Ist die Variante bei dem Probanden nicht vorhanden, wird dies in Rot dargestellt. „BA“ steht für „biallelisch“ und zeigt an, dass der jeweilige Proband an dieser Stelle beide Sequenzen bzw. Aminosäuren aufweist. Ein „=“ gibt an, dass es zu keiner Veränderung zur ursprünglichen Aminosäure/physikalisch-chemischen Eigenschaft kommt. An Position 295 bedeutet „-“, dass keine Insertion vorliegt, „+“, dass sie vorhanden ist. Die Zahlen an Position 297 geben an, wie viele Repeats vorliegen. Dabei weist der „/“ auf Biallelität hin. Die Spalten sind von oben nach unten zu lesen. So ergibt sich beispielsweise bei Proband Nr. 2 eine Sequenz ohne Insertion und ohne Repeat und eine Sequenz mit Insertion und einem Repeat. Die unterschiedlichen Farbdarstellungen Aminosäureeigenschaften dient zur Verbesserung der Übersichtlichkeit.

MIC	Exon	Pos.	Ursprüngl. AS.	Chem. Eig. ursprüngl. AS	Chem. Eig. neue AS	Neue AS.	01	07	02	05
A	2	14	Trp(W)	unpolar/hydrophob	polar/neutral	Gly(G)	BA			BA
A	2	23	Leu(L)	unpolar/hydrophob	=	=		BA	BA	BA
A	2	24	Thr(T)	polar/neutral	unpolar/hydrophob	Ala(A)	BA	BA		
A	2	36	Cys(C)	polar/neutral	=	Tyr(Y)		BA	BA	BA
A	2	56	Asn(N)	polar/neutral	=	=	BA			
A	2	64	Arg(R)	basisch	=	=	BA	BA		
MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. AS.	Chem. Eig. ursprüngl. AS	Chem. Eig. neue AS	Neue AS.	01	07	02	05
A	3	91	Gln(Q)	polar/neutral	basisch	Arg(R)				BA
A	3	122	Leu(L)	unpolar/hydrophob	=	Val(V)		BA		
A	3	125	Lys(K)	basisch	sauer	Glu(E)				
A	3	129	Met(M)	unpolar/hydrophob	=	Val(V)		BA	BA	BA
A	3	156	His(H)	basisch	unpolar/hydrophob	Leu(L)	BA			
A	3	173	Lys(K)	basisch	sauer	Glu(E)		BA	BA	BA
A	3	175	Gly(G)	polar/neutral	=	Ser(S)		BA		
MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. AS.	Chem. Eig. ursprüngl. AS	Chem. Eig. neue AS	Neue AS.	01	07	02	05

Ergebnis

MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. AS.	Chem. Eig. ursprüngl. AS	Chem. Eig. neue AS	Neue AS.	01	07	02	05
A	4	191	Ser(S)	polar/neutral	=	=			BA	
A	4	198	Ile(I)	unpolar/hydrophob	=	=		BA	BA	BA
A	4	205	Ser(S)	polar/neutral	=	=		BA	BA	BA
A	4	206	Gly(G)	polar/neutral	=	Ser(S)		BA	BA	BA
A	4	210	Trp(W)	unpolar/hydrophob	basisch	Arg(R)		BA	BA	BA
A	4	213	Thr(T)	polar/neutral	unpolar/hydrophob	Ile(I)			BA	BA
A	4	215	Ser(S)	polar/neutral	=	Thr(T)		BA	BA	BA
A	4	251	Gln(Q)	polar/neutral	basisch	Arg(R)			BA	BA
A	4	275	S.MICA*001	-	-	Verschiebung Leseraster				BA
MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. AS.	Chem. Eig. ursprüngl. AS	Chem. Eig. neue AS	Neue AS.	01	07	02	05
A	5	295	Ala(A)	unpolar/hydrophob	polar/neutral	Gly(G) - Frameshift	-/-	-/-	-/+	-/+
A	5	Ab 297	S. MICA*001	unpolar/hydrophob	=	Zusätzl. Repeats (x-fach)	0/5	0/2	0/1	5/1
A	5	304	Tyr(Y)	polar/neutral	=	=	BA			BA
A	5	306	Arg(R)	basisch	polar/neutral	Cys(C)	BA			BA
MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. AS.	Chem. Eig. ursprüngl. AS	Chem. Eig. neue AS	Neue AS.	01	07	02	05
A	6	350	Asp(D)	polar/neutral	unpolar/hydrophob	Ala(A)		BA	BA	BA
A	6	360	Ala(A)	unpolar/hydrophob	polar/neutral	Thr(T)		BA	BA	BA
MIC	Exon	Pos.	Ursprüng. AS.	Chem. Eig. ursprüngl. AS	Chem. Eig. neue AS	Neue AS.	01	07	02	05

3.6 *In silico* Modellierung von T-Zell-Rezeptor und Ligand(en)

3.6.1 Bindungsmöglichkeiten zwischen TCR und MICA im autologen und allogenen Setting

Die in 2.15.3 erstellten Bindungsmodelle von spenderindividuellen T-Zell-Rezeptor und autologen, bzw. allogenen MICA Molekül-Paarungen wurden auf mögliche Kontaktstellen untersucht. Dabei ergeben sich beim Vorgehen wie in 2.15.4 beschrieben aufgrund der identifizierten SNP in der *mica*-Sequenz der Probanden und der unterschiedlichen räumlichen Konfiguration der individuellen T-Zell-Rezeptoren zum Teil überlappende bzw. verschiedene, potenzielle Bindungsmöglichkeiten. Es zeigt sich allerdings deutlich, dass sich die Kontaktstellen (Bindungen) vornehmlich im Bereich der konservierten Regionen befinden, welche nicht von den interindividuellen SNPs der *mica*-Sequenz

betroffen sind. Hieraus ergeben sich interindividuell viele gemeinsame, potenzielle Bindungsstellen zwischen Rezeptor und Ligand im Modell.

Die Kontaktstellen von TCR und unterschiedlichen Liganden der Probanden mit identischen TCRs und den individuell zugehörigen MICA-Varianten wurden miteinander verglichen. Dadurch ist es möglich gewesen festzustellen, ob die SNPs einen wesentlichen Einfluss auf das Bindungsverhalten zwischen Rezeptor und Ligand haben.

Sowohl in Proband Nr. 01 als auch Nr. 07 konnten in vorangegangenen Experimenten (AG Schilbach, unpublished) klonale CD4⁺ V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T-Zell-Populationen etabliert werden, für die jeweils identische T-Zell-Rezeptor-Sequenzen identifiziert wurden.

Aus diesem Grund wurden die für Proband Nr. 01 und Nr. 07 identischen T-Zell-Rezeptor-Sequenzen genutzt um einen T-Zell-Rezeptor wie in 2.15.1 beschrieben zu modellieren. Anschließend wurde dieser neu modellierte T-Zell-Rezeptor mit den MICA Varianten *002/*012 (zugehörig zu Proband Nr. 01) und *009/*018 (zugehörig zu Proband Nr. 07) wie in 2.15.3 beschrieben in Kontakt gebracht und folgend auf potenzielle Bindungsstellen hin untersucht (2.15.4).

Die Modellauswahl aus den jeweils ca 1000 Bindungssimulationen (s. 2.16) erfolgte wie in 2.17 beschrieben.

3.6.2 Bindungsmöglichkeiten zwischen MICA und TCR von Proband 01 und 07 im Vergleich

Durch das aus 3.6.1 beschriebene Vorgehen ergaben sich folgende Ergebnisse für die Bindungen zwischen MICA und TCR zwischen Proband Nr. 01 und Nr. 07: Bei Proband Nr. 01 wurden in Kombination von TCR und MICA Variante *002-01, 1038 Bindungsmodelle erzeugt. Aufgrund der geraden Anzahl von Bindungsmodellen wurden zwei Modelle zur Auswertung für MICA*002-01 herangezogen (s. Tab. 17, M-Nr. 0464 und 0535). Der I_{sc}-Wert beträgt einmal -2974 und -2970.

Die Abbildung Abb. 9 zeigt eine exemplarische Darstellung der Bindungen zwischen TCR und MICA. Die sterisch und elektrochemisch möglichen

Bindungen zwischen den Aminosäuren von Rezeptor und Ligand sind mit gelben Linien gekennzeichnet.

Für das Modell mit der Nummer 0464 ergaben sich folgende, potenzielle Bindungsmöglichkeiten: Insgesamt konnten bei dem errechneten Modell 5 verschiedene Bindungsstellen identifiziert werden. Darunter 4 Wasserstoffbrückenbindungen und eine Ionenbindung. Die mögliche Ionenbindung zeigt sich zwischen Asparaginsäure (*mica* Exon 3, Pos 163) und Arginin (TCR, δ -Kette, CDR3-Region). Die 4 Wasserstoffbrückenbindungen bestehen zwischen, Arginin (*mica*, Exon 2, Pos. 61) und Tyrosin (TCR, δ -Kette, CDR3-Region), Asparaginsäure (*mica*, Exon2, Pos.72) und Serin (TCR, δ -Kette, CDR1-Region), Threonin (*mica*, Exon 3, Pos. 155) und Glutaminsäure (TCR, γ -Kette, außerhalb CDR-Region), sowie Histidin (*mica*, Exon 3, Pos. 156) und Glutamin (TCR, δ -Kette, außerhalb CDR-Region).

Auffällig ist hier, dass sich 3 der 5 Bindungsmöglichkeiten in der Variablen Region des TCR befinden. Die Bindung von Histidin (*mica*, Pos. 156) und Tyrosin (TCR, γ -Kette, CDR3-Region) befindet sich an einem SNP von *mica*. Proband Nr.01 weist an dieser Stelle sowohl die Basensequenz für Histidin wie auch Leucin auf. Allerdings wäre eine Interaktion zwischen hydrophoben/unpolaren Leucin und dem polar/neutral geladenen Tyrosin in diesem Zusammenhang eher unwahrscheinlich. Das bedeutet, dass die Bindung von MICA und TCR mit einem Leucin an Position 156 nicht zustande kommen würde.

Für das Modell Nr. 0535 ergeben sich folgende Bindungsmöglichkeiten: Insgesamt konnten hier nur 3 Bindungsmöglichkeiten identifiziert werden. Dabei handelt es sich um zwei potenzielle Ionenbindung und eine Wasserstoffbrückenbindung. So findet sich eine Ionenbindung zwischen Arginin (*mica*, Exon 2, Pos. 64) und Asparaginsäure (TCR, δ -Kette, CDR2-Region), sowie Asparaginsäure (*mica*, Exon 3, Pos. 149) und Arginin (TCR, δ -Kette, CDR3-Region). Die mögliche Wasserstoffbrückenbindung besteht zwischen Histidin (*mica*, Exon 3, Pos. 156) und Tyrosin (TCR, δ -Kette, CDR3-Region). Auch hier befinden sich alle Kontaktstellen am TCR in der variablen CDR-Region.

Ergebnis

Die Bindung von Arginin (*mica*, Exon 2, Pos. 64) und Asparaginsäure (TCR, δ -Kette, CDR2-Region) befindet sich an einer SNP-Stelle von *mica*. An dieser Stelle weist der Proband 01 auf genomischer Ebene zwei verschiedene Basentriplets auf (Basenaustausch an der dritten Position des Basentriplets) was allerdings zu keiner Änderung der codierten Aminosäure führt („silent SNP“).

Die Bindung von *mica* an Position 156 zum Tyrosin des TCR verhält sich analog wie in der Modell Nr. 0464 beschriebenen Bindungsmöglichkeit.

Ergebnis

Tab. 17: Bindungsmöglichkeiten von Proband 01 zwischen MICA Variante *002-01 und T-Zell-Rezeptor (TCR).

Nähere Erläuterungen siehe 3.6.2

Var.-MICA = Variante MICA; B-Nr. = Berechnungs-Nr.; M-Nr.=Modell-Nr.; AS MICA = Aminosäure auf MICA; Pos. mica = Position auf mica; AS-TCR = Aminosäure auf T-Zell-Rezeptor; Pos.-TCR = Position auf T-Zell Rezeptor; TCR-Kette = T-Zell-Rezeptorkette; IA = Interaktionsmöglichkeit; SNPP = SNP-Position; BT = Basenaustausch; BAOA = biallelisch ohne Aminosäureaustausch; BA = biallelisch.

Proband	Var. MICA	B-Nr.	M-Nr.	AS MICA	Pos. MICA	Exon	AS TCR	Pos. TCR	TCR-Kette	CDR	IA	SNPP	BT
01	*002-01	33569	0464	ARG	61	2	TYR	108	δ	3	H2O	Nein	-
01	*002-01	33569	0464	ASP	72	2	SER	36	δ	1	H2O	Nein	-
01	*002-01	33569	0464	THR	155	3	GLU	63	γ	-	H2O	Nein	-
01	*002-01	33569	0464	HIS	156	3	GLN	10	δ	-	H2O	JA	BA -> Leu
01	*002-01	33569	0464	ASP	163	3	ARG	104	δ	3	Ionen	Nein	-
01	*002-01	33569	0535	ARG	64	2	ASP	62	δ	2	Ionen	Ja	BAOA
01	*002-01	33569	0535	ASP	149	3	ARG	104	δ	3	Ionen	Nein	-
01	*002-01	33569	0535	HIS	156	3	TYR	108	δ	3	H2O	Ja	BA -> Leu

Für die Kombination des TCR von Proband Nr.01 und autologen MICA Variante *012 wurden 1050 Modelle erzeugt. Aufgrund der geraden Anzahl an Modellen folgt, dass zwei Modelle zur Auswertung für MICA*012 herangezogen wurden. Der I_{sc}-Wert beträgt bei beiden Modellen -2774 (s. Tab. 18, M-Nr. 0353 und 0568).

Bei der Modellnummer 0353 finden sich 3 potenzielle Bindungsstellen wobei es sich um zwei Wasserstoffbrückenbindungen und eine Van-Der-Waals-Bindung handelt. Die Van-Der-Waals-Bindung besteht zwischen Methionin (*mica*, Exon 3, Pos. 151) und Valin (TCR, γ -Kette, CDR2-Region). Die beiden Wasserstoffbrückenbindungen bestehen zwischen Arginin (*mica*, Exon 2, Pos. 64) und Serin (TCR, δ -Kette, CDR1-Region), sowie Lysin (*mica*, Exon 3, Pos. 154) und Asparagin (TCR, γ -Kette, CDR2-Region). Hier befinden sich alle potenziellen Bindungsmöglichkeiten zwischen TCR und MICA in den variablen CDR-Regionen. An Position 64 in *mica* ist ein SNP positioniert, der jedoch „stumm“ ist. Hier kommt es zu keinem Aminosäureaustausch. Der Proband ist für diesen SNP heterozygot.

Für das Modell mit der Nummer 0568 finden sich insgesamt 5 Bindungsstellen. Darunter 4 Van-Der-Waals-Bindungen und zwei Wasserstoffbrückenbindungen. Die potenzielle Wasserstoffbrückenbindung besteht zwischen Glycin (*mica*, Exon 2, Pos. 68) und Asparaginsäure (TCR, δ -Kette, CDR2-Region). Potenzielle Van-Der-Waals-Bindungen herrschen zwischen Methionin (*mica*, Exon 3, Pos. 151) und Alanin (TCR, δ -Kette, außerhalb der CDR-Region), Leucin (*mica* Exon3, Pos. 156) und zwei benachbarten Tryptophan (TCR, δ -Kette, CDR1-Region), sowie Methionin (*mica*, Exon 3, Pos. 160) und Tryptophan (TCR, δ -Kette, CDR1-Region). Eine besondere Position nimmt in diesem Fall die Biallelität des Probanden an Position 156 von *mica* ein. Hier codiert die vorhandene Basenabfolge des Probanden sowohl für Leucin, wie auch für Histidin. Eine potenzielle Interaktion besteht zwischen dem Histidin (*mica*, Exon 3, Pos. 156) und Serin (TCR, δ -Kette, CDR1-Region). Eine Interaktion zwischen dem unpolaren Leucin und polaren Serin ist an gleicher Stelle aus biochemischer Sicht nicht möglich. Aus diesem Grund ist die Transkription der DNA an dieser Stelle entscheidend, da es dadurch zu einer zusätzlichen Bindung kommen kann

abhängig davon, ob bei der Translation ein Leucin oder Histidin in das Protein eingebaut wird.

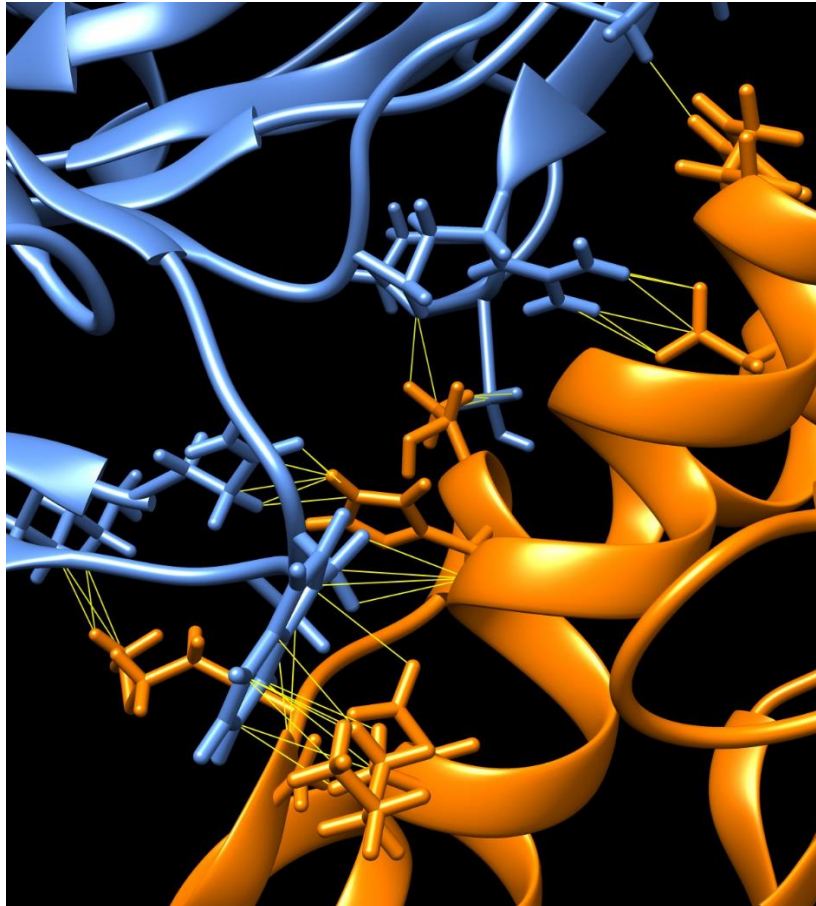


Abb. 9: Darstellung der Bindungen zwischen TCR (blau) und MICA (orange).
Exemplarisch anhand des Modells mit der Nr. 0464 (Berechnungsnummer: 33569, s. Tab. 17). Die sterisch und elektrochemisch möglichen Bindungen zwischen den Aminosäuren von Rezeptor und Ligand sind mit gelben Linien gekennzeichnet.

Ergebnis

Tab. 18: Bindungsmöglichkeiten von Proband 01 zwischen MICA Variante *012 und T-Zell-Rezeptor (TCR).

Nähere Erläuterungen siehe 3.6.2

Var.-MICA = Variante MICA; B-Nr. = Berechnungs-Nr.; M-Nr.=Modell-Nr.; AS MICA = Aminosäure auf MICA; Pos. mica = Position auf mica; AS-TCR = Aminosäure auf T-Zell-Rezeptor; Pos.-TCR = Position auf T-Zell Rezeptor; TCR-Kette = T-Zell-Rezeptorkette; IA = Interaktionsmöglichkeit; SNPP = SNP-Position; BT = Basenaustausch; BAOA = biallelisch ohne Aminosäureaustausch; BA = biallelisch.

Proband	Var. MICA	B-Nr.	M-Nr.	AS MICA	Pos. mica	Exon	AS TCR	Pos. TCR	TCR-Kette	CDR	IA	SNPP	BT
01	*012	33570	0353	ARG	64	2	SER	36	δ	1	H2O	Ja	BAOA
01	*012	33570	0353	MET	151	3	VAL	61	γ	2	VDW	Ja	Nein
01	*012	33570	0353	LYS	154	3	ASN	57	γ	2	H2O	Nein	Nein
01	*012	33570	0568	GLY	68	2	ASP	62	δ	2	H2O	Nein	-
01	*012	33570	0568	MET	151	3	ALA	78	δ	-	VDW	Ja	Nein
01	*012	33570	0568	LEU	156	3	TRP	37	δ	1	VDW	Ja	BA -> His
01	*012	33570	0568	LEU	156	3	TRP	38	δ	1	VDW	Ja	BA -> His
01	*012	33570	0568	MET	160	3	TRP		δ	1	VDW	Nein	-

Das Vorgehen zur Bestimmung von TCR-Liganden-Interaktionen des Proband Nr. 07 war analog, zu Proband Nr. 01 und wird daher übersichtshalber in der Tabelle Tab. 19 dargestellt. In diesem Zusammenhang wird nur noch auf mögliche Besonderheiten, die sich während der Auswertung ergeben hingewiesen.

Ergebnis

Tab. 19: Bindungsmöglichkeiten von Proband 07 zwischen MICA Variante *009 bzw. *018 und T-Zell-Rezeptor (TCR).

Nähere Erläuterungen siehe 3.6.2

Var.-MICA = Variante MICA; B-Nr. = Berechnungs-Nr.; M-Nr.=Modell-Nr.; AS MICA = Aminosäure auf MICA; Pos. mica = Position auf mica; AS-TCR = Aminosäure auf T-Zell-Rezeptor; Pos.-TCR = Position auf T-Zell Rezeptor; TCR-Kette = T-Zell-Rezeptorkette; IA = Interaktionsmöglichkeit; SNPP = SNP-Position; BT = Basenaustausch; BAOA = biallelisch ohne Aminosäureaustausch; BA = biallelisch.

Proband	Var. MICA	B-Nr.	M-Nr.	AS MICA	Pos. mica	Exon	AS TCR	Pos. TCR	TCR-Kette	CDR	IA	SNPP	BT
07	*009	32522	0147	ARG	61	2	SER	56	γ	2	H2O	Nein	Nein
07	*009	32522	0147	ARG	64	2	GLY	109	δ	3	H2O	ja	BAOA
07	*009	32522	0147	ASP	65	2	ASN	57	γ	2	H2O	Nein	-
07	*009	32522	0147	ASP	65	2	SER	56	γ	2	H2O	Nein	-
07	*009	32522	0147	MET	151	3	PRO	68	γ	-	VDW	ja	Nein
07	*018	32523	0521	GLN	39	2	LYS	59	γ	2	H2O	Ja	Nein
07	*018	32523	0521	THR	67	2	LYS	59	γ	2	H2O	Nein	-
07	*018	32523	0521	LYS	71	2	TYR	35	γ	1	H2O	Nein	-
07	*018	32523	0521	LYS	71	2	ASP	54	γ	-	Ionen	Nein	-
07	*018	32523	0521	ARG	74	2	ASN	57	γ	2	H2O	Nein	-
07	*018	32523	0521	ASP	149	3	TYR	108	δ	3	H2O	Nein	-

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die identifizierten Bindungsstellen zwischen MICA und TCR ausschließlich im Exon 2 und 3 von *mica* befinden. Die Kontaktstellen mit dem TCR und MICA fanden sich sowohl mit der Sequenz der γ - wie auch δ -Kette. Allerdings kommt es hier zu Unterschieden in der Bindungshäufigkeit zwischen MICA und den γ/δ -Ketten des TCR zwischen beiden Probanden.

Bei Proband Nr. 01 zeigten sich insgesamt 3 Bindungen von MICA zur γ -Kette und 13 Bindungen zur δ -Kette. Gegenteilig sieht es bei Proband Nr.07 aus. Hier gibt es insgesamt 9 potenzielle Bindungen zur γ -Kette und 2 zur δ -Kette.

Für die hochvariablen CDR-Regionen des TCR zeigte sich ein sehr inhomogenes Bild für die beiden Probanden. Hier fanden sich bei Proband Nr. 01 insgesamt 5 Bindungen in der CDR1-Region, jeweils 4 Bindungen in der CDR2- und CDR3-Region, sowie 3 Bindungen außerhalb der CDR1-3-Region.

Im Gegensatz dazu fanden sich bei Proband Nr. 07 eine Bindung in der CDR1-Region, 6 Bindungen in der CDR2-Region, sowie jeweils 2 Bindungen in der CDR3-Region und außerhalb der CDR1-3-Region.

Die weitere statistische Auswertung ist den Tabellen Tab. 20 und Tab. 21 zu entnehmen.

Tab. 20: Summe der Bindungen von MICA mit TCR aller Modelle des jeweiligen Probanden (Nr. 01 und 07).

Dargestellt ist die Anzahl der Bindungen der einzelnen Probanden und in Gesamtschau mit der δ -Kette und γ -Kette des individuellen T-Zell-Rezeptors und dem Liganden MICA.

Proband	Anzahl Bindungen gesamt	δ -Kette	γ -Kette
01	16	13	3
07	11	2	9

Tab. 21: Anzahl der Bindungen zwischen MICA / V δ 1-TCRs gezeigt nach CDR(-Region) und non-CDR(-Region) von Proband 01 und 07.

Dargestellt sind die einzelnen Bindungshäufigkeiten zwischen MICA und TCR innerhalb und außerhalb der CDR-(Regionen) des TCR von Proband 01 und 07.

	TCR-Region	Proband		Gesamt
		01	07	
CDR (-Region) (Anzahl Bindungen)	1	5	1	6
	∅ Bindungszahl pro Modell	1,25	0,5	1
	2	4	6	10
	∅ Bindungszahl pro Modell	1	3	1,67
	3	4	2	6
	∅ Bindungszahl pro Modell	1	1	1
	Non-CDR(- Region)	3	2	5
	∅ Bindungszahl pro Modell	0,75	1	0,83

Bezogen auf die einzelnen Berechnungsprozesse zeigt sich, dass sich bei 3 Modellen bei Proband 01 ausschließlich Bindungen zwischen autologer MICA-Variante *002:01 bzw. *012 und der δ -Kette des individuellen TCR, der die gleiche Sequenz besitzt wie Proband Nr 07, da in beiden Probanden eine klonale CD4+ V δ 1+ $\gamma\delta$ T-Zell-Populationen mit identischer T-Zell-Rezeptor-Sequenz identifiziert werden konnte. Bei Modell Nr. 0353 bestehen Bindungen zwischen γ – und δ -Kette des TCR und MICA (s. Tab. 22, Tab. 23, Tab. 24, Tab. 25)

Tab. 22: Detaillierte Auflistung der Bindungsanzahl zwischen MICA / V δ 1-TCRs anhand des individuellen Berechnungsmodells 33569.

Farblich markiert sind die vorhandenen Bindungen. Liegt ausschließlich eine Bindung zwischen MICA und der δ -Kette des TCR vor, ist die zugehörige Modell-Nr. zusätzlich farblich hervorgehoben. Legende: Var.-MICA = MICA-Variante.

MICA *002:01: Proband 01 – autolog / Proband 07 - allogene							
Proband	Var.-MICA	Berechnungs-Nr.	Modell-Nr.	mica-Exon	TCR-Kette	CDR(-Region)	Anzahl Bindungen
01	*002:01	33569	0535	2	Y	1	0
						2	0
						3	0
						non	0
				2	δ	1	0
						2	1
						3	0
						non	0
				3	Y	1	0
						2	0
						3	0
						non	0
			3	δ	1	0	
					2	0	
					3	2	
					non	0	
			0464	2	Y	1	0
						2	0
						3	0
						non	0
2	δ	1		1			
		2		0			
		3		1			
		non		0			
3	Y	1	0				
		2	0				
		3	0				
		non	1				

Ergebnis

					δ	1	0
						2	0
						3	1
						non	1

Tab. 23: Detaillierte Auflistung der Bindungsanzahl zwischen MICA / V δ 1-TCRs anhand des individuellen Berechnungsmodells 33570.

Farblich markiert sind die vorhandenen Bindungen. Liegt ausschließlich eine Bindung zwischen MICA und der δ -Kette des TCR vor, ist die zugehörige Modell-Nr. zusätzlich farblich hervorgehoben. Legende: Var.-MICA = MICA-Variante.

MICA *012: Proband 01 – autolog / Proband 07 - allogon							
Proband	Var.-MICA	Berechnungs-Nr.	Modell-Nr.	mica-Exon	TCR-Kette	CDR(-Region)	Anzahl Bindungen
01	*012	33570	0568	2	γ	1	0
						2	0
						3	0
						non	0
				δ	1	0	
					2	1	
					3	0	
					non	0	
			3	γ	1	0	
					2	0	
					3	0	
					non	0	
				δ	1	3	
					2	0	
					3	0	
					non	1	
0353	2	γ	1	0			
			2	0			
			3	0			
			non	0			
	δ	1	1				
		2	0				
		3	0				

Ergebnis

						non	0
				3	γ	1	0
						2	2
						3	0
						non	0
					δ	1	0
						2	0
						3	0
						non	0

Tab. 24: Detaillierte Auflistung der Bindungsanzahl zwischen MICA / Vδ1-TCRs anhand des individuellen Berechnungsmodells 32522.

Farblich markiert sind die vorhandenen Bindungen. Liegt ausschließlich eine Bindung zwischen MICA und der δ-Kette des TCR vor, ist die zugehörige Modell-Nr. zusätzlich farblich hervorgehoben. Legende: Var.-MICA = MICA-Variante.

MICA *009: Proband 07 – autolog / Proband 01 - allogene							
Proband	Var.-MICA	Berechnungs-Nr.	Modell-Nr.	mica-Exon	TCR-Kette	CDR(-Region)	Anzahl Bindungen
07	*009	32522	0147	2	γ	1	0
						2	3
						3	0
						non	0
					δ	1	0
						2	0
						3	1
						non	0
				3	γ	1	0
						2	0
						3	0
						non	1
δ	1	0					
	2	0					
	3	0					
	non	0					

Tab. 25: Detaillierte Auflistung der Bindungsanzahl zwischen MICA / V δ 1-TCRs anhand des individuellen Berechnungsmodells 32523.

Farblich markiert sind die vorhandenen Bindungen. Liegt ausschließlich eine Bindung zwischen MICA und der δ -Kette des TCR vor, ist die zugehörige Modell-Nr. zusätzlich farblich hervorgehoben. Legende: Var.-MICA = MICA-Variante.

MICA *018: Proband 07 – autolog / Proband 01 - allogene							
Proband	Var.-MICA	Berechnungs-Nr.	Modell-Nr.	mica-Exon	TCR-Kette	CDR(-Region)	Anzahl Bindungen
07	*018	32523	0521	2	Y	1	1
						2	3
						3	0
						non	1
					δ	1	0
						2	0
						3	0
						non	0
				3	Y	1	0
						2	0
						3	0
						non	0
					δ	1	0
						2	0
						3	1
						non	0

3.6.3 Bindungsmöglichkeiten zwischen MICA und TCR von Proband 02 und 05 im Vergleich

Die Auswertung der Bindungsmöglichkeiten zwischen den individuellen und interindividuellen MICA-Varianten der Probanden und ihrer TCR-Sequenzen erfolgte analog wie in 3.6.2 bereits beschrieben. Eine vollständige Darstellung der potenziellen Bindungsmöglichkeiten ist der Tabelle Tab. 26 zu entnehmen. Es wird im Folgenden nur noch auf Besonderheiten eingegangen.

Da in diesem Fall Proband Nr. 02 und 05 dieselbe MICA-Variante *008 aufweisen, können die Bindungsmodelle für beide Probanden herangezogen werden. Bei Proband Nr. 02 bzw. 05 wurden in Kombination von MICA Variante

*008 und dem TCR 1034 Modelle, für Proband Nr. 02 mit MICA Variante *045 und TCR 1114 Modelle und für Proband Nr. 05 mit MICA Variante *017 und seinem TCR 1036 Modelle erzeugt.

Für die Modelle mit Variante *008 (s. Tab. 26) ergibt sich beide Male ein I_{sc} -Wert von -2688 (s. Tab. 26, M-Nr.0511 und 0528). Die Modelle weisen 5 bzw. 6 potenzielle Bindungsmöglichkeiten auf. Davon insgesamt 6 an SNP-Positionen, allerdings kommt es an keiner dieser Stellen zu einem Aminosäureaustausch und damit Änderung der Proteinsequenz bei den Probanden.

Bei den Bindungsmodellen zwischen MICA Variante *045 und TCR wurde ein I_{sc} -Wert von -2636, bzw. -2639 (s. Tab. 26, M-Nr.0132 und 0712) errechnet. Es ergaben sich insgesamt 10 potenzielle Bindungsmöglichkeiten, davon 7 an SNP-Positionen, allerdings bei keiner mit einem Aminosäureaustausch im Vergleich zur Standardvariante MICA*001.

Für die Bindungsmodelle zwischen MICA Variante *017 und TCR wurde ein I_{sc} -Wert von -2593, bzw. -2589 (s. Tab. 26, M-Nr.0026 und 0084) errechnet. Insgesamt konnten 9 potenzielle Bindungsmöglichkeiten identifiziert werden. In diesem Fall an 4 SNP-Positionen, allerdings kam es auch hier zu keinem Austausch der Aminosäure und damit zu keiner Änderung der Proteinsequenz. Die vollständige Auflistung ist der Tabelle Tab. 26 zu entnehmen.

Ergebnis

Tab. 26: Bindungsmöglichkeiten von Proband 02 und 05 zwischen MICA Variante *008, *017 bzw. *045 und T-Zell-Rezeptor (TCR).

Nähere Erläuterungen siehe 3.6.3.

Var.-MICA = Variante MICA; B-Nr. = Berechnungs-Nr.; M-Nr.=Modell-Nr.; AS MICA = Aminosäure auf MICA; Pos. mica = Position auf mica; AS-TCR = Aminosäure auf T-Zell-Rezeptor; Pos.-TCR = Position auf T-Zell Rezeptor; TCR-Kette = T-Zell-Rezeptorkette; IA = Interaktionsmöglichkeit; SNPP = SNP-Position; BT = Basenaustausch; BAOA = biallelisch ohne Aminosäureaustausch; BA = biallelisch.

Proband	Var. MICA	B-Nr.	M-Nr.	AS MICA	Pos. mica	Exon	AS TCR	Pos. TCR	TCR-Kette	CDR	IA	SNPP	BT
02/05	*008	33528	0511	LYS	57	2	ASN	57	γ	2	H2O	Nein	
02/05	*008	33528	0511	ARG	64	2	SER	100	δ	3	H2O	Ja	BAOA
02/05	*008	33528	0511	THR	153	3	ASP	53	δ	-	H2O	Nein	
02/05	*008	33528	0511	THR	155	3	ASP	53	δ	-	H2O	Nein	
02/05	*008	33528	0511	HIS	156	3	ASP	53	δ	-	Ionen	Ja	Nein
02/05	*008	33528	0528	ARG	61	2	ASP	53	δ	-	Ionen	Nein	
02/05	*008	33528	0528	ARG	64	2	ASP	102	δ	3	Ionen	Ja	BAOA
02/05	*008	33528	0528	ARG	64	2	THR	95	δ	3	H2O	Ja	BAOA
02/05	*008	33528	0528	ARG	64	2	ASP	102	δ	3	Ionen	Ja	BAOA
02/05	*008	33528	0528	ASP	65	2	LYS	98	δ	3	Ionen	Nein	
02/05	*008	33528	0528	MET	151	3	PHE	34	γ	-	VDW	Ja	Nein
05	*017	33571	0026	MET	151	3	PHE	34	γ	1	VDW	Ja	Nein
05	*017	33571	0026	THR	153	3	LYS	98	δ	3	H2O	Nein	
05	*017	33571	0026	HIS	156	3	THR	101	δ	3	H2O	Ja	Nein

Ergebnis

05	*017	33571	0084	PHE	145	3	TRP	29	δ	1	VDW	Nein	
05	*017	33571	0084	LEU	146	3	TRP	29	δ	1	VDW	Nein	
05	*017	33571	0084	GLU	148	3	LYS	68	δ	-	H2O	Nein	
05	*017	33571	0084	ASP	149	3	LYS	68	δ	-	Ionen	Nein	
05	*017	33571	0084	ALA	150	3	TRP	29	δ	1	VDW	Nein	
05	*017	33571	0084	MET	151	3	ALA	69	δ	-	VDW	Ja	Nein
02	*045	39519	0132	ARG	64	2	TYR	110	γ	3	H2O	Ja	BAOA
02	*045	39519	0132	ASP	72	2	GLN	55	δ	-	H2O	Nein	
02	*045	39519	0132	THR	155	3	LYS	68	δ	-	H2O	Nein	
02	*045	39519	0132	HIS	156	3	ASP	53	δ	-	Ionen	Ja	Nein
02	*045	39519	0132	HIS	156	3	SER	52	δ	2	H2O	Ja	Nein
02	*045	39519	0712	ARG	64	2	THR	95	δ	3	H2O	Ja	BAOA
02	*045	39519	0712	ARG	64	2	SER	30	δ	1	H2O	Ja	BAOA
02	*045	39519	0712	GLU	148	3	LYS	59	γ	2	H2O	Nein	
02	*045	39519	0712	MET	151	3	VAL	61	γ	2	VDW	Ja	Nein
02	*045	39519	0712	HIS	156	3	TYR	35	γ	1	H2O	Ja	Nein
Proband	Var. MICA	B-Nr.	M-Nr.	AS MICA	Pos. mica	Exon	AS TCR	Pos. TCR	TCR-Kette	CDR	IA	SNPP	BT

Die statistische Auswertung erfolgte bei Proband Nr. 02 und 05 analog, wie bereits in 3.6.2 beschrieben. Aus diesem Grund erfolgt nur noch die tabellarische Darstellung der Ergebnisse. Auf eine ausführliche schriftliche Beschreibung wird verzichtet.

Der Ergebnisse der statistischen Auswertung sind den Tabellen Tab. 27 und Tab. 28 zu entnehmen.

Tab. 27: Summe der Bindungen von MICA mit TCR aller Modelle des jeweiligen Probanden (Nr. 02 und 05).

Dargestellt ist die Anzahl der Bindungen der einzelnen Probanden und in Gesamtschau mit der δ -Kette und γ -Kette des individuellen T-Zell-Rezeptors und dem Liganden MICA.

Proband	Anzahl Bindungen gesamt	δ -Kette	γ -Kette
02	21	15	6
05	20	17	3

Tab. 28: Anzahl der Bindungen zwischen MICA / V δ 1-TCRs gezeigt nach CDR(-Region) und non-CDR(-Region) von Proband 02 und 05.

Dargestellt sind die einzelnen Bindungshäufigkeiten zwischen MICA und TCR innerhalb und außerhalb der CDR(-Regionen) des TCR von Proband 02 und 05.

		Proband		
	TCR-Region	02	05	Gesamt
	CDR (-Region) (Anzahl Bindungen)	1	2	4
\emptyset Bindungszahl pro Modell		0,5	1	0,75
2		4	1	5
\emptyset Bindungszahl pro Modell		1	0,5	0,83
3		7	7	14
\emptyset Bindungszahl pro Modell		1,75	3,5	2,33
(Anzahl Bindungen)	Non-CDR(- Region)	8	8	16
	\emptyset Bindungszahl pro Modell	2	4	2,67

Bei Proband Nr. 02 und 05 zeigt nur das Modell Nr. 0084 eine ausschließliche Bindung zwischen MICA (*017) und δ -Kette des TCR. In den restlichen Modellen bestehen sowohl zwischen γ - und δ -Kette des TCR und MICA Rezeptor-Liganden-Bindungen (s. Tab. 29, Tab. 30, Tab. 31).

Tab. 29: Detaillierte Auflistung der Bindungsanzahl zwischen MICA / V δ 1-TCRs anhand des individuellen Berechnungsmodells 33528.

Farblich markiert sind die vorhandenen Bindungen. Liegt ausschließlich eine Bindung zwischen MICA und der δ -Kette des TCR vor, ist die zugehörige Modell-Nr. zusätzlich farblich hervorgehoben. Legende: Var.-MICA = MICA-Variante.

MICA *008:01:01/02, 008:04: Proband 02 und 05 - autolog									
Proband	Var.-MICA	Berechnungs-Nr.	Modell-Nr.	mica - Exon	TCR-Kette	CDR(-Region)	Anzahl Bindungen		
02/05	*008:01:01/ *008:01:02/ *008:04	33528	0511	2	Y	1	0		
						2	1		
						3	0		
						non	0		
				δ	1	0			
					2	0			
					3	1			
					non	0			
				3	Y	1	0		
						2	0		
						3	0		
						non	0		
			δ	1	0				
				2	0				
				3	0				
				non	3				
			0528			2	Y	1	0
								2	0
								3	0
								non	0
δ	1	0							
	2	0							
	3	4							
	non	1							
3	Y	1	0						
		2	0						
		3	0						

Ergebnis

						non	1
					δ	1	0
				2		0	
				3		0	
				non		0	

Tab. 30: Detaillierte Auflistung der Bindungsanzahl zwischen MICA / Vδ1-TCRs anhand des individuellen Berechnungsmodells 39519.

Farblich markiert sind die vorhandenen Bindungen. Liegt ausschließlich eine Bindung zwischen MICA und der δ-Kette des TCR vor, ist die zugehörige Modell-Nr. zusätzlich farblich hervorgehoben. Legende: Var.-MICA = MICA-Variante.

MICA *045: Proband 02 – autolog / Proband 05 - allogene							
Proband	Var.-MICA	Berechnungs-Nr.	Modell-Nr.	mica - Exon	TCR-Kette	CDR(-Region)	Anzahl Bindungen
02	*045	39519	0132	2	γ	1	0
						2	0
						3	1
						non	0
				δ	1	0	
					2	0	
					3	0	
					non	1	
			3	γ	1	0	
					2	0	
					3	0	
					non	0	
				δ	1	0	
					2	1	
					3	0	
					non	2	
0712	2	γ	1	0			
			2	0			
			3	0			
			non	0			
	δ	1	1				
		2	0				

Ergebnis

						3	1
						non	0
				3	γ	1	1
						2	2
						3	0
						non	0
					δ	1	0
						2	0
						3	0
						non	0

Tab. 31: Detaillierte Auflistung der Bindungsanzahl zwischen MICA / Vδ1-TCRs anhand des individuellen Berechnungsmodells 33571.

Farblich markiert sind die vorhandenen Bindungen. Liegt ausschließlich eine Bindung zwischen MICA und der δ-Kette des TCR vor, ist die zugehörige Modell-Nr. zusätzlich farblich hervorgehoben. Legende: Var.-MICA = MICA-Variante.

MICA *017: Proband 05 – autolog / Proband 02 - allogene							
Proband	Var.-MICA	Berechnungs-Nr.	Modell-Nr.	mica - Exon	TCR-Kette	CDR(-Region)	Anzahl Bindungen
05	*017	33571	0084	2	γ	1	0
						2	0
						3	0
						non	0
				δ	1	0	
					2	0	
					3	0	
					non	0	
			3	γ	1	0	
					2	0	
					3	0	
					non	0	
				δ	1	3	
2	0						
3	0						
non	3						
			0026	2	γ	1	0

Ergebnis

						2	0	
						3	0	
						non	0	
					δ	1	0	
						2	0	
						3	0	
						non	0	
					3	γ	1	1
							2	0
							3	0
							non	0
						δ	1	0
				2			0	
				3			2	
				non			0	

3.6.4 Simulation eines Energiemodells des TCR mit MICA im autologen Setting vor und nach Bindungssimulation

Die in 2.15.1 erzeugten T-Zell-Rezeptoren wiesen zum Teil diskrete, wie auch erhebliche individuelle und interindividuelle Unterschiede in ihrer räumlichen Konformation auf.

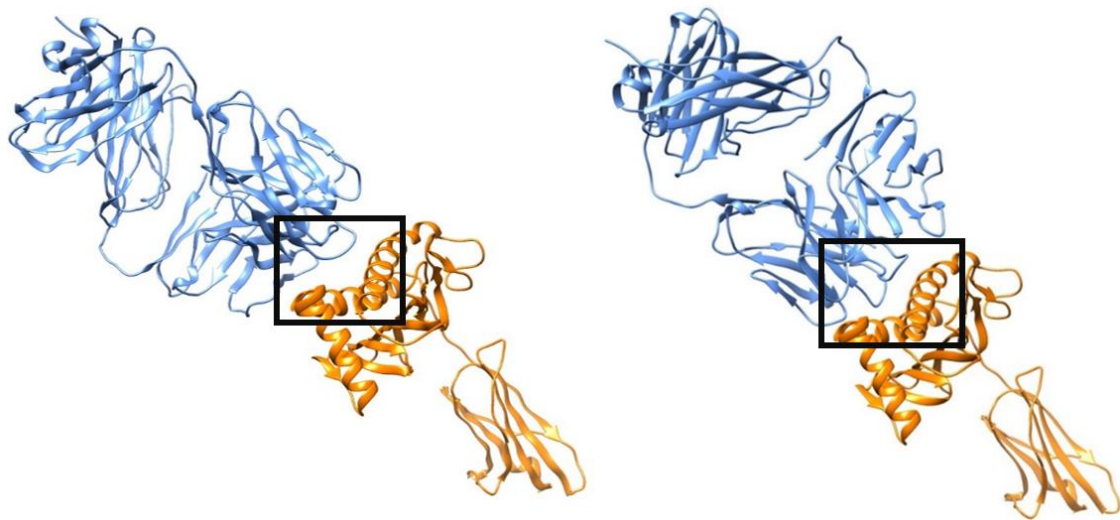


Abb. 10: Exemplarisch dargestellte 3D-Modelle von MICA Variante *002 und dem T-Zell-Rezeptor des Probanden Nr. 01 in räumlicher Nähe im Vergleich.

Mit einem schwarzen Viereck ist der Bereich der mutmaßlichen CDR3-Bindungsstelle vom TCR mit dem Liganden dargestellt.

Links: Nach Bindung durch Computersimulation.

Rechts: Vor Bindung durch Computersimulation.

Insbesondere im Bereich der mutmaßlichen CDR3-Bindungsstelle (s. Abb. 10, schwarze Vierecke) der T-Zell-Rezeptoren für Liganden ergaben sich daraus heterogene Abstände zwischen den Aminosäuren von T-Zell-Rezeptor und Ligand der einzelnen Modelle der Probanden.

Bei den verwendeten MICA-Sequenzen handelt es sich um die gleichen, wie in Abschnitt 3.3 identifizierten, spenderindividuellen Proteinsequenzen. Das Vorgehen für die Modellierung der einzelnen MICA-Liganden erfolgte wie in 2.15.2 beschrieben.

3.6.5 Simulation eines Energiemodells des TCR mit MICA im allogenen Setting vor und nach Bindungssimulation

Die Simulation erfolgte weitgehend äquivalent zum autologen Setting (siehe: 3.6.4). Sie unterscheidet sich lediglich in der Sequenz des zu bindenden MICA, welches einer anderen, im Vergleich zur spenderindividuellen, MICA Variante entspricht. Die T-Zell-Rezeptor-Sequenz und räumlich-strukturelle Konformation des Rezeptor-Liganden-Modells bleibt dabei gleich.

3.6.6 Bestimmung von Unterschieden im Energieniveau im autologen versus allogenen Setting TCR-Liganden-Modell

Bei der computerbasierten Berechnung der einzelnen Bindungsmöglichkeiten wurde ebenfalls zu jedem Bindungsmodell der so genannte Interface Score (I_{sc}) errechnet. Der I_{sc} gibt an wieviel Energie sich im Chimärmolekül nach Rezeptor-Ligand-Bindung befindet, abzüglich der Energie beider Bindungspartner allein und ist somit ein Maß, für die Energie, die bei der Bindung von Rezeptor und Ligand frei wird. Der I_{sc} besitzt keine Einheit.

Die Stabilität der Bindung korreliert invers mit dem I_{sc} .

Zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Rezeptoren und Liganden, sowie der daraus resultierenden individuellen Berechnungen der Bindungsmöglichkeiten wurde der Median herangezogen, da es sich bei den verschiedenen I_{sc} der jeweiligen Berechnungsmodelle nicht um eine Normalverteilung handelt (s. 3.6.7). Durch die Verwendung des Medians wird ausgeschlossen, dass Bindungsmöglichkeiten, die energetisch zu stark nach oben oder unten abweichen, einen zu großen Einfluss auf das Ergebnis nehmen, weil nur Modelle berechnet werden, bei denen Energie durch die Bindung von Rezeptor und Ligand frei wird (exotherme Reaktion, $I_{sc} \leq 0$). Aus diesem Grund gibt es einen Cut-Off des I_{sc} bei dem Wert 0.

3.6.7 Prüfung des I-sc auf Normalverteilung anhand der Berechnungsnummern

Um zu entscheiden welche weiteren statistischen Tests bezüglich der Signifikanz auf Unterschiede zwischen den Energieniveaus der TCR-Liganden-Komplexe herangezogen werden können, wurde zunächst überprüft, ob es sich bei den erhobenen Werten um eine Normalverteilung handelt. Diese Prüfung ist notwendig, da viele Tests (beispielweise T-Tests) eine Normalverteilung der Daten voraussetzen. Aufgrund der Tatsache, dass kein I_sc- einen Wert größer 0 annehmen kann, ist davon grundsätzlich nicht auszugehen.

Zunächst wurde eine grafische Sichtkontrolle mit allen 3 oben genannten Methoden (s. exemplarisch Abb. 11 und Abb. 12) für alle erhobenen Daten der jeweiligen Probanden durchgeführt. So zeigt sich beispielsweise bei der Datenverteilung der B-Nr. 33569 im Gegensatz zur B-Nr. 32522, dass die Werte optisch einer Normalverteilung ähneln. Da die grafische Sichtkontrolle keinen sicheren Aufschluss darüber geben, ob eine Normalverteilung vorliegt, wurden diese in einem weiteren Schritt um die Analyse der „Schiefe“ und „Kurtosis“ ergänzt (s. Tab. 32).

Im hier vorliegenden Fall zeigt sich beispielsweise, dass die Daten von Berechnungsnummer 32522 mit Schiefe von ca. -0,423 und einer Kurtosis von ca. 0,686 eine deutliche Linksschiefe, sowie flache Normalverteilungskurve aufweisen, was tendenziell gegen das Vorliegen einer Gaußverteilung spricht. Weitere Werte können der Tabelle Tab. 32 entnommen werden.

Zur weiteren Validierung, ob bei den erhobenen Datensätzen Normalverteilung vorliegt wurde der Shapiro-Wilk-W-Test genutzt. Für die Durchführung des Shapiro-Wilk-W-Test wurden alle durch die Computersimulation berechneten I_sc-Werte der jeweiligen Berechnungsnummer herangezogen. Also alle I_sc-Werte, die bei der interindividuellen TCR-MICA-Bindungssimulation (identifizierbar durch die eindeutige Berechnungsnummer (B-Nr.)) ausgegeben wurden.

Es zeigte sich, dass die Nullhypothese H_0 bei allen Berechnungsnummern deutlich abgelehnt werden konnte mit Ausnahme von B-Nr. 33569. Hier zeigte sich ein „<W“ von ca. 0,1, welches deutlich größer ist als das festgelegte

Ergebnis

Signifikanzniveau von $<0,05$ ($<5\%$). In diesem Fall kann die Nullhypothese H_0 , wie in diesem Abschnitt bereits näher erläutert, nicht verworfen und eine Normalverteilung damit nicht ausgeschlossen werden (s. Tab. 32 und Abb. 11). Zur Vergleichbarkeit der Daten untereinander wurde im weiteren Verlauf auf nichtparametrische Statistikverfahren zurückgegriffen, welche robust gegenüber nicht-normalverteilten Daten sind, allerdings auch bei normalverteilten Datensätzen angewendet werden können. Dadurch ist die Vergleichbarkeit mit den Daten der B-Nr. 33569 (Nullhypothese nicht abgelehnt) gegeben ist.

Tab. 32: Übersichtstabelle statistisch erhobener Werte bezogen auf die Berechnungsnummern (B-Nr.).

Darstellung der Gesamtanzahl verschiedener Interface-Scores (I_{sc}), sowie Schiefe und Kurtosis der Daten und der Wahrscheinlichkeit „ $<W$ “ ($=\alpha$), dass bei den Daten eine Normalverteilung vorliegt. Werte die kleiner sind als das festgelegte Signifikanzniveau $<W=\alpha=0,05=5\%$ sind rot markiert.

B-Nr.	Proband	MICA	Gesamtanzahl I_{sc}	Wahrsch. $<W$	Maximum	Minimum	Median	Schiefe	Kurtosis
33569	01	002-01	1038	0,1078	0	-6595	-2972	-0,092245	0,0009484
33570	01	012-01	1050	0,0277	0	-6984	-2774	-0,1151	0,0597248
32522	07	009-01	1121	<0,0001	0	-9010	-2738	-0,423274	0,6864978
32523	07	018-01	1181	0,0033	0	-7128	-2908	-0,193873	0,1368157
39519	02	045	1114	<0,0001	0	-6731	-2688	-0,03378	0,3079337
33528	02/05	008	1034	0,0007	0	-6188	-2637,5	0,0624025	-0,085938
33571	05	017	1036	0,0043	0	-6035	-2591	0,0155296	0,107331

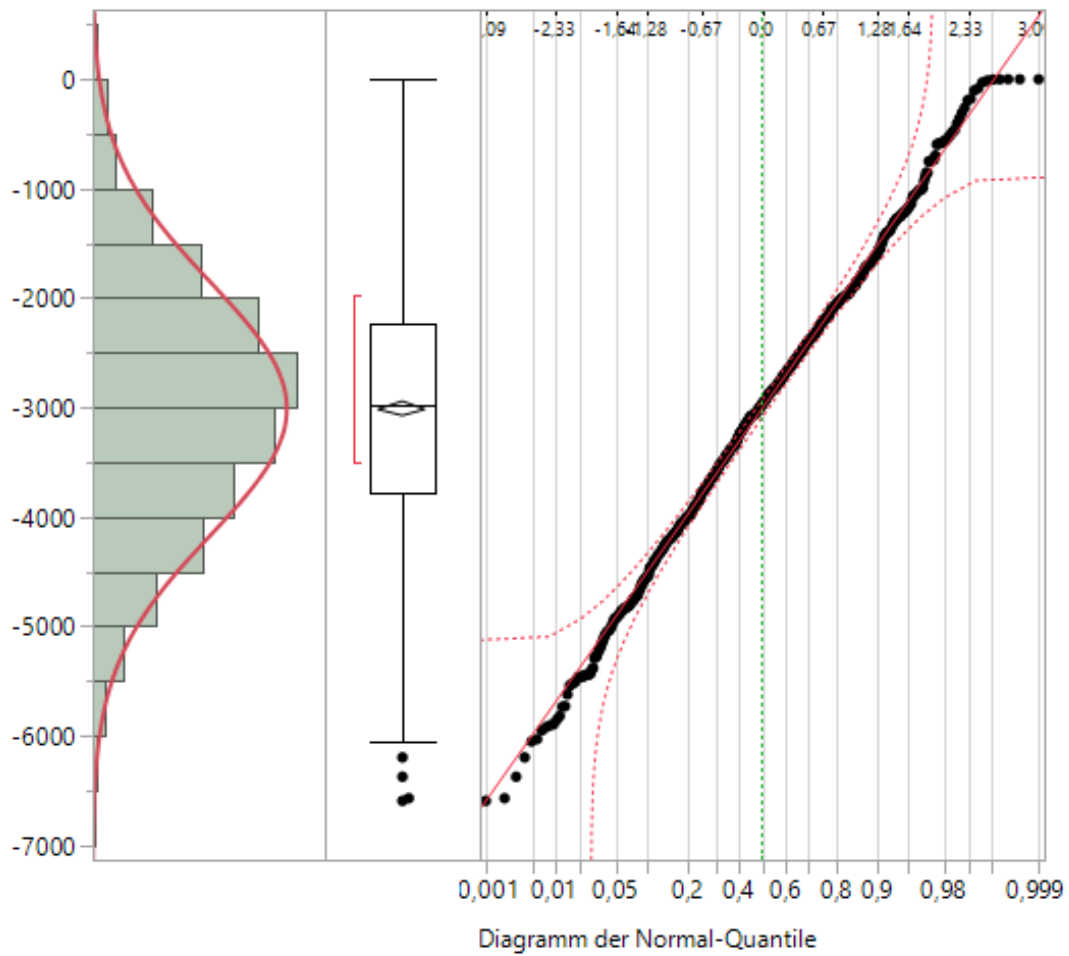


Abb. 11: Grafische Darstellung aller I_{sc} -Werte von Berechnungsnummer 33569 (exemplarisch).

Links: Histogramm mit Normalverteilungskurve; Mitte: Box-Plot nach explorativer Datenanalyse (EDA); Rechts: Q-Q-Diagramm

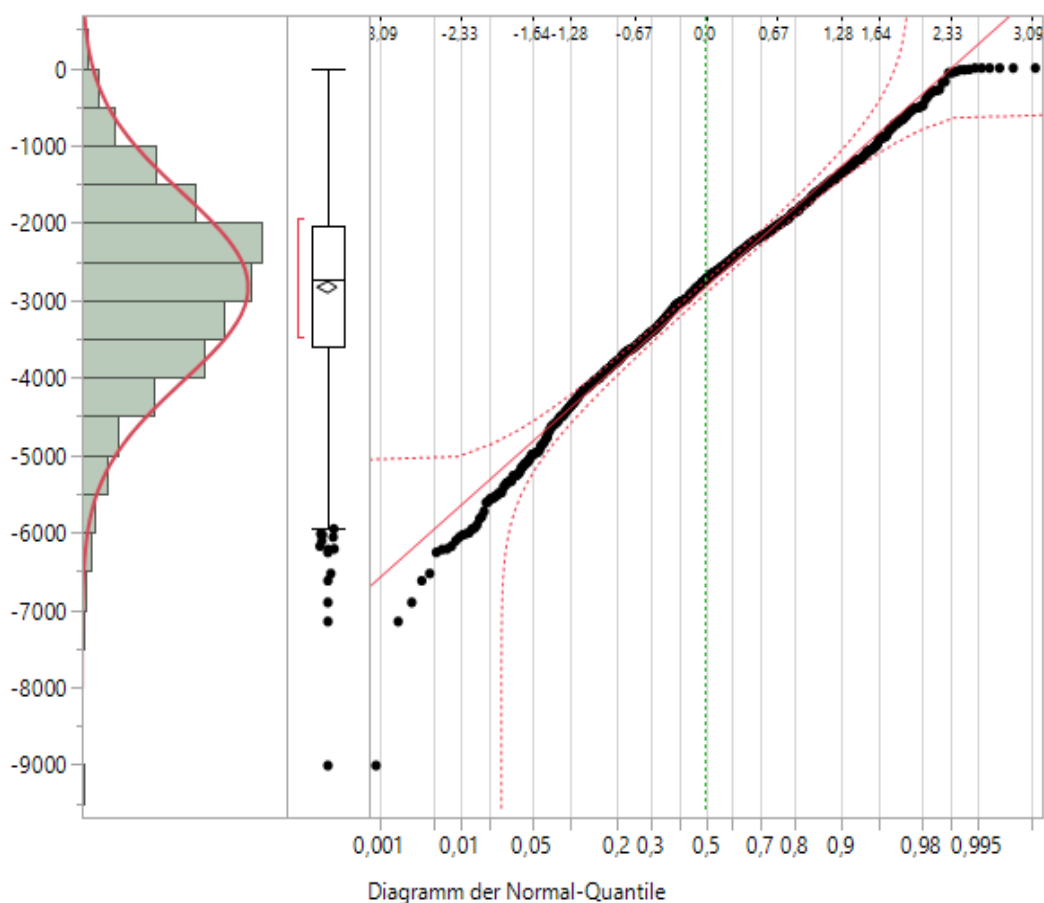


Abb. 12: Grafische Darstellung aller I_{sc}-Werte von Berechnungsnummer 32522 (exemplarisch).

Links: Histogramm mit Normalverteilungskurve; Mitte: Box-Plot nach explorativer Datenanalyse (EDA); Rechts: Q-Q-Diagramm

3.6.8 Prüfung des I_{sc} auf Normalverteilung anhand ausgewählter Kriterien zur Auswahl des statistischen Testverfahrens

Das genaue Vorgehen für die Prüfung auf Normalverteilung der vorliegenden Daten wurde bereits in 3.6.7 erläutert. Beschränkt man sich in der statistischen Auswertung nur auf die ausgewählten Modellnummern (s. Tab. 33), die für die detaillierte Auswertung der Rezeptor-Liganden-Bindungen selektiert wurden (s. 3.6.2 und 3.6.3) so zeigen sich folgende Ergebnisse:

1. Bei ausschließlicher Betrachtung von I_{sc}-Werten der Modelle, die eine Bindung zwischen MICA und TCR ausschließlich über die δ -Kette zeigen, sowie derer, die die Bindung von MICA und TCR sowohl über γ - als auch δ -Kette vornehmen – wie gezeigt für die Probanden Nr. 01 und

- 07 – kann eine Normalverteilung der I_{sc}-Werte bei einem Wert das Shapiro-W-Wilk Tests ($<W$) von 0,1200 und einer über alle Tests hinweg festgelegten Irrtumswahrscheinlichkeit von $<5\%$ ($\alpha < 0,05$) nicht ausgeschlossen werden.
2. Bei Probandenpaarung Nr. 02 und 05 kann bei identischen Bedingungen wie für die Probanden 01/07 (s. Unterpunkt 1) mit einem Wert des Shapiro-W-Wilk Tests von 0,0037 ($\alpha < 0,05$ Irrtumswahrscheinlichkeit) eine Normalverteilung ausgeschlossen werden.
 3. Betrachtet man die Probanden 01/02/05/07 zusammengefasst hinsichtlich der ausgewählten Modelle auf Bindung zwischen MICA und TCR δ -Kette ($<W = 0,9682$), sowie MICA und γ/δ -Kette des TCR getrennt voneinander, kann eine Normalverteilung nicht ausgeschlossen werden ($<W = 0,1455$).

Allerdings ist bei allen Testungen auf Normalverteilung zu beachten, dass es sich um eine sehr kleine Stichprobenzahl handelt und deshalb zwangsläufig mit einer höheren Fehlerwahrscheinlichkeit im Testverfahren auszugehen ist. Da für eine Testung auf Normalverteilung mittels Shapiro-W-Wilk-Test mindestens 3 Beobachtungen/Modelle notwendig sind, müssen die I_{sc}-Scores der Probanden 01 und 07, sowie 02 und 05 zusammengefasst werden. Bei ausschließlicher Betrachtung der Bindungsereignisse zwischen MICA und TCR δ -Kette innerhalb der oben erwähnten Probandenpaarung käme man auf eine Anzahl von einem (Paarung 02/05) bzw. zwei (Paarung 01/07) Modell(en), was für eine Analyse auf normalverteilte I_{sc}-Werte mittels Shapiro-W-Wilk-Test nicht ausreichen würde.

Tab. 33: Tabellarische Darstellung der Auswahlkriterien für die Prüfung auf Normalverteilung der Energieniveaus.

Darstellung der 3 unterschiedlichen Eingruppierungen für die Prüfung auf Normalverteilung. Die Zahl gibt den jeweiligen Unterpunkt der Eingruppierung an (s. 3.6.8). Die farbliche Kodierung dient der Übersichtlichkeit.

Proband	Berechnungsnummer	Modellnummer	I_sc	Bindung mit TCR-Kette	Auswahlgruppe für statistische Auswertung		
					1	2	3
01	33569	0535	-2970	δ	1		3
01	33570	0568	-2774	δ	1		3
01	33569	0464	-2974	γ/δ	1		3
01	33570	0353	-2774	γ/δ	1		3
07	32522	0147	-2738	γ/δ	1		3
07	32523	0521	-2911	γ/δ	1		3
02/05	33528	0511	-2688	γ/δ		2	3
02/05	33528	0528	-2688	γ/δ		2	3
02	39519	0132	-2636	γ/δ		2	3
02	39519	0712	-2639	γ/δ		2	3
05	33571	0026	-3107	γ/δ		2	3
05	33571	0084	-2589	δ		2	3

3.6.9 Prüfung auf den statistischen Unterschied der Energieniveaus anhand von Berechnungsnummern

Für den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Kurzform: Wilcoxon-Test) wurden die I_sc von Berechnungsnummer 33569 und 33570 bzw. 32522 und 32523 zusammengefasst und anschließend gegenübergestellt. Ziel war es zu prüfen, ob es zu signifikanten Unterschieden in der freiwerdenden Energie bei Bindung von T-Zell-Rezeptor und Ligand MICA zwischen den Probanden kommt, die einen Hinweis auf eine höhere Bindungsaffinität zu einer bestimmten MICA-Variante geben könnte.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit α wurde wie in 3.6.7 ebenfalls auf 5% ($\alpha < 0,05$) festgelegt. Es zeigte sich, dass die Unterschiede zwischen den Berechnungsmodellen und damit Probanden Nr. 01 und 07 mit 0,3798 nicht signifikant waren. Eine grafische Darstellung ist der Abbildung Abb. 13 zu entnehmen.

Das Gleiche Vorgehen erfolgte für die Probanden Nr. 02 und 05. Hier wurden die zahlreichen I_{sc} der Berechnungsmodelle 39519 und 33528 bzw. 33528 und 33571 zusammengefasst und gegenübergestellt. Es zeigte sich hier ebenfalls, dass die Unterschiede zwischen den Probanden und Modellen mit 0,3273 nicht signifikant waren. Das Berechnungsmodell 33528 kann für beide Probanden herangezogen werden, da beide die MICA-Variante *008 als Proteinsequenz aufweisen. Eine grafische Darstellung ist der Abbildung Abb. 14 zu entnehmen. Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass die frei werdende Energie (I_{sc}), bei der Bindung von TCR mit autologem, sowie allogenen MICA Liganden keinen signifikanten Unterschied aufweist. Dies gilt sowohl für die vergleichende Betrachtung der I_{sc} -Werte in der Bindungssimulation von Proband Nr. 01 und 07, wie auch Proband Nr. 02 und 05 mit autologem und allogenen MICA-Aminosäuresequenzen.

Ergebnis

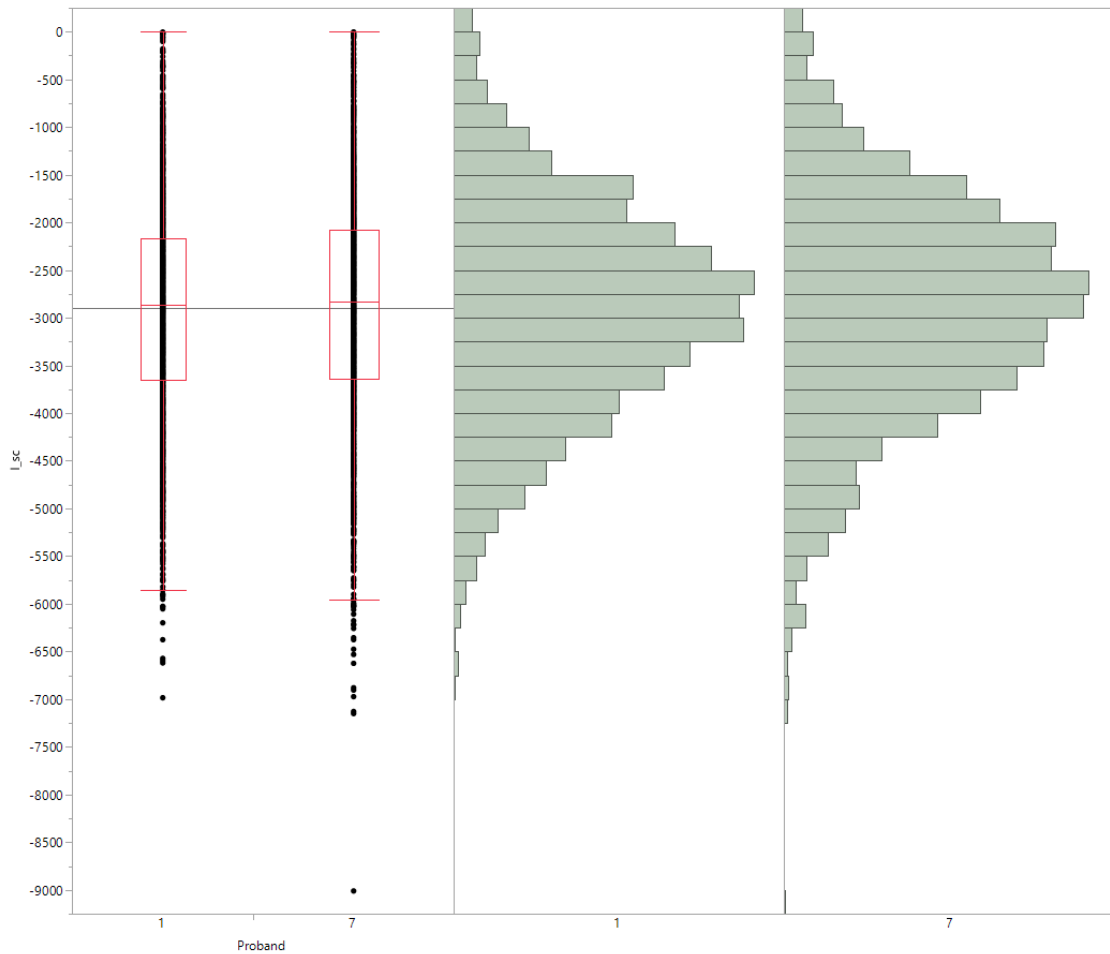


Abb. 13: Kumulative, grafische Darstellung der I_{sc} -Werte von Proband 01 und 07 gegenübergestellt.

Proband 01: I_{sc} der Berechnungsnummer 33569 und 33570 zusammengefasst. Proband 07: I_{sc} der Berechnungsnummer 32522 und 32523 zusammengefasst.

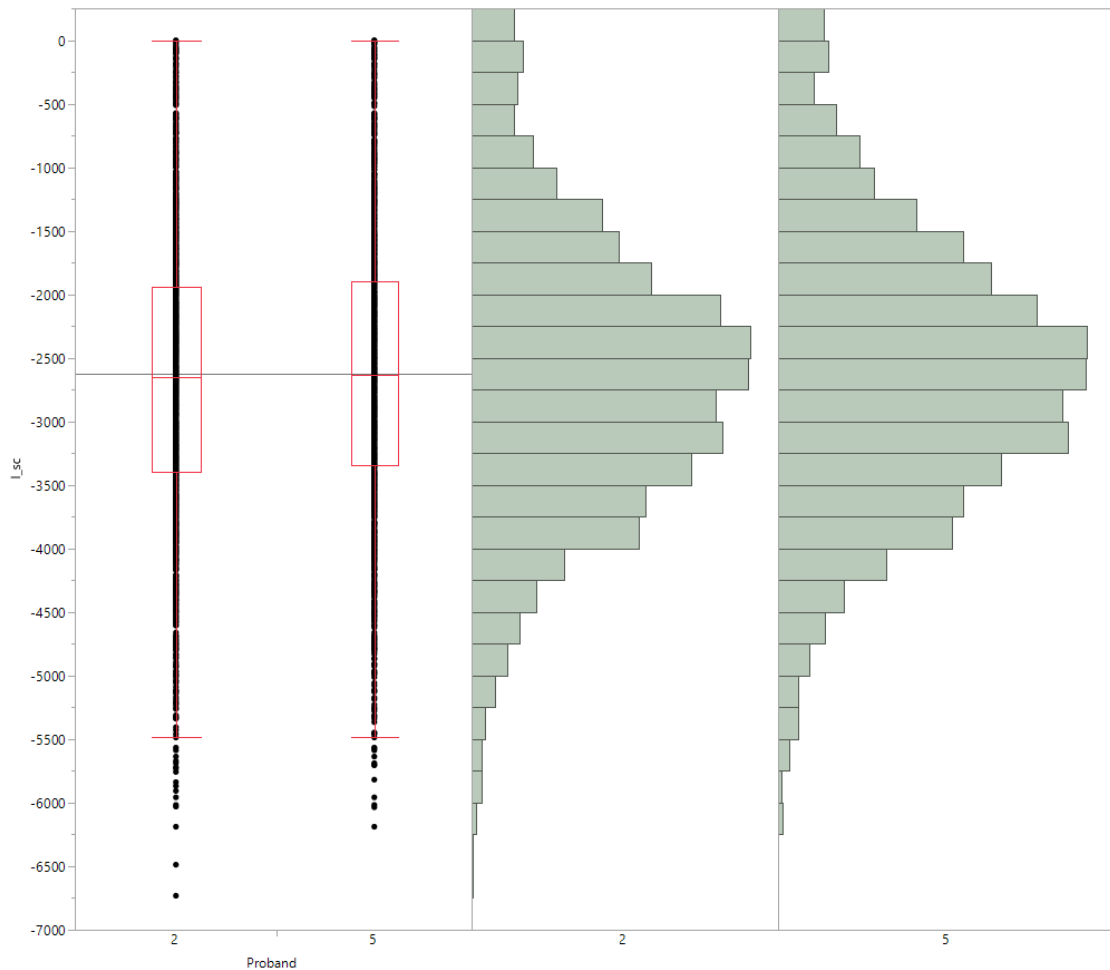


Abb. 14: Kumulative, grafische Darstellung der I_{sc} -Werte von Proband 02 und 05 gegenübergestellt.

Proband 02: I_{sc} der Berechnungsnummer 39519 und 33528 zusammengefasst. Proband 05: I_{sc} der Berechnungsnummer 33528 und 33571 zusammengefasst.

3.6.10 Prüfung auf den statistischen Unterschied der Energieniveaus der TCR MICA Bindungsmodelle anhand ausgewählter Kriterien

Das Vorgehen für die Auswertung statistisch signifikanter Unterschiede im Energieniveau mittels Wilcoxon-Tests wurde bereits eingehend in 3.6.9 erläutert.

Folgende Kriterien wurden bei der Auswertung herangezogen (s. Tab. 34)

1. Bei ausschließlicher Betrachtung von I_{sc} -Werten der Modelle die nur eine Bindung zwischen MICA und der TCR δ -Kette, im Vergleich zur

Ergebnis

Bindung zwischen MICA und γ -sowie δ -Kette des TCR bei Probanden Nr. 01 und 07 beim Wilcoxon-Test ein Wert von 0,8143 aufweist.

2. Bei Probanden Nr. 02 und 05 ergibt sich für die in Unterpunkt 1. genannten Bindungsverhalten für die Probanden 01 und 07 ein Wert im Wilcoxon-Test von 0,1375.
3. Betrachtet man für alle Probanden (02, 05, 01, 07) die ausgewählten Modelle auf Bindung zwischen MICA und TCR δ -Kette, sowie MICA und γ/δ -Kette des TCR ergibt sich ein Wert von 0,8528 im Wilcoxon-Test.

Bei allen 3 Auswahlkriterien für die statistische Beurteilung zeigt sich, dass bei einer festgelegten Irrtumswahrscheinlichkeit von $<5\%$ ($\alpha < 0,05$) und Anwendung des Wilcoxon-Tests, keiner der oben genannten Bedingungen einen statistisch signifikanten Unterschied in den Energieniveaus der jeweiligen Gruppen zeigt.

Tab. 34: Tabellarische Darstellung der Auswahlkriterien für die Prüfung auf Unterschiede statistischer Signifikanz im Energieniveau.

Darstellung der 3 unterschiedlichen Eingruppierungen für die Prüfung auf statistisch Signifikante Unterschied. Die Zahl gibt die jeweiligen Auswahlkriterien an (s. 3.6.10). Die farbliche Trennung zeigt die einzelnen Modellgruppen innerhalb einer Eingruppierung (1, 2 oder 3) an, die gegeneinander verglichen werden.

Proband	Berechnungsnummer	Modellnummer	I_sc	Bindung mit TCR-Kette	Auswahlgruppe für statistische Auswertung		
					1	2	3
01	33569	0535	-2970	δ	1	-	3
01	33570	0568	-2774	δ	1	-	3
01	33569	0464	-2974	γ/δ	1	-	3
01	33570	0353	-2774	γ/δ	1	-	3
07	32522	0147	-2738	γ/δ	1	-	3
07	32523	0521	-2911	γ/δ	1	-	3
02/05	33528	0511	-2688	γ/δ	-	2	3
02/05	33528	0528	-2688	γ/δ	-	2	3
02	39519	0132	-2636	γ/δ	-	2	3
02	39519	0712	-2639	γ/δ	-	2	3
05	33571	0026	-3107	γ/δ	-	2	3
05	33571	0084	-2589	δ	-	2	3

4 Diskussion

Sowohl MICA, als auch $\gamma\delta$ -TCR-Lymphozyten sind Komponenten des Immunsystems, deren Charakter und Funktion trotz jahrzehntelanger Forschung bis heute nicht geklärt sind (Choy and Phipps, 2010; Wilson and Stanfield, 2001). MICA ist selten aber konstitutiv auf der Zelloberfläche von gesunden Epithelzellen vorhanden (Chen and Gyllensten, 2014) und wird insbesondere bei Zellstress hochreguliert. Stressoren sind dabei Infektionen mit verschiedenen Pathogenen wie auch Autoimmunerkrankungen, sowie Transformierung im Zuge maligner Entartung (Amroun *et al.*, 2005; Carapito *et al.*, 2017; Das *et al.*, 2001; Gambelunghe *et al.*, 1999; Gonzalez-Escribano *et al.*, 1999; Groh *et al.*, 1996; Groh *et al.*, 2001; Groh *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2003; Hüe *et al.*, 2004; Orchard *et al.*, 2001; Tieng *et al.*, 2002; Wei, Zhang and Li, 2016; Yoshida *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016).

$\gamma\delta$ -T-Lymphozyten können nach Aktivierung ein Kaleidoskop an immunregulatorischen unter anderen sowohl zytokinsezernierende, wie auch -zytotoxische bzw. – zytolytische Funktionen ausüben, potent antigenpräsentierende Eigenschaften gegenüber konventionellen T-Zellen zeigen oder aber das krasse Gegenteil davon bewirken, nämlich $\alpha\beta$ T-Zellantworten potent supprimieren. Die kleine CD4⁺ Gruppe der V δ 1⁺ $\gamma\delta$ -T Zellentität, deren TCR wir hier untersuchen, besitzt sogar $\alpha\beta$ T-Zellprogenitorcharakter (Brandes *et al.*, 2009; Brandes, Willmann and Moser, 2005; Chien, Meyer and Bonneville, 2014; Ferrick *et al.*, 1995; Follows *et al.*, 1992; Haas, Pereira and Tonegawa, 1993; Lang *et al.*, 1995; Munk, Gatrill and Kaufmann, 1990; Nishimura *et al.*, 1995; Skeen and Ziegler, 1995; Subauste *et al.*, 1995; Tsukaguchi, Balaji and Boom, 1995).

Sowohl MICA als auch $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten sind mit GvHD nach Stammzelltransplantation (HSCT) in Zusammenhang gebracht worden (Apithy *et al.*, 2018; Minculescu and Sengelov, 2015; Pabst *et al.*, 2007; Zou and Stastny, 2010). Eine voneinander unabhängige Nennung von MICA und $\gamma\delta$ -T-Zellen ist jedoch zwingend notwendig, da $\gamma\delta$ -T-Zellen *per se* nicht nur nicht alloreaktiv sind, sondern MICA, der Ligand für gewebeständige V δ 1⁺ -T-Zellen, jedoch nicht für die zahlenmäßig in der Peripherie deutlich größere Population der V δ 2⁺ $\gamma\delta$ -T

Zellen ist. Allerdings ist MICA der Ligand von NKG2D (neben den bekannten ULBP1-4) und somit aktivierend für NKG2D tragende $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ -T Zellen (Das *et al.*, 2001).

Der TCR von $V\delta 1^+$ -T-Lymphozyten erkennt neben dem stressregulierten MICA auch MICB und CD1-Moleküle (Davey *et al.*, 2018; Groh *et al.*, 1998; Groh *et al.*, 1999; Spada *et al.*, 2000; Wu, Groh and Spies, 2002) während $V\delta 2^+$ -T Zellen fast ausschließlich BTN3A1 Moleküle als Liganden erkennen können (Harly *et al.*, 2012; Rhodes, Reith and Trowsdale, 2016; Sebestyen *et al.*, 2016).

Ziel dieser Arbeit war es die Rolle des Bindungspaares $V\delta 1$ /MICA in der GVHD näher zu beleuchten und zu klären, ob potenzielle Disparitäten durch *mica* Polymorphismen von Spender und Empfänger die Aktivierung von $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ -TCR tragenden T-Lymphozyten beeinflussen bzw. modulieren können. Deshalb wurden die Bindungsaffinitäten (=Bindungsstärke) von Rezeptor und Ligand, im Vergleich autolog vs. allogene untersucht. Die dafür zu erfassende Bindungsstärke von Rezeptor und Ligand sollte mithilfe von Computeralgorithmen erfasst und errechnet werden, ob ein signifikanter Unterschied in der freiwerdenden Energie im autologen versus allogenen Ansatz festgestellt werden kann.

Voraussetzung für die komparative Analyse des Bindungsverhaltens war die molekulare Charakterisierung der Spender. Da die TCR-Sequenzen mehrerer Spender bereits vorlagen, wurden die *mica* Allele der Spender molekular definiert. Die Sequenzierung der 9 Probanden zeigte neben individuellen *mica*-Sequenzen allelische Varianten, die verschiedene Spender besitzen. So fanden sich bei Proband Nr. 01, 02 und 05 bis 09 mehrere Übereinstimmungen in der Basenabfolge, welche zu in der Datenbank des EMBL-EBI eingepflegten MICA-Varianten passten. Daraus ergab sich beispielsweise, dass Proband Nr. 02 und 05 beide die Variante MICA*008:01:01/*008:01:02/*008:04 aufweisen, wohingegen Proband Nr. 01 (MICA*002:01 und *012:01) und 07 (MICA*009:01 und *018:01) keine gemeinsamen MICA-Varianten besitzen.

Proband Nr. 01 weist eine Besonderheit auf, da hier an Position 56 in Exon 2 ein eindeutiger biallelischer SNP vorhanden ist. Position 56 in Exon 2 ist als SNP-

Position durchaus bekannt, allerdings passt die von uns identifizierte SNP Variante zu keiner der bisher in der Datenbank bekannten Varianten (s.3.3). Da das Signal für die Basen Thymin und Cytosin in der Sequenzierung eindeutig ist (s. Abb. 7), stellt der Nachweis dieses SNP eine neue Genvariante dar, die als solche noch nicht gelistet ist. Da Position 56 eine Wobble-Base im Basentriplet darstellt, kommt es aufgrund des degenerierten genetischen Codes jedoch zu keiner Änderung des Proteins, da das Basentriplet an dieser Stelle für die gleiche Aminosäure codiert. Daraus folgend kommt es zu keiner Änderung des Bindungsverhaltens an dieser Stelle.

Proband Nr. 03, sowie 04 besitzen eindeutig jeweils nur eine MICA-Variante, da hier keine Hinweise auf Biallelität in der Sequenzierung auftraten (s. 3.3).

Die durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Schilbach identifizierten TCR-Sequenzen von *in vitro* klonierten CD4⁺ V δ 1⁺ $\gamma\delta$ -T-Zell-Populationen verzeichneten zum Teil identische CDR3-Regionen in V δ 1⁺ TCRs bei unterschiedlichen Spendern (Schilbach et al., unpublished). Der Nachweis identischer T-Zell-Rezeptor-Sequenzen in V δ 1⁺ T-Zell-Populationen der Probanden Nr. 01 und 07, sowie der Probanden Nr. 02 und 05 veranlasste uns dazu mit Computermodellen wie in 2.15 beschrieben das energetische Niveau des Bindungsverhalten dieser TCRs mit den autologen bzw. allogenen MICA Varianten des Spenders zu untersuchen der die gleiche CDR3-TCR-Sequenz besitzt.

In diesen Berechnungen zeigte sich interessanterweise, dass sich die Werte freier werdender Energie (I_{sc}) bei Rezeptor-Liganden-Bindung der einzelnen Probandenpaare nicht signifikant unterschieden (s. 3.6.9). Der I_{sc} definiert die Energiemenge, die sich im Chimärmolekül nach Rezeptor-Ligand-Bindung befindet abzüglich der Energie beider Bindungspartner allein und ist das Maß der Energie, die bei Bindung von Rezeptor an den Ligand freigesetzt wird.

Dies würde sich sinnmäßig mit bereits veröffentlichten Ergebnissen decken, die nachweisen konnten, dass MICA und V δ 1⁺ $\gamma\delta$ -TCRs keine stark energetische Bindung miteinander eingehen (Chien, Meyer and Bonneville, 2014; Xu *et al.*, 2011).

Die Funktion von T-Zellen wird im $\alpha\beta$ T-Zellkompartiment maßgeblich über den TCR gesteuert. Die Aktivierungsmodi im $\gamma\delta$ T-Zellkompartiment sind untersucht aber nicht im Detail verstanden. Da sowohl $V\delta 2^+$ als auch $V\delta 1^+$ T-Zellen Selbstantigene erkennen, ist ihr Bindungsverhalten zum Liganden erwartungsgemäß insgesamt deutlich niederaffiner als das von Effektor $\alpha\beta$ T-Zellen zum kognaten Antigen (Hampl *et al.*, 1999).

$\gamma\delta$ -TCR Signalstärken können jedoch moduliert werden, zum Beispiel über die Integration von synergischen Pathways über Integrine, NK-Zell-Rezeptoren und Zytokine (IL-12/IL18) (Domae *et al.*, 2017; Siegers, 2018). Bekannt ist seit kurzem eine Konformationsänderung im TCR-Signalkomplex (CD3CC) (Dopfer *et al.*, 2014) oder unphysiologisch die Aktivierung durch Antikörper, die eine hohe Affinität zum $\gamma\delta$ TCR haben und ihn stark stimulieren (Zhou *et al.*, 2012). Die daraus resultierende zytolytische Funktion wird für adoptive T-Zelltherapien bei Tumoren zu nutzen versucht. Was physiologisch diese TCRs triggert ist weiterhin im Focus intensiver Forschungen.

Einen möglichen Erklärungsansatz, dass trotz schwachen Bindungsverhaltens eine Aktivierung resultieren könnte, liefert Wright (2009) indem er zeigt, dass eine hohe Rezeptordichte auf der Zellmembran und die Addition multipler schwacher Bindungen zu einem ausreichend hohen Aktivierungssignal führen können, das in der Lage ist, eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang zu bringen und gleichzeitig die reversible Rezeptor-Liganden-Bindungen gewährleistet.

Die Aktivierung der $V\delta 1^+$ T-Zellen durch MICA stellt sich auch Xu *et al.* (2011) nicht über eine hohe Bindungsaffinität vor, sondern durch das Zusammenspiel aus schwacher Bindung und ungewöhnlich langanhaltender Bindungsdauer.

So zeigen Interaktionen zwischen Membranproteinen häufig eine niedrige Bindungsaffinität (Davis *et al.*, 1998; van der Merwe, P A and Barclay, 1994; Wright, 2009).

Die von uns identifizierte niedrige Bindungsenergie zwischen TCR und MICA entspricht den in diesen Arbeiten gewonnenen Ergebnissen.

Das sehr niedrig energetische Bindungsverhalten von $V\delta 1^+$ -TCRs und MICA macht es jedoch wahrscheinlich, dass nicht ausschließlich über diese Komponente definiert wird.

Wu, Groh and Spies (2002) zeigten damit übereinstimmend auch, dass eine Aktivierung von $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen durch ausschließlich MICA nicht erfolgt und Groh *et al.* (2001), Hüe *et al.* (2003), Steinle, Groh and Spies (1998), sowie Zhao *et al.* (2006) folgern, dass ein „second signal model“ vorliegen könnte, in dem die Wechselwirkung von $\gamma\delta$ -T-Zellen und MICA als erstes Signal gewertet wird und NKG2D durch Interaktion mit einem seiner bekannten Liganden das zweite Signal liefert, das letztlich die Aktivierung triggert/lizenziert.

Xu *et al.* (2011) folgern analog, dass eine Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten nur durch eine ausreichend hohe Konzentration von MHC class I-homologen MIC-Selbstantigenen wie MICA und MICB („MIC-Liganden“) auf der Zelloberfläche, sowie die simultane Bindung von MIC-Liganden an NKG2D vorliegen muss, sodass die gleichzeitigen, stimulierenden Signale von TCR und co-stimulierenden Rezeptoren (NKG2D) eine Induktion der Aktivierungskaskade von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten erzeugen. Sie vermuten sogar, dass die Bindung von NKG2D-Rezeptor und MIC-Liganden initiiert wird und im weiteren Verlauf die länger anhaltenden Bindungen zwischen $\gamma\delta$ -TCR und MIC-Liganden ermöglicht.

Weil die Bindung an MICA allein über $V\delta 1$ erfolgt, entsprechen diejenigen Rezeptor-Liganden-Bindungsmodelle der Realität wohl am ehesten, welche ausschließlich von einer Bindung mit der δ -Kette des TCR an MICA ausgehen. Stellt man die I_{sc} -Werte der Modelle von Probanden 01/07, die ausschließlich eine Rezeptor-Liganden-Bindung mit der TCR δ -Kette, den Modellen die Bindungen mit der TCR γ - und - δ -Kette eingehen gegenüber, zeigt sich erstaunlicherweise auch hier kein signifikanter Unterschied in der durch Bindung freigesetzten Energie. Gleiches zeigt sich für die Probandenkonstellation 02/05. Stellt man von beiden Probandenpaaren 01/07 und 02/05 die I_{sc} -Werte der Modelle mit ausschließlicher Bindung zur TCR δ -Kette den Modellen mit Bindungen mit der γ - und - δ -Kette des TCR gegenüber, zeigt sich statistisch ebenfalls kein signifikanter Unterschied (s. 3.6.10). Diese Erkenntnis verstärkt die

Annahme weiter, dass die Aktivierung von V δ 1⁺ $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten durch Bindung an MICA eher nicht das primäre Ziel der Rezeptor-Ligandenpaarung darstellt.

Niederaffine Bindungen gehen auch Moleküle der adaptiven Immunität ein, so das Co-Rezeptormolekül CD4. In der Publikation von Jonsson *et al.* (2016) wird gezeigt, dass die Bindung von CD4 mit peptide-major histocompatibility class II (pMHC II) schwach, aber messbar ist. Ergebnisse, die identisch sind zu den bereits 1993 im Bindungsverhalten von CD4 und MHC-II im Mausmodell gezeigten (Weber and Karjalainen, 1993). Die Aufgabe von CD4 liegt nicht wie lange vermutet in der Stabilisierung der TCR- Ligandenbindung, sondern vielmehr, wie man heute weiß in der Rekrutierung der Kinase Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) (Artyomov *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2004; Stepanek *et al.*, 2014), welche immunorezeptortyrosinkinasebasierte Aktivierungsmotive phosphoryliert und damit die T-Zellaktivierung erst ermöglicht (Artyomov *et al.*, 2010; Stepanek *et al.*, 2014).

Interessanterweise besteht eine Parallele zwischen der V δ 1 Kette des TCR und CD4, nämlich die, dass beide die korrekte Lokalisation der Zelle ermöglichen. Während CD4 für die Lokalisation der CD4⁺ T-Zellen an die antigenpräsentierende Zelle sorgt, fungiert V δ 1 durch Bindung an MICA, das konstitutiv auf Zelloberflächen der Epithelien exprimiert wird, neben einem korrekten homing, gleichzeitig – durch tonisches Signaling – für die zum Überleben wichtigen Signale. Der betreffenden V δ 1⁺ T-Zellentität würden damit exakt dort, wo sie „Barrier Immunity“ zu leisten hat – in Warteposition während der Homöostase – für das Überleben notwendige Stimuli vermittelt, ohne sie dabei permanent zu aktivieren, denn das würde autoimmunen Prozessen Vorschub leisten und zur Erschöpfung dieses T-Zellkompartments führen (Freitas and Rocha, 1999; Hayday and Spencer, 2009; Siegers, 2018).

Dass $\gamma\delta$ T-Lymphozyten mit einer identen T-Zell-Rezeptorsequenz in verschiedenen Probanden gefunden wurde, die keine idente MICA-Variante aufweisen, wie Proband Nr. 01 und 07 (s. 3.3), sowie die Tatsache, dass alle vier

untersuchten *mica* Allelvarianten der beiden Probanden gleiches Bindungsverhalten zu ein und demselben TCR zeigen, legt die Vermutung nahe, dass MICA nicht das „kognate Antigen“ ist und/oder dass die SNPs, welche die unterschiedlichen MICA-Varianten kennzeichnen, keinen signifikanten und schon gar keinen alleinigen Einfluss auf das Bindungsverhalten zwischen TCR und Ligand haben. Die biochemischen Eigenschaften in den potenziellen Bindungsbereichen von MICA durch den Aminosäureaustausch sind geringfügig, und wohl energetisch zu gering in der Konsequenz, um die Bindung wesentlich zu beeinflussen (s. 3.5). Die vollständig disparaten *mica* Allele der Spender 01 und 07 werden von einem geteilten *micb*-Allel komplettiert, was offenlässt, ob die Selektion des TCR möglicherweise über dieses *micb*-Allel, einen weiteren V δ 1 Liganden aus der MIC Familie, erfolgte und *micb* so die Spezifität dieses TCR definiert hat.

Um qualitative Unterschiede in potenziell autologen bzw. allogenen Bindungsverhalten zu erkennen, untersuchten wir die Kontakte von V δ 1 zu MICA näher in Bezug auf die Kontaktpunkte, die δ - und γ -Kette zum Liganden knüpfen. Bekannt ist, dass ausschließlich V δ 1 die Bindung an MICA definiert (Wu, Groh and Spies, 2002; Zhao *et al.*, 2006).

Interessanterweise fanden wir in der TCR/MICA-Paarung der 02/05 Konstellation (eine MICA Variante gemeinsam) in den näher untersuchten Modellen nur eins von sechs, welches eine ausschließliche Bindung zwischen MICA mit der δ -Kette des TCR einging. Bei diesem Modell lagen insgesamt 6 Kontakte vor, davon 3 Kontakte in der CDR1-Region und 3 Kontakte außerhalb jeder CDR-Region liegend. Im Gegensatz dazu wurde die ausschließliche Bindung von MICA an die δ -Kette des TCR in zwei von sechs Modellen der 01/07 Paarung gezeigt, die keine gemeinsame MICA-Variante aufwiesen. In einem Modell fand die Bindung ausschließlich über die CDR2-Region (1 Kontaktpunkt) und CDR3-Region (2 Kontaktpunkte) statt. Die Kontaktpunkte zwischen MICA und der TCR δ -Kette des anderen Modells waren in der CDR1-Region (3 Kontaktpunkte), CDR2-Region (1 Kontaktpunkt) und außerhalb der CDR-Region (1 Kontaktpunkt).

Ob dies eine hypothetisierte Selektion über MICB untermauert ist zumindest nicht auszuschließen, denn die Bindung an MICA erfolgt zwar überwiegend durch V δ 1 aber nicht zwingend über die CDR3-Region, die Region, die konserviert in dem V δ 1⁺ TCR MICA komplett disparater Spender vorliegt, die jedoch eine MICB Variante teilen.

Im Hinblick auf eine Beteiligung an der GvHD sprechen die bisherigen Erkenntnisse sowie die hier bestimmten niedrigen energetischen Bindungsniveaus nur vordergründig dafür, dass es eher unwahrscheinlich ist, dass die oben genannte Rezeptor-Liganden-Interaktion für eine T-Zell-Aktivierung ausreichend und damit für das Auftreten von GvHD mitverantwortlich zu machen ist. Die GvHD ist ein Krankheitsbild, das sich aus einer afferenten Aktivierungsphase und einer efferenten Phase darstellt. Während der Entwicklung einer GvHD wird eine mehrstufige Aktivierungskaskade in Gang gesetzt, wobei eine Beteiligung der V δ 1 Entität an der GvHD durchaus denkbar ist (Wu, Groh and Spies, 2002; Zhao *et al.*, 2006).

Per se ist die nur niedrig affine Bindung des TCR an seinen Liganden – ein Selbstantigen – Voraussetzung und Kennzeichen für ein selbsttolerantes Verhalten. Im pathophysiologischen Kontext der GvHD sind durch Inflammation jedoch zum einen vermehrt Liganden, die zu einem Triggering beitragen können und/oder die Zytokine vorhanden, die im Gewebe zu finden sind, das nach Chemo- und Strahlentherapie und eventuell endogen aufflammender viraler Infektionen vorgeschädigt ist. Die so forcierte Aktivierung in Gewebeschädigung einmünden zu sehen wäre gänzlich entgegen der Natur der $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Homöostase, in der sie maßgeblich durch Sezernierung von keratinocyte growth factor (KGF) und vieler trophischer Faktoren die Integrität der Gewebe aufrechterhalten. „Threshold decisions“ wie sie multifunktionale Gedächtnis-T-Zellen („memory T-Zellen“) zeigen – und $\gamma\delta$ T-Zellen sind memory T-Zellen – die in einem entsprechend entzündlichen Microenvironment statt pathogeninfizierte auch tumoröse und bei Persistenz der Noxe, normale Gewebezellen töten, wäre im Kontext einer GvHD auch bei V δ 1 $\gamma\delta$ T-Zellen nicht auszuschließen.

In Bezug auf die Rolle von MICA in der GvHD zeigt sich interessanterweise abhängig der codierten Aminosäure an SNP-Position 129 ein geändertes Bindungsverhalten zum NKG2D-Rezeptor. Wird an dieser Stelle für ein Methionin (Met) codiert kommt es zu einer stärkeren Bindung an NKG2D im Vergleich zur Kodierung für Valin an dieser Position (Baranwal and Mehra, 2017; Steinle *et al.*, 2001). Dieses geänderte Bindungsverhalten führt zu einem stärkeren und schnelleren NKG2D-Signaling, welches zu einer höheren Toxizität und Freisetzung von Interferon- γ durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen), sowie schneller Co-Stimulation und Aktivierung von CD8+-T-Zellen führt. Allerdings kommt es gleichzeitig zu einer schnelleren und stärkeren Herunterregulierung des NKG2D-Rezeptors auf NK-Zellen und CD8+-T-Lymphozyten im Vergleich zur Isoform mit Valin an gleicher Position (Isernhagen *et al.*, 2015). Boukouaci *et al.* (2009) fanden bei Patienten mit Expression von *mica* Valin/Valin an Position 129 auf Genebene ein erhöhtes Risiko an einer chronischen Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD) nach Stammzelltransplantation (HSCT) zu erkranken. Dagegen zeigten Personen mit *mica*-129 Met ein erhöhtes Risiko einer akuten GvHD nach HSCT, wobei das Vorhandensein von nur einem Allel an dieser Position den Schweregrad und die Letalität im Vergleich zu *mica*-129 Met/Met reduzierte (Isernhagen *et al.*, 2015).

In dieser Arbeit zeigten sich ausschließlich Proband Nr. 01, 03 und 04 homozygot für die Aminosäure Methionin an Position 129. Proband Nr. 02, 05, 07, 08 und 09 zeigten sowohl diese Basenabfolge für Methionin wie auch Valin. Nur Proband Nr. 06 zeigte eine homozygotes Basentriplet und codiert für die Aminosäure Valin (s. Tab. 5). In Bezug auf die Bindungsmöglichkeiten zwischen T-Zell-Rezeptor und dem Ligand MICA in den ausgewerteten Bindungsmodellen zeigte sich in keinem der ausgewerteten Modelle eine Bindung zwischen dem T-Zell-Rezeptor und dem Liganden MICA an Position 129. In diesem Zusammenhang ist allerdings hervorzuheben, dass sich die oben erläuterten Erkenntnisse durch Steinle *et al.* und Isernhagen *et al.* ausschließlich auf die Interaktion zwischen dem NKG2D-Rezeptor und MICA und nicht zwischen T-Zell-Rezeptor und MICA beziehen.

Um eine beliebige molekulare Interaktionen beschreiben zu können bedarf es nach Wright (2009) 3er Aussagen:

1. Die Bindungs- und Dissoziationsrate (kinetische Analyse).
2. Die Höhe der Enthalpie und Entropie (thermodynamische Analyse).
3. Die strukturelle Konformation des gebundenen und ungebundenen Proteins, sowie die Strukturänderungen während der Bindung und die an der Bindung beteiligten Aminosäuren.

Um Daten aller drei Gruppen für eine Rezeptor-Liganden-Interaktion zu erhalten ist ein sehr hoher technischer Arbeitsaufwand notwendig, der methodisch und strukturell nur in spezialisierten Gruppen in Kooperation umsetzbar ist. Die in dieser Promotion vorgenommenen Untersuchungen unterlagen daher zwangsläufig Limitationen. Die *in silico* erzeugten Rezeptor-Liganden-Modelle, bzw. errechneten Interaktionen stellen einen Kompromiss aus Wirklichkeit und aktuellen Möglichkeiten der modernen Nachweis- bzw. Computertechnik dar. Insbesondere die in 2.16 erläuterte Simulation von Rezeptor- und Ligandenbindung ist nur eine Annäherung, die einerseits durch die Rechenkapazitäten und andererseits durch die Programmierung der Simulation an sich limitiert ist. Wir haben uns für den Computeralgorithmus „docking2“ von ROSIE Rosetta entschieden, da dieser mit seinen ca. 1000 erzeugten Modellen pro Berechnungseingabe eine hohe Validität, bei einem umsetzbaren Berechnungsaufwand darstellt (s. 2.16 und 2.19). Aus diesen rund 1000 Modellen haben wir uns für die Modelle zur näheren Auswertung entschieden, die anhand der frei werdenden Energie (I_{sc}) den Median aller erzeugten Modelle dieser Berechnungseingabe darstellt, da die Wirklichkeit nicht im Bereich des höchsten oder niedrigsten I_{sc} vermutet wird (unphysiologische Bindungswahrscheinlichkeit). Bei einer geraden Anzahl an Modellen wurden die Modelle die energetisch den Ober- und Untermedian darstellen zur Auswertung herangezogen (s. 2.17).

Rein theoretisch können unbegrenzt viele Interaktionsmöglichkeiten errechnet werden, wenn unlimitierte Freiheitsgrade für die Rezeptor-Liganden-Interaktion zugelassen wären. Aufgrund der daraus resultierenden, nahezu unendlichen

Kombinationsmöglichkeit können potenzielle Umlagerungsvorgänge von Proteinstrukturen bei diesem Computeralgorithmus nicht berücksichtigt werden. Die benötigte Rechenleistung, um dies in einer angemessenen Zeit zu ermöglichen hätte die technischen Möglichkeiten, die diesem Forschungsprojekt bei Umsetzung zur Verfügung standen, gesprengt. So wurde für eine bessere Ergebnisqualität als es mit eigenen Rechenkapazitäten möglich gewesen wäre, die frei verfügbaren Server von Rosie RosettaDock Server genutzt (s. 2.16).

Aufgrund des verwendeten, validierten Computeralgorithmus und der daraus resultierenden hohen Ergebnisgenauigkeit ist davon auszugehen, dass bei Verwendung einer noch höheren Rechenleistung die exakten Energiewerte von den hier erzeugten in ihrer Detailgenauigkeit weiter zunehmen, da die Berechnungen für jedes Modell aufwendiger erfolgen könnten, jedoch die Ergebnisse dieser Arbeit in Ihrer Kernaussage gleich bleiben.

Durch den fortschreitenden Einsatz von Quantencomputern (Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2018; Reiher *et al.*, 2017; Solenov, Brieler and Scherrer, 2018) wird die Methodik komplexe Modelle in einem Bruchteil der aktuell benötigten Zeit errechnen zu können mehr genutzt werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass es trotz der aktuellen und zukünftigen Rechenkapazitäten nicht möglich sein wird das Risiko einer potenziellen GvHD anhand von computerbasierten Modellen vorhersagen zu können. Die biologische Komplexität dieser Thematik ist dramatisch und nur zum Teil verstanden, weshalb die „wet lab“-basierte Untersuchung der Wahrheit wohl näher liegt, als die noch stärker vereinfachten *in situ* Analysen. Computerbasierte Modelle können dabei wie bisher unterstützen was konventionelle, experimentelle Forschung an biologischen Vorgängen versucht zu erklären und zu verstehen.

Die Befunde dieser Arbeit werfen neben Fragen zur Spezifität des TCR und seiner selektionierenden Liganden – nichtkonservierte Liganden werden von invarianten Rezeptoren mit gleichen Affinitäten gebunden – dringende Fragen nach der Funktion und Rolle des TCR der $\gamma\delta$ T-Zellentität auf, die so offensichtliche und gravierende Unterschiede zu der des TCR im $\alpha\beta$ T-Zellkompartiment zeigen.

Das Wissen darüber was V δ 1 T-Zellen aktiviert und was sie nach Aktivierung an funktionellen Repertoires zeigen, wäre ein wichtiger Baustein im virtuellen Gefüge von Immunität und Selbsttoleranz und könnte helfen zu erkennen, welche Rolle diese Zellen im pathophysiologischen Kontext der Abstoßungsreaktion spielen.

5 Zusammenfassung

Das konstitutiv exprimierte Oberflächenprotein MICA und V δ 1+ $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptoren von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten wurden bereits als Liganden-Rezeptor-Paarung identifiziert. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage inwieweit und ob sich das bisher festgestellte niederaffine Bindungsverhalten zwischen MICA und TCR im autologen sowie allogenen Setting anhand von computergestützten Bindungsmodellen signifikant unterscheidet. Die hier identifizierten MICA Varianten der 9 Probanden konnten in 10 verschiedene, bereits publizierte MICA- und 14 MICB-Varianten eingruppiert werden.

Besonderheiten wurden identifiziert für Proband Nr. 01, der an Position 56 der *mica*-Sequenz – mit einem biallelischen SNP, der allerdings auf keine der bisher gelisteten MICA-Varianten der Datenbank zutrifft – den Hinweis auf einen bisher nicht bekannten Genpolymorphismus liefert. Bei Proband Nr. 02 zeigte die Zuordnung der Variante MICA*045 die Auffälligkeit, dass an Position 251 die Aminosäure Glutaminsäure codiert sein müsste. Bei dem Probanden findet sich jedoch eine Basenabfolge für die Aminosäuren Arginin bzw. Glutamin. Beide Befunde könnten abschließend für die Zuordnung einer neuen allelischen Variante nur im Kontext mit ergänzenden Sequenzierungen von *mica* Exon 1 bestimmt werden.

Für die computergestützten Bindungssimulationen wurden die Probandenpaarungen 01/07 und 02/05 ausgewählt, da für diese Paarungen bereits in Vorarbeiten klonale CD4+ V δ 1+ $\gamma\delta$ T-Zell-Populationen etabliert werden konnten, für die für beide Spender jeweils identische CDR3-Binderegionen in den V δ 1 T-Zell-Rezeptor-Sequenzen identifiziert wurden. In der Bindungssimulation von individuellem TCR mit autologem und allogennem MICA-Protein der Probandenpaarungen 01/07, sowie 02/05 zeigte sich, dass sich die Bindungen von MICA auf die Bereiche von Exon 2 und 3 beschränkte. Die potenziellen Bindungsstellen des TCR waren bei Proband 01, 02 und 05 überwiegend innerhalb der δ -Kette, bei Proband 07 innerhalb der γ -Kette lokalisiert.

Die statistische Auswertung der Differenzen der Bindungsniveaus ergab, dass keine signifikanten Unterschiede an frei werdender Energie des Rezeptors bzw.

Liganden im Vergleich vor und nach Bindung (Chimärmolekül, ca. 1000 Modelle pro Berechnung) nachzuweisen sind. So konnte mithilfe des Wilcoxon-Tests mit einem Wert von 0,3798 bei Proband Nr. 01 und 07, sowie 0,3273 bei Proband Nr. 02 und 05 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($\alpha < 0,05$) ein signifikanter Unterschied im Gesamtenergieniveau vor und nach Bindung ausgeschlossen werden. Bei statistischer Betrachtung der I_{sc} -Werte der ausgewählten Modelle (s. 3.6.2 und 3.6.3) auf ihr Bindungsverhalten fanden sich bei gleichbleibend festgelegter Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($\alpha < 0,05$) im Wilcoxon-Test ebenfalls keine signifikanten Unterschiede für freigesetzte Energie von Rezeptor und Ligand in Modellen, in denen die Bindung von MICA an den TCR ausschließlich über die δ -Kette erfolgt (physiologisch, in vivo) gegenüber Modellen, in welchen die Bindung über sowohl die γ - als auch die δ -Kette bewerkstelligt wird.

Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass die in dieser Dissertation durch den Einsatz von computergestützten multiplen individuellen Bindungsmodellen gewonnenen Erkenntnisse sich mit den bisherigen publizierten Ergebnissen decken und einen weiteren Hinweis darauf liefern, dass eine alleinige, starke Aktivierung von T-Lymphozyten durch MICA nicht gegeben ist und nur einen Schritt in einer komplexen immunologischen Aktivierungskaskade darstellt.

6 Anhang

					5					10					
A2_Var001_BS	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAT	AAC	CTC	ACG	GTG	CTG	TCC	TGG	
A2_Var001_AS	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	T	V	L	S	W	
P01_A2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAT	AAC	CTC	ACG	GTG	CTG	TCC	GGG	
P01_A2_BS2														T	
P01_A2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	T	V	L	S	G	
P01_A2_AS2														W	
P02_A2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAT	AAC	CTC	ACG	GTG	CTG	TCC	TGG	
P02_A2_BS2															
P02_A2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	T	V	L	S	W	
P02_A2_AS2															
P03_A2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAT	AAC	CTC	ACG	GTG	CTG	TCC	GGG	
P03_A2_BS2															
P03_A2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	T	V	L	S	G	
P03_A2_AS2															
P04_A2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAT	AAC	CTC	ACG	GTG	CTG	TCC	GGG	
P04_A2_BS2															
P04_A2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	T	V	L	S	G	
P04_A2_AS2															
P05_A2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAT	AAC	CTC	ACG	GTG	CTG	TCC	GGG	
P05_A2_BS2														T	
P05_A2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	T	V	L	S	G	
P05_A2_AS2														W	
P06_A2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAT	AAC	CTC	ACG	GTG	CTG	TCC	TGG	
P06_A2_BS2															
P06_A2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	T	V	L	S	W	
P06_A2_AS2															
P07_A2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAT	AAC	CTC	ACG	GTG	CTG	TCC	TGG	
P07_A2_BS2															
P07_A2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	T	V	L	S	W	
P07_A2_AS2															
P08_A2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAT	AAC	CTC	ACG	GTG	CTG	TCC	TGG	
P08_A2_BS2															
P08_A2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	T	V	L	S	W	
P08_A2_AS2															
P09_A2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAT	AAC	CTC	ACG	GTG	CTG	TCC	GGG	
P09_A2_BS2														T	
P09_A2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	T	V	L	S	G	
P09_A2_AS2														W	

Abb. 15: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 2 (Position 1-14).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A2 = mica Exon 2, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	15	20	25											
A2_Var001_BS	GAT	GGA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTC	ACT	GAG	GTA	CAT	CTG
A2_Var001_AS	D	G	S	V	Q	S	G	F	L	T	E	V	H	L
P01_A2_BS1	GAT	GGA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTC	GCT	GAG	GTA	CAT	CTG
P01_A2_BS2										A				
P01_A2_AS1	D	G	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	V	H	L
P01_A2_AS2										T				
P02_A2_BS1	GAT	GGA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTT	GCT	GAG	GTA	CAT	CTG
P02_A2_BS2										C				
P02_A2_AS1	D	G	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	V	H	L
P02_A2_AS2										L				
P03_A2_BS1	GAT	GGA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTC	GCT	GAG	GTA	CAT	CTG
P03_A2_BS2														
P03_A2_AS1	D	G	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	V	H	L
P03_A2_AS2														
P04_A2_BS1	GAT	GGA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTC	GCT	GAG	GTA	CAT	CTG
P04_A2_BS2														
P04_A2_AS1	D	G	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	V	H	L
P04_A2_AS2														
P05_A2_BS1	GAT	GGA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTT	GCT	GAG	GTA	CAT	CTG
P05_A2_BS2										C				
P05_A2_AS1	D	G	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	V	H	L
P05_A2_AS2										L				
P06_A2_BS1	GAT	GGA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTT	GCT	GAG	GTA	CAT	CTG
P06_A2_BS2														
P06_A2_AS1	D	G	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	V	H	L
P06_A2_AS2														
P07_A2_BS1	GAT	GGA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTT	GCT	GAG	GTA	CAT	CTG
P07_A2_BS2										C				
P07_A2_AS1	D	G	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	V	H	L
P07_A2_AS2										L	T			
P08_A2_BS1	GAT	GGA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTT	GCT	GAG	GTA	CAT	CTG
P08_A2_BS2										C				
P08_A2_AS1	D	G	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	V	H	L
P08_A2_AS2										L	T			
P09_A2_BS1	GAT	GGA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTT	GCT	GAG	GTA	CAT	CTG
P09_A2_BS2										C				
P09_A2_AS1	D	G	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	V	H	L
P09_A2_AS2										L				

Abb. 16: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 2 (Position 15-28).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A2 = mica Exon 2, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	30	35	40											
A2_Var001_BS	GAT	GGT	CAG	CCC	TTC	CTG	CGC	TGT	GAC	AGG	CAG	AAA	TGC	AGG
A2_Var001_AS	D	G	Q	P	F	L	R	C	D	R	Q	K	C	R
P01_A2_BS1	GAT	GGT	CAG	CCC	TTC	CTG	CGC	TGT	GAC	AGG	CAG	AAA	TGC	AGG
P01_A2_BS2														
P01_A2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	C	D	R	Q	K	C	R
P01_A2_AS2														
P02_A2_BS1	GAT	GGT	CAG	CCC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	TGC	AGG
P02_A2_BS2								G						
P02_A2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	C	R
P02_A2_AS2								C						
P03_A2_BS1	GAT	GGT	CAG	CCC	TTC	CTG	CGC	TGT	GAC	AGG	CAG	AAA	TGC	AGG
P03_A2_BS2														
P03_A2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	C	D	R	Q	K	C	R
P03_A2_AS2														
P04_A2_BS1	GAT	GGT	CAG	CCC	TTC	CTG	CGC	TGT	GAC	AGG	CAG	AAA	TGC	AGG
P04_A2_BS2														
P04_A2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	C	D	R	Q	K	C	R
P04_A2_AS2														
P05_A2_BS1	GAT	GGT	CAG	CCC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	TGC	AGG
P05_A2_BS2								G						
P05_A2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	C	R
P05_A2_AS2								C						
P06_A2_BS1	GAT	GGT	CAG	CCC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	TGC	AGG
P06_A2_BS2														
P06_A2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	C	R
P06_A2_AS2														
P07_A2_BS1	GAT	GGT	CAG	CCC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	TGC	AGG
P07_A2_BS2								G						
P07_A2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	C	R
P07_A2_AS2								C						
P08_A2_BS1	GAT	GGT	CAG	CCC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	TGC	AGG
P08_A2_BS2								G						
P08_A2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	C	R
P08_A2_AS2								C						
P09_A2_BS1	GAT	GGT	CAG	CCC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	TGC	AGG
P09_A2_BS2								G						
P09_A2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	C	R
P09_A2_AS2								C						

Abb. 17: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 2 (Position 29-42).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A2 = mica Exon 2, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

	45	50	55										
A2_Var001_BS	GCA	AAG	CCC	CAG	GGA	CAG	TGG	GCA	GAA	GAT	GTC	CTG	GG A
A2_Var001_AS	A	K	P	Q	G	Q	W	A	E	D	V	L	G
P01_A2_BS1	GCA	AAG	CCC	CAG	GGA	CAG	TGG	GCA	GAA	GAT	GTC	CTG	GG A
P01_A2_BS2													
P01_A2_AS1	A	K	P	Q	G	Q	W	A	E	D	V	L	G
P01_A2_AS2													
P02_A2_BS1	GCA	AAG	CCC	CAG	GGA	CAG	TGG	GCA	GAA	GAT	GTC	CTG	GG A
P02_A2_BS2													
P02_A2_AS1	A	K	P	Q	G	Q	W	A	E	D	V	L	G
P02_A2_AS2													
P03_A2_BS1	GCA	AAG	CCC	CAG	GGA	CAG	TGG	GCA	GAA	GAT	GTC	CTG	GG A
P03_A2_BS2													
P03_A2_AS1	A	K	P	Q	G	Q	W	A	E	D	V	L	G
P03_A2_AS2													
P04_A2_BS1	GCA	AAG	CCC	CAG	GGA	CAG	TGG	GCA	GAA	GAT	GTC	CTG	GG A
P04_A2_BS2													
P04_A2_AS1	A	K	P	Q	G	Q	W	A	E	D	V	L	G
P04_A2_AS2													
P05_A2_BS1	GCA	AAG	CCC	CAG	GGA	CAG	TGG	GCA	GAA	GAT	GTC	CTG	GG A
P05_A2_BS2													
P05_A2_AS1	A	K	P	Q	G	Q	W	A	E	D	V	L	G
P05_A2_AS2													
P06_A2_BS1	GCA	AAG	CCC	CAG	GGA	CAG	TGG	GCA	GAA	GAT	GTC	CTG	GG A
P06_A2_BS2													
P06_A2_AS1	A	K	P	Q	G	Q	W	A	E	D	V	L	G
P06_A2_AS2													
P07_A2_BS1	GCA	AAG	CCC	CAG	GGA	CAG	TGG	GCA	GAA	GAT	GTC	CTG	GG A
P07_A2_BS2													
P07_A2_AS1	A	K	P	Q	G	Q	W	A	E	D	V	L	G
P07_A2_AS2													
P08_A2_BS1	GCA	AAG	CCC	CAG	GGA	CAG	TGG	GCA	GAA	GAT	GTC	CTG	GG A
P08_A2_BS2													
P08_A2_AS1	A	K	P	Q	G	Q	W	A	E	D	V	L	G
P08_A2_AS2													
P09_A2_BS1	GCA	AAG	CCC	CAG	GGA	CAG	TGG	GCA	GAA	GAT	GTC	CTG	GG A
P09_A2_BS2													
P09_A2_AS1	A	K	P	Q	G	Q	W	A	E	D	V	L	G
P09_A2_AS2													

Abb. 18: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 2 (Position 43-55).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A2 = mica Exon 2, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2*

Anhang

					60					65				
A2_Var001_BS	AAT	AAG	ACA	TGG	GAC	AGA	GAG	ACC	AGA	GAC	TTG	ACA	GGG	AAC
A2_Var001_AS	N	K	T	W	D	R	E	T	R	D	L	T	G	N
P01_A2_BS1	AAC	AAG	ACA	TGG	GAC	AGA	GAG	ACC	AGG	GAC	TTG	ACA	GGG	AAC
P01_A2_BS2	T								A					
P01_A2_AS1	N	K	T	W	D	R	E	T	R	D	L	T	G	N
P01_A2_AS2	N								R					
P02_A2_BS1	AAT	AAG	ACA	TGG	GAC	AGA	GAG	ACC	AGG	GAC	TTG	ACA	GGG	AAC
P02_A2_BS2														
P02_A2_AS1	N	K	T	W	D	R	E	T	R	D	L	T	G	N
P02_A2_AS2														
P03_A2_BS1	AAT	AAG	ACA	TGG	GAC	AGA	GAG	ACC	AGG	GAC	TTG	ACA	GGG	AAC
P03_A2_BS2										A				
P03_A2_AS1	N	K	T	W	D	R	E	T	R	D	L	T	G	N
P03_A2_AS2									R					
P04_A2_BS1	AAT	AAG	ACA	TGG	GAC	AGA	GAG	ACC	AGG	GAC	TTG	ACA	GGG	AAC
P04_A2_BS2										A				
P04_A2_AS1	N	K	T	W	D	R	E	T	R	D	L	T	G	N
P04_A2_AS2									R					
P05_A2_BS1	AAT	AAG	ACA	TGG	GAC	AGA	GAG	ACC	AGG	GAC	TTG	ACA	GGG	AAC
P05_A2_BS2														
P05_A2_AS1	N	K	T	W	D	R	E	T	R	D	L	T	G	N
P05_A2_AS2														
P06_A2_BS1	AAT	AAG	ACA	TGG	GAC	AGA	GAG	ACC	AGG	GAC	TTG	ACA	GGG	AAC
P06_A2_BS2														
P06_A2_AS1	N	K	T	W	D	R	E	T	R	D	L	T	G	N
P06_A2_AS2														
P07_A2_BS1	AAT	AAG	ACA	TGG	GAC	AGA	GAG	ACC	AGG	GAC	TTG	ACA	GGG	AAC
P07_A2_BS2										A				
P07_A2_AS1	N	K	T	W	D	R	E	T	R	D	L	T	G	N
P07_A2_AS2									R					
P08_A2_BS1	AAT	AAG	ACA	TGG	GAC	AGA	GAG	ACC	AGG	GAC	TTG	ACA	GGG	AAC
P08_A2_BS2										A				
P08_A2_AS1	N	K	T	W	D	R	E	T	R	D	L	T	G	N
P08_A2_AS2									R					
P09_A2_BS1	AAT	AAG	ACA	TGG	GAC	AGA	GAG	ACC	AGG	GAC	TTG	ACA	GGG	AAC
P09_A2_BS2														
P09_A2_AS1	N	K	T	W	D	R	E	T	R	D	L	T	G	N
P09_A2_AS2														

Abb. 19: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *mica* Exon 2 (Position 56-69).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur *MICA* Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A2 = *mica* Exon 2, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	70	75	80											
A2_Var001_BS	GGA	AAG	GAC	CTC	AGG	ATG	ACC	CTG	GCT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG
A2_Var001_AS	G	K	D	L	R	M	T	L	A	H	I	K	D	Q
P01_A2_BS1	GGA	AAG	GAC	CTC	AGG	ATG	ACC	CTG	GCT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG
P01_A2_BS2														
P01_A2_AS1	G	K	D	L	R	M	T	L	A	H	I	K	D	Q
P01_A2_AS2														
P02_A2_BS1	GGA	AAG	GAC	CTC	AGG	ATG	ACC	CTG	GCT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG
P02_A2_BS2														
P02_A2_AS1	G	K	D	L	R	M	T	L	A	H	I	K	D	Q
P02_A2_AS2														
P03_A2_BS1	GGA	AAG	GAC	CTC	AGG	ATG	ACC	CTG	GCT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG
P03_A2_BS2														
P03_A2_AS1	G	K	D	L	R	M	T	L	A	H	I	K	D	Q
P03_A2_AS2														
P04_A2_BS1	GGA	AAG	GAC	CTC	AGG	ATG	ACC	CTG	GCT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG
P04_A2_BS2														
P04_A2_AS1	G	K	D	L	R	M	T	L	A	H	I	K	D	Q
P04_A2_AS2														
P05_A2_BS1	GGA	AAG	GAC	CTC	AGG	ATG	ACC	CTG	GCT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG
P05_A2_BS2														
P05_A2_AS1	G	K	D	L	R	M	T	L	A	H	I	K	D	Q
P05_A2_AS2														
P06_A2_BS1	GGA	AAG	GAC	CTC	AGG	ATG	ACC	CTG	GCT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG
P06_A2_BS2														
P06_A2_AS1	G	K	D	L	R	M	T	L	A	H	I	K	D	Q
P06_A2_AS2														
P07_A2_BS1	GGA	AAG	GAC	CTC	AGG	ATG	ACC	CTG	GCT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG
P07_A2_BS2														
P07_A2_AS1	G	K	D	L	R	M	T	L	A	H	I	K	D	Q
P07_A2_AS2														
P08_A2_BS1	GGA	AAG	GAC	CTC	AGG	ATG	ACC	CTG	GCT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG
P08_A2_BS2														
P08_A2_AS1	G	K	D	L	R	M	T	L	A	H	I	K	D	Q
P08_A2_AS2														
P09_A2_BS1	GGA	AAG	GAC	CTC	AGG	ATG	ACC	CTG	GCT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG
P09_A2_BS2														
P09_A2_AS1	G	K	D	L	R	M	T	L	A	H	I	K	D	Q
P09_A2_AS2														

Abb. 20: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 2 (Position 70-83).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A2 = mica Exon 2, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

	85
A2_Var001_BS	AAA GAA G
A2_Var001_AS	K E
P01_A2_BS1	AAA GAA G
P01_A2_BS2	
P01_A2_AS1	K E
P01_A2_AS	
P02_A2_BS1	AAA GAA G
P02_A2_BS2	
P02_A2_AS1	K E
P02_A2_AS2	
P03_A2_BS1	AAA GAA G
P03_A2_BS2	
P03_A2_AS1	K E
P03_A2_AS2	
P04_A2_BS1	AAA GAA G
P04_A2_BS2	
P04_A2_AS1	K E
P04_A2_AS2	
P05_A2_BS1	AAA GAA G
P05_A2_BS2	
P05_A2_AS1	K E
P05_A2_AS2	
P06_A2_BS1	AAA GAA G
P06_A2_BS2	
P06_A2_AS1	K E
P06_A2_AS2	
P07_A2_BS1	AAA GAA G
P07_A2_BS2	
P07_A2_AS1	K E
P07_A2_AS2	
P08_A2_BS1	AAA GAA G
P08_A2_BS2	
P08_A2_AS1	K E
P08_A2_AS2	
P09_A2_BS1	AAA GAA G
P09_A2_BS2	
P09_A2_AS1	K E
P09_A2_AS2	

Abb. 21: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 2 (Position 84-85).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A2 = mica Exon 2, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

		90							95					
A3_Var001_BS	GC	TTG	CAT	TCC	CTC	CAG	GAG	ATT	AGG	GTC	TGT	GAG	ATC	CAT
A3_Var001_AS	G	L	H	S	L	Q	E	I	R	V	C	E	I	H
P01_A3_BS1	GC	TTG	CAT	TCC	CTC	CAG	GAG	ATT	AGG	GTC	TGT	GAG	ATC	CAT
P01_A3_BS2														
P01_A3_AS1	G	L	H	S	L	Q	E	I	R	V	C	E	I	H
P01_A3_AS2														
P02_A3_BS1	GC	TTG	CAT	TCC	CTC	CAG	GAG	ATT	AGG	GTC	TGT	GAG	ATC	CAT
P02_A3_BS2														
P02_A3_AS1	G	L	H	S	L	Q	E	I	R	V	C	E	I	H
P02_A3_AS2														
P03_A3_BS1	GC	TTG	CAT	TCC	CTC	CAG	GAG	ATT	AGG	GTC	TGT	GAG	ATC	CAT
P03_A3_BS2														
P03_A3_AS1	G	L	H	S	L	Q	E	I	R	V	C	E	I	H
P03_A3_AS2														
P04_A3_BS1	GC	TTG	CAT	TCC	CTC	CAG	GAG	ATT	AGG	GTC	TGT	GAG	ATC	CAT
P04_A3_BS2														
P04_A3_AS1	G	L	H	S	L	Q	E	I	R	V	C	E	I	H
P04_A3_AS2														
P05_A3_BS1	GC	TTG	CAT	TCC	CTC	CGG	GAG	ATT	AGG	GTC	TGT	GAG	ATC	CAT
P05_A3_BS2						A								
P05_A3_AS1	G	L	H	S	L	R	E	I	R	V	C	E	I	H
P05_A3_AS2						Q								
P06_A3_BS1	GC	TTG	CAT	TCC	CTC	CAG	GAG	ATT	AGG	GTC	TGT	GAG	ATC	CAT
P06_A3_BS2														
P06_A3_AS1	G	L	H	S	L	Q	E	I	R	V	C	E	I	H
P06_A3_AS2														
P07_A3_BS1	GC	TTG	CAT	TCC	CTC	CAG	GAG	ATT	AGG	GTC	TGT	GAG	ATC	CAT
P07_A3_BS2														
P07_A3_AS1	G	L	H	S	L	Q	E	I	R	V	C	E	I	H
P07_A3_AS2														
P08_A3_BS1	GC	TTG	CAT	TCC	CTC	CAG	GAG	ATT	AGG	GTC	TGT	GAG	ATC	CAT
P08_A3_BS2														
P08_A3_AS1	G	L	H	S	L	Q	E	I	R	V	C	E	I	H
P08_A3_AS2														
P09_A3_BS1	GC	TTG	CAT	TCC	CTC	CGG	GAG	ATT	AGG	GTC	TGT	GAG	ATC	CAT
P09_A3_BS2						A								
P09_A3_AS1	G	L	H	S	L	R	E	I	R	V	C	E	I	H
P09_A3_AS2						Q								

Abb. 22: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 3 (Position 86-99).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A3 = mica Exon 3, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	100					105						110		
A3_Var001_BS	GAA	GAC	AAC	AGC	ACC	AGG	AGC	TCC	CAG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
A3_Var001_AS	E	D	N	S	T	R	S	S	Q	H	F	Y	Y	D
P01_A3_BS1	GAA	GAC	AAC	AGC	ACC	AGG	AGC	TCC	CAG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P01_A3_BS2														
P01_A3_AS1	E	D	N	S	T	R	S	S	Q	H	F	Y	Y	D
P01_A3_AS2														
P02_A3_BS1	GAA	GAC	AAC	AGC	ACC	AGG	AGC	TCC	CAG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P02_A3_BS2														
P02_A3_AS1	E	D	N	S	T	R	S	S	Q	H	F	Y	Y	D
P02_A3_AS2														
P03_A3_BS1	GAA	GAC	AAC	AGC	ACC	AGG	AGC	TCC	CAG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P03_A3_BS2														
P03_A3_AS1	E	D	N	S	T	R	S	S	Q	H	F	Y	Y	D
P03_A3_AS2														
P04_A3_BS1	GAA	GAC	AAC	AGC	ACC	AGG	AGC	TCC	CAG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P04_A3_BS2														
P04_A3_AS1	E	D	N	S	T	R	S	S	Q	H	F	Y	Y	D
P04_A3_AS2														
P05_A3_BS1	GAA	GAC	AAC	AGC	ACC	AGG	AGC	TCC	CAG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P05_A3_BS2														
P05_A3_AS1	E	D	N	S	T	R	S	S	Q	H	F	Y	Y	D
P05_A3_AS2														
P06_A3_BS1	GAA	GAC	AAC	AGC	ACC	AGG	AGC	TCC	CAG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P06_A3_BS2														
P06_A3_AS1	E	D	N	S	T	R	S	S	Q	H	F	Y	Y	D
P06_A3_AS2														
P07_A3_BS1	GAA	GAC	AAC	AGC	ACC	AGG	AGC	TCC	CAG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P07_A3_BS2														
P07_A3_AS1	E	D	N	S	T	R	S	S	Q	H	F	Y	Y	D
P07_A3_AS2														
P08_A3_BS1	GAA	GAC	AAC	AGC	ACC	AGG	AGC	TCC	CAG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P08_A3_BS2														
P08_A3_AS1	E	D	N	S	T	R	S	S	Q	H	F	Y	Y	D
P08_A3_AS2														
P09_A3_BS1	GAA	GAC	AAC	AGC	ACC	AGG	AGC	TCC	CAG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P09_A3_BS2														
P09_A3_AS1	E	D	N	S	T	R	S	S	Q	H	F	Y	Y	D
P09_A3_AS2														

Abb. 23: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *mica* Exon 3 (Position 100-113).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A3 = mica Exon 3, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

	130						135					140	
A3_Var001_BS	ACA	ATG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCC	ATG
A3_Var001_AS	T	M	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M
P01_A3_BS1	ACA	ATG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCC	ATG
P01_A3_BS2													
P01_A3_AS1	T	M	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M
P01_A3_AS2													
P02_A3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCC	ATG
P02_A3_BS2		A											
P02_A3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M
P02_A3_AS2		M											
P03_A3_BS1	ACA	ATG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCC	ATG
P03_A3_BS2													
P03_A3_AS1	T	M	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M
P03_A3_AS2													
P04_A3_BS1	ACA	ATG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCC	ATG
P04_A3_BS2													
P04_A3_AS1	T	M	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M
P04_A3_AS2													
P05_A3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCC	ATG
P05_A3_BS2		A											
P05_A3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M
P05_A3_AS2		M											
P06_A3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCC	ATG
P06_A3_BS2													
P06_A3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M
P06_A3_AS2													
P07_A3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCC	ATG
P07_A3_BS2		A											
P07_A3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M
P07_A3_AS2		M											
P08_A3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCC	ATG
P08_A3_BS2		A											
P08_A3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M
P08_A3_AS2		M											
P09_A3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCC	ATG
P09_A3_BS2		A											
P09_A3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M
P09_A3_AS2		M											

Abb. 25: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *mica* Exon 3 (Position 128-140).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A3 = mica Exon 3, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

		145							150					155					
A3_Var001_BS	AAC	G	T	C	AGG	AAT	TTC	TTG	AAG	GAA	GAT	GCC	A	T	G	AAG	ACC	AAG	ACA
A3_Var001_AS	N	V			R		N	F	L	K	E	D	A	M		K	T	K	T
P01_A3_BS1	AAC	G	T	C	AGG	AAT	TTC	TTG	AAG	GAA	GAT	GCC	A	T	G	AAG	ACC	AAG	ACA
P01_A3_BS2																			
P01_A3_AS1	N	V			R		N	F	L	K	E	D	A	M		K	T	K	T
P01_A3_AS2																			
P02_A3_BS1	AAC	G	T	C	AGG	AAT	TTC	TTG	AAG	GAA	GAT	GCC	A	T	G	AAG	ACC	AAG	ACA
P02_A3_BS2																			
P02_A3_AS1	N	V			R		N	F	L	K	E	D	A	M		K	T	K	T
P02_A3_AS2																			
P03_A3_BS1	AAC	G	T	C	AGG	AAT	TTC	TTG	AAG	GAA	GAT	GCC	A	T	G	AAG	ACC	AAG	ACA
P03_A3_BS2																			
P03_A3_AS1	N	V			R		N	F	L	K	E	D	A	M		K	T	K	T
P03_A3_AS2																			
P04_A3_BS1	AAC	G	T	C	AGG	AAT	TTC	TTG	AAG	GAA	GAT	GCC	A	T	G	AAG	ACC	AAG	ACA
P04_A3_BS2																			
P04_A3_AS1	N	V			R		N	F	L	K	E	D	A	M		K	T	K	T
P04_A3_AS2																			
P05_A3_BS1	AAC	G	T	C	AGG	AAT	TTC	TTG	AAG	GAA	GAT	GCC	A	T	G	AAG	ACC	AAG	ACA
P05_A3_BS2																			
P05_A3_AS1	N	V			R		N	F	L	K	E	D	A	M		K	T	K	T
P05_A3_AS2																			
P06_A3_BS1	AAC	G	T	C	AGG	AAT	TTC	TTG	AAG	GAA	GAT	GCC	A	T	G	AAG	ACC	AAG	ACA
P06_A3_BS2																			
P06_A3_AS1	N	V			R		N	F	L	K	E	D	A	M		K	T	K	T
P06_A3_AS2																			
P07_A3_BS1	AAC	G	T	C	AGG	AAT	TTC	TTG	AAG	GAA	GAT	GCC	A	T	G	AAG	ACC	AAG	ACA
P07_A3_BS2																			
P07_A3_AS1	N	V			R		N	F	L	K	E	D	A	M		K	T	K	T
P07_A3_AS2																			
P08_A3_BS1	AAC	G	T	C	AGG	AAT	TTC	TTG	AAG	GAA	GAT	GCC	A	T	G	AAG	ACC	AAG	ACA
P08_A3_BS2																			
P08_A3_AS1	N	V			R		N	F	L	K	E	D	A	M		K	T	K	T
P08_A3_AS2																			
P09_A3_BS1	AAC	G	T	C	AGG	AAT	TTC	TTG	AAG	GAA	GAT	GCC	A	T	G	AAG	ACC	AAG	ACA
P09_A3_BS2																			
P09_A3_AS1	N	V			R		N	F	L	K	E	D	A	M		K	T	K	T
P09_A3_AS2																			

Abb. 26: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 3 (Position 141-155).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A3 = mica Exon 3, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

		160							165						
A3_Var001_BS	CAC	TAT	CAC	GCT	ATG	CAT	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	GAA	CTA	CGG	
A3_Var001_AS	H	Y	H	A	M	H	A	D	C	L	Q	E	L	R	
P01_A3_BS1	CTC	TAT	CAC	GCT	ATG	CAT	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	GAA	CTA	CGG	
P01_A3_BS2	A														
P01_A3_AS1	L	Y	H	A	M	H	A	D	C	L	Q	E	L	R	
P01_A3_AS2	H														
P02_A3_BS1	CAC	TAT	CAC	GCT	ATG	CAT	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	GAA	CTA	CGG	
P02_A3_BS2															
P02_A3_AS1	H	Y	H	A	M	H	A	D	C	L	Q	E	L	R	
P02_A3_AS2															
P03_A3_BS1	CAC	TAT	CAC	GCT	ATG	CAT	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	GAA	CTA	CGG	
P03_A3_BS2															
P03_A3_AS1	H	Y	H	A	M	H	A	D	C	L	Q	E	L	R	
P03_A3_AS2															
P04_A3_BS1	CAC	TAT	CAC	GCT	ATG	CAT	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	GAA	CTA	CGG	
P04_A3_BS2															
P04_A3_AS1	H	Y	H	A	M	H	A	D	C	L	Q	E	L	R	
P04_A3_AS2															
P05_A3_BS1	CAC	TAT	CAC	GCT	ATG	CAT	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	GAA	CTA	CGG	
P05_A3_BS2															
P05_A3_AS1	H	Y	H	A	M	H	A	D	C	L	Q	E	L	R	
P05_A3_AS2															
P06_A3_BS1	CAC	TAT	CAC	GCT	ATG	CAT	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	GAA	CTA	CGG	
P06_A3_BS2															
P06_A3_AS1	H	Y	H	A	M	H	A	D	C	L	Q	E	L	R	
P06_A3_AS2															
P07_A3_BS1	CAC	TAT	CAC	GCT	ATG	CAT	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	GAA	CTA	CGG	
P07_A3_BS2															
P07_A3_AS1	H	Y	H	A	M	H	A	D	C	L	Q	E	L	R	
P07_A3_AS2															
P08_A3_BS1	CAC	TAT	CAC	GCT	ATG	CAT	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	GAA	CTA	CGG	
P08_A3_BS2															
P08_A3_AS1	H	Y	H	A	M	H	A	D	C	L	Q	E	L	R	
P08_A3_AS2															
P09_A3_BS1	CAC	TAT	CAC	GCT	ATG	CAT	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	GAA	CTA	CGG	
P09_A3_BS2															
P09_A3_AS1	H	Y	H	A	M	H	A	D	C	L	Q	E	L	R	
P09_A3_AS2															

Abb. 27: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 3 (Position 156-169).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A3 = mica Exon 3, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	170				175						180	
A3_Var001_BS	CGA	TAT	CTA	AAA	TCC	GGC	GTA	GTC	CTG	AGG	AGA	ACA G
A3_Var001_AS	R	Y	L	K	S	G	V	V	L	R	R	T
P01_A3_BS1	CGA	TAT	CTA	AAA	TCC	GGC	GTA	GTC	CTG	AGG	AGA	ACA G
P01_A3_BS2												
P01_A3_AS1	R	Y	L	K	S	G	V	V	L	R	R	T
P01_A3_AS2												
P02_A3_BS1	CGA	TAT	CTA	GAA	TCC	GGC	GTA	GTC	CTG	AGG	AGA	ACA G
P02_A3_BS2				A								
P02_A3_AS1	R	Y	L	E	S	G	V	V	L	R	R	T
P02_A3_AS2				K								
P03_A3_BS1	CGA	TAT	CTA	AAA	TCC	GGC	GTA	GTC	CTG	AGG	AGA	ACA G
P03_A3_BS2												
P03_A3_AS1	R	Y	L	K	S	G	V	V	L	R	R	T
P03_A3_AS2												
P04_A3_BS1	CGA	TAT	CTA	AAA	TCC	GGC	GTA	GTC	CTG	AGG	AGA	ACA G
P04_A3_BS2												
P04_A3_AS1	R	Y	L	K	S	G	V	V	L	R	R	T
P04_A3_AS2												
P05_A3_BS1	CGA	TAT	CTA	GAA	TCC	GGC	GTA	GTC	CTG	AGG	AGA	ACA G
P05_A3_BS2				A								
P05_A3_AS1	R	Y	L	E	S	G	V	V	L	R	R	T
P05_A3_AS2				K								
P06_A3_BS1	CGA	TAT	CTA	GAA	TCC	AGC	GTA	GTC	CTG	AGG	AGA	ACA G
P06_A3_BS2				A		G						
P06_A3_AS1	R	Y	L	E	S	S	V	V	L	R	R	R
P06_A3_AS2						G						T
P07_A3_BS1	CGA	TAT	CTA	GAA	TCC	AGC	GTA	GTC	CTG	AGG	AGA	ACA G
P07_A3_BS2				A		G						
P07_A3_AS1	R	Y	L	E	S	S	V	V	L	R	R	T
P07_A3_AS2				K		G						
P08_A3_BS1	CGA	TAT	CTA	GAA	TCC	GGC	GTA	GTC	CTG	AGG	AGA	ACA G
P08_A3_BS2				A								
P08_A3_AS1	R	Y	L	E	S	G	V	V	L	R	R	T
P08_A3_AS2				K								
P09_A3_BS1	CGA	TAT	CTA	GAA	TCC	GGC	GTA	GTC	CTG	AGG	AGA	ACA G
P09_A3_BS2				A								
P09_A3_AS1	R	Y	L	E	S	G	V	V	L	R	R	T
P09_A3_AS2				K								

Abb. 28: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *mica* Exon 3 (Position 170-181).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A3 = mica Exon 3, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

	185	190	195
A4_Var001_BS	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	CGC AGC	GAG GCC TCA GAG
A4_Var001_AS	V P P M V N V T	R S	E A S E
P01_A4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	CGC AGC	GAG GCC TCA GAG
P01_A4_BS2			
P01_A4_AS1	V P P M V N V T	R S	E A S E
P01_A4_AS2			
P02_A4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	CGC AGT	GAG GCC TCA GAG
P02_A4_BS2		C	
P02_A4_AS1	V P P M V N V T	R S	E A S E
P02_A4_AS2		S	
P03_A4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	CGC AGC	GAG GCC TCA GAG
P03_A4_BS2			
P03_A4_AS1	V P P M V N V T	R S	E A S E
P03_A4_AS2			
P04_A4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	CGC AGC	GAG GCC TCA GAG
P04_A4_BS2			
P04_A4_AS1	V P P M V N V T	R S	E A S E
P04_A4_AS2			
P05_A4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	CGC AGC	GAG GCC TCA GAG
P05_A4_BS2			
P05_A4_AS1	V P P M V N V T	R S	E A S E
P05_A4_AS2			
P06_A4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	CGC AGC	GAG GCC TCA GAG
P06_A4_BS2			
P06_A4_AS1	V P P M V N V T	R S	E A S E
P06_A4_AS2			
P07_A4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	CGC AGC	GAG GCC TCA GAG
P07_A4_BS2			
P07_A4_AS1	V P P M V N V T	R S	E A S E
P07_A4_AS2			
P08_A4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	CGC AGC	GAG GCC TCA GAG
P08_A4_BS2			
P08_A4_AS2	V P P M V N V T	R S	E A S E
P08_A4_AS2			
P09_A4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	CGC AGC	GAG GCC TCA GAG
P09_A4_BS1			
P09_A4_AS2	V P P M V N V T	R S	E A S E
P09_A4_AS2			

Abb. 29: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *mica* Exon 4 (Position 182-195).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur *MICA* Variante *001 sind. In *lila* ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit *biallelischen* SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A4 = *mica* Exon 4, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	200	205												
A4_Var001_BS	GGC	AAC	AT ^T	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCT ^T	G ^G GC	TTC	TAT	
A4_Var001_AS	G	N	I ^I	T	V	T	C	R	A	S ^S	G ^G	F	Y ^Y	
P01_A4_BS1	GGC	AAC	AT ^T	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCT ^T	G ^G GC	TTC	TAT	
P01_A4_BS2														
P01_A4_AS1	G	N	I ^I	T	V	T	C	R	A	S ^S	G ^G	F	Y ^Y	
P01_A4_AS2														
P02_A4_BS1	GGC	AAC	AT ^C	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC ^C	A ^A GC	TTC	TAT	
P02_A4_BS2														
P02_A4_AS1	G	N	I ^I	T	V	T	C	R	A	S ^S	S ^S	F	Y ^Y	
P02_A4_AS2			I ^I							S ^S	G ^G			
P03_A4_BS1	GGC	AAC	AT ^T	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCT ^T	G ^G GC	TTC	TAT	
P03_A4_BS2														
P03_A4_AS1	G	N	I ^I	T	V	T	C	R	A	S ^S	G ^G	F	Y ^Y	
P03_A4_AS2														
P04_A4_BS1	GGC	AAC	AT ^T	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCT ^T	G ^G GC	TTC	TAT	
P04_A4_BS2														
P04_A4_AS1	G	N	I ^I	T	V	T	C	R	A	S ^S	G ^G	F	Y ^Y	
P04_A4_AS2														
P05_A4_BS1	GGC	AAC	AT ^C	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC ^C	A ^A GC	TTC	TAT	
P05_A4_BS2														
P05_A4_AS1	G	N	I ^I	T	V	T	C	R	A	S ^S	S ^S	F	Y ^Y	
P05_A4_AS2			I ^I							S ^S	G ^G			
P06_A4_BS1	GGC	AAC	AT ^C	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC ^C	A ^A GC	TTC	TAT	
P06_A4_BS2														
P06_A4_AS1	G	N	I ^I	T	V	T	C	R	A	S ^S	S ^S	F	Y ^Y	
P06_A4_AS2														
P07_A4_BS1	GGC	AAC	AT ^C	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC ^C	A ^A GC	TTC	TAT	
P07_A4_BS2														
P07_A4_AS1	G	N	I ^I	T	V	T	C	R	A	S ^S	S ^S	F	Y ^Y	
P07_A4_AS2			I ^I							S ^S	G ^G			
P08_A4_BS1	GGC	AAC	AT ^C	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC ^C	A ^A GC	TTC	TAT	
P08_A4_BS2														
P08_A4_AS2	G	N	I ^I	T	V	T	C	R	A	S ^S	S ^S	F	Y ^Y	
P08_A4_AS2			I ^I							S ^S	G ^G			
P09_A4_BS1	GGC	AAC	AT ^C	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC ^C	A ^A GC	TTC	TAT	
P09_A4_BS1														
P09_A4_AS2	G	N	I ^I	T	V	T	C	R	A	S ^S	S ^S	F	Y ^Y	
P09_A4_AS2			I ^I							S ^S	G ^G			

Abb. 30: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 4 (Position 196-208).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A4 = mica Exon 4, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	210					215						220	
A4_Var001_BS	CCC	TGG	AAT	ATC	ACA	CTG	AGC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA
A4_Var001_AS	P	W	N	I	T	L	S	W	R	Q	D	G	V
P01_A4_BS1	CCC	TGG	AAT	ATC	ACA	CTG	AGC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA
P01_A4_BS2													
P01_A4_AS1	P	W	N	I	T	L	S	W	R	Q	D	G	V
P01_A4_AS2													
P02_A4_BS1	CCC	CGG	AAT	ATC	ATA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA
P02_A4_BS2		T			C		G						
P02_A4_AS1	P	R	N	I	I	L	I	W	R	Q	D	G	V
P02_A4_AS2		W			T		S						
P03_A4_BS1	CCC	TGG	AAT	ATC	ACA	CTG	AGC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA
P03_A4_BS2													
P03_A4_AS1	P	W	N	I	T	L	S	W	R	Q	D	G	V
P03_A4_AS2													
P04_A4_BS1	CCC	TGG	AAT	ATC	ACA	CTG	AGC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA
P04_A4_BS2													
P04_A4_AS1	P	W	N	I	T	L	S	W	R	Q	D	G	V
P04_A4_AS2													
P05_A4_BS1	CCC	CGG	AAT	ATC	ATA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA
P05_A4_BS2		T			C		G						
P05_A4_AS1	P	R	N	I	I	L	I	W	R	Q	D	G	V
P05_A4_AS2		W			T		S						
P06_A4_BS1	CCC	CGG	AAT	ATC	ATA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA
P06_A4_BS2					C								
P06_A4_AS1	P	R	N	I	I	L	I	W	R	Q	D	G	V
P06_A4_AS2					T								
P07_A4_BS1	CCC	CGG	AAT	ATC	ACA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA
P07_A4_BS2		T					G						
P07_A4_AS1	P	R	N	I	T	L	I	W	R	Q	D	G	V
P07_A4_AS2		W					S						
P08_A4_BS1	CCC	CGG	AAT	ATC	ATA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA
P08_A4_BS2		T			C		G						
P08_A4_AS1	P	R	N	I	I	L	I	W	R	Q	D	G	V
P08_A4_AS2		W			T		S						
P09_A4_BS1	CCC	CGG	AAT	ATC	ATA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA
P09_A4_BS2		T			C		G						
P09_A4_AS1	P	R	N	I	I	L	I	W	R	Q	D	G	V
P09_A4_AS2		W			T		S						

Abb. 31: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 4 (Position 209-221).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A4 = mica Exon 4, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	225	230											
A4_Var001_BS	TCT	TTG	AGC	CAC	GAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG
A4_Var001_AS	S	L	S	H	D	T	Q	Q	W	G	D	V	L
P01_A4_BS1	TCT	TTG	AGC	CAC	GAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG
P01_A4_BS2													
P01_A4_AS1	S	L	S	H	D	T	Q	Q	W	G	D	V	L
P01_A4_AS2													
P02_A4_BS1	TCT	TTG	AGC	CAC	GAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG
P02_A4_BS2													
P02_A4_AS1	S	L	S	H	D	T	Q	Q	W	G	D	V	L
P02_A4_AS2													
P03_A4_BS1	TCT	TTG	AGC	CAC	GAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG
P03_A4_BS2													
P03_A4_AS1	S	L	S	H	D	T	Q	Q	W	G	D	V	L
P03_A4_AS2													
P04_A4_BS1	TCT	TTG	AGC	CAC	GAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG
P04_A4_BS2													
P04_A4_AS1	S	L	S	H	D	T	Q	Q	W	G	D	V	L
P04_A4_AS2													
P05_A4_BS1	TCT	TTG	AGC	CAC	GAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG
P05_A4_BS2													
P05_A4_AS1	S	L	S	H	D	T	Q	Q	W	G	D	V	L
P05_A4_AS2													
P06_A4_BS1	TCT	TTG	AGC	CAC	GAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG
P06_A4_BS2													
P06_A4_AS1	S	L	S	H	D	T	Q	Q	W	G	D	V	L
P06_A4_AS2													
P07_A4_BS1	TCT	TTG	AGC	CAC	GAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG
P07_A4_BS2													
P07_A4_AS1	S	L	S	H	D	T	Q	Q	W	G	D	V	L
P07_A4_AS2													
P08_A4_BS1	TCT	TTG	AGC	CAC	GAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG
P08_A4_BS2													
P08_A4_AS1	S	L	S	H	D	T	Q	Q	W	G	D	V	
P08_A4_AS2													
P09_A4_BS1	TCT	TTG	AGC	CAC	GAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG
P09_A4_BS2													
P09_A4_AS1	S	L	S	H	D	T	Q	Q	W	G	D	V	L
P09_A4_AS2													

Abb. 32: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *mica* Exon 4 (Position 222-234).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur *MICA* Variante *001 sind. In *lila* ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A4 = *mica* Exon 4, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	235				240						245			
A4_Var001_BS	CCT	GAT	GGG	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	ACC	TGG	GTG	GCC	ACC	
A4_Var001_AS	P	D	G	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	
P01_A4_BS1	CCT	GAT	GGG	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	ACC	TGG	GTG	GCC	ACC	
P01_A4_BS2														
P01_A4_AS1	P	D	G	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	
P01_A4_AS2														
P02_A4_BS1	CCT	GAT	GGG	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	ACC	TGG	GTG	GCC	ACC	
P02_A4_BS2														
P02_A4_AS1	P	D	G	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	
P02_A4_AS2														
P03_A4_BS1	CCT	GAT	GGG	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	ACC	TGG	GTG	GCC	ACC	
P03_A4_BS2														
P03_A4_AS1	P	D	G	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	
P03_A4_AS2														
P04_A4_BS1	CCT	GAT	GGG	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	ACC	TGG	GTG	GCC	ACC	
P04_A4_BS2														
P04_A4_AS1	P	D	G	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	
P04_A4_AS2														
P05_A4_BS1	CCT	GAT	GGG	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	ACC	TGG	GTG	GCC	ACC	
P05_A4_BS2														
P05_A4_AS1	P	D	G	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	
P05_A4_AS2														
P06_A4_BS1	CCT	GAT	GGG	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	ACC	TGG	GTG	GCC	ACC	
P06_A4_BS2														
P06_A4_AS1	P	D	G	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	
P06_A4_AS2														
P07_A4_BS1	CCT	GAT	GGG	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	ACC	TGG	GTG	GCC	ACC	
P07_A4_BS2														
P07_A4_AS1	P	D	G	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	
P07_A4_AS2														
P08_A4_BS1	CCT	GAT	GGG	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	ACC	TGG	GTG	GCC	ACC	
P08_A4_BS2														
P08_A4_AS1	P	D	G	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	
P08_A4_AS2														
P09_A4_BS1	CCT	GAT	GGG	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	ACC	TGG	GTG	GCC	ACC	
P09_A4_BS2														
P09_A4_AS1	P	D	G	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	
P09_A4_AS2														

Abb. 33: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 4 (Position 235-247).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A4 = mica Exon 4, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

			250				255				260		
A4_Var001_BS	AGG	ATT	TGC	CAA	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC
A4_Var001_AS	R	I	C	Q	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y
P01_A4_BS1	AGG	ATT	TGC	CAA	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC
P01_A4_BS2													
P01_A4_AS1	R	I	C	Q	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y
P01_A4_AS2													
P02_A4_BS1	AGG	ATT	TGC	CAA	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC
P02_A4_BS2				A									
P02_A4_AS1	R	I	C	R	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y
P02_A4_AS2				Q									
P03_A4_BS1	AGG	ATT	TGC	CAA	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC
P03_A4_BS2													
P03_A4_AS1	R	I	C	Q	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y
P03_A4_AS2													
P04_A4_BS1	AGG	ATT	TGC	CAA	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC
P04_A4_BS2													
P04_A4_AS1	R	I	C	Q	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y
P04_A4_AS2													
P05_A4_BS1	AGG	ATT	TGC	CAA	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC
P05_A4_BS2				A									
P05_A4_AS1	R	I	C	R	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y
P05_A4_AS2				Q									
P06_A4_BS1	AGG	ATT	TGC	CAA	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC
P06_A4_BS2				A									
P06_A4_AS1	R	I	C	R	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y
P06_A4_AS2				Q									
P07_A4_BS1	AGG	ATT	TGC	CAA	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC
P07_A4_BS2													
P07_A4_AS1	R	I	C	Q	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y
P07_A4_AS2													
P08_A4_BS1	AGG	ATT	TGC	CAA	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC
P08_A4_BS2				A									
P08_A4_AS1	R	I	C	R	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y
P08_A4_AS2				Q									
P09_A4_BS1	AGG	ATT	TGC	CAA	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC
P09_A4_BS2				A									
P09_A4_AS1	R	I	C	R	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y
P09_A4_AS2				Q									

Abb. 34: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 4 (Position 248-260).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A4 = mica Exon 4, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

					265					270							
A4_Var001_BS	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG	AAT	CAC	AGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G		
A4_Var001_AS	M	E	H	S	G	N	H	S	T	H	P	V	P	S			
P01_A4_BS1	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG	AAT	CAC	AGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G		
P01_A4_BS2																	
P01_A4_AS1	M	E	H	S	G	N	H	S	T	H	P	V	P	S			
P01_A4_AS2																	
P02_A4_BS1	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG	AAT	CAC	AGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G		
P02_A4_BS2																	
P02_A4_AS1	M	E	H	S	G	N	H	S	T	H	P	V	P	S			
P02_A4_AS2																	
P03_A4_BS1	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG	AAT	CAC	AGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G		
P03_A4_BS2																	
P03_A4_AS1	M	E	H	S	G	N	H	S	T	H	P	V	P	S			
P03_A4_AS2																	
P04_A4_BS1	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG	AAT	CAC	AGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G		
P04_A4_BS2																	
P04_A4_AS1	M	E	H	S	G	N	H	S	T	H	P	V	P	S			
P04_A4_AS2																	
P05_A4_BS1	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG	AAT	CAC	AGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G		
P05_A4_BS2																	
P05_A4_AS1	M	E	H	S	G	N	H	S	T	H	P	V	P	S			
P05_A4_AS2																	
P06_A4_BS1	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG	AAT	CAC	AGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G		
P06_A4_BS2																	
P06_A4_AS1	M	E	H	S	G	N	H	S	T	H	P	V	P	S			
P06_A4_AS2																	
P07_A4_BS1	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG	AAT	CAC	AGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G		
P07_A4_BS2																	
P07_A4_AS1	M	E	H	S	G	N	H	S	T	H	P	V	P	S			
P07_A4_AS2																	
P08_A4_BS1	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG	AAT	CAC	AGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G		
P08_A4_BS2																	
P08_A4_AS1	M	E	H	S	G	N	H	S	T	H	P	V	P	S			
P08_A4_AS2																	
P09_A4_BS1	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG	AAT	CAC	AGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G		
P09_A4_BS2																	
P09_A4_AS1	M	E	H	S	G	N	H	S	T	H	P	V	P	S			
P09_A4_AS2																	

Abb. 35: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *mica* Exon 4 (Position 261-274).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur *MICA* Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A4 = *mica* Exon 4, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	275					280								285
A5_Var001_BS	GG	AAA	GTG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAT	TGG	CAG	ACA	TTC	CAT
A5_Var001_AS	G	K	V	L	V	L	Q	S	H	W	Q	T	F	H
P01_A5_BS1	GG	AAA	GTG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAT	TGG	CAG	ACA	TTC	CAT
P01_A5_BS2														
P01_A5_AS1	G	K	V	L	V	L	Q	S	H	W	Q	T	F	H
P01_A5_AS2														
P02_A5_BS1	GG	AAA	GTG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAT	TGG	CAG	ACA	TTC	CAT
P02_A5_BS2														
P02_A5_AS1	G	K	V	L	V	L	Q	S	H	W	Q	T	F	H
P02_A5_AS2														
P03_A5_BS1	GG	AAA	GTG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAT	TGG	CAG	ACA	TTC	CAT
P03_A5_BS2														
P03_A5_AS1	G	K	V	L	V	L	Q	S	H	W	Q	T	F	H
P03_A5_AS2														
P04_A5_BS1	GG	AAA	GTG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAT	TGG	CAG	ACA	TTC	CAT
P04_A5_BS2														
P04_A5_AS1	G	K	V	L	V	L	Q	S	H	W	Q	T	F	H
P04_A5_AS2														
P05_A5_BS1	GG	AAA	GTG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAT	TGG	CAG	ACA	TTC	CAT
P05_A5_BS2														
P05_A5_AS1	G	K	V	L	V	L	Q	S	H	W	Q	T	F	H
P05_A5_AS2														
P06_A5_BS1	GG	AAA	GTG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAT	TGG	CAG	ACA	TTC	CAT
P06_A5_BS2														
P06_A5_AS1	G	K	V	L	V	L	Q	S	H	W	Q	T	F	H
P06_A5_AS2														
P07_A5_BS1	GG	AAA	GTG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAT	TGG	CAG	ACA	TTC	CAT
P07_A5_BS2														
P07_A5_AS1	G	K	V	L	V	L	Q	S	H	W	Q	T	F	H
P07_A5_AS2														
P08_A5_BS1	GG	AAA	GTG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAT	TGG	CAG	ACA	TTC	CAT
P08_A5_BS2														
P08_A5_AS1	G	K	V	L	V	L	Q	S	H	W	Q	T	F	H
P08_A5_AS2														
P09_A5_BS1	GG	AAA	GTG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAT	TGG	CAG	ACA	TTC	CAT
P09_A5_BS2														
P09_A5_AS1	G	K	V	L	V	L	Q	S	H	W	Q	T	F	H
P09_A5_AS2														

Abb. 36: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 5 (Position 275-288).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A5 = mica Exon 5, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	290						295							
A5_Var001_BS	GTT	TCT	GCT	GTT	GCT	GCT	GCT	GCT
A5_Var001_AS	V	S	A	V	A	A	A	A	-	-	-	-	-	-
P01_A5_BS1	GTT	TCT	GCT	GTT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	...
P01_A5_BS2								
P01_A5_AS1	V	S	A	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-
P01_A5_AS2									-	-	-	-	-	-
P02_A5_BS1	GTT	TCT	GCT	GTT	GCT	GCT	GGCT	GCT	GCT
P02_A5_BS2								
P02_A5_AS1	V	S	A	V	A	A	G	C	C					
P02_A5_AS2							A	A	-	-	-	-	-	-
P03_A5_BS1	GTT	TCT	GCT	GTT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	...
P03_A5_BS2								
P03_A5_AS1	V	S	A	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-
P03_A5_AS2									-	-	-	-	-	-
P04_A5_BS1	GTT	TCT	GCT	GTT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	...
P04_A5_BS2								
P04_A5_AS1	V	S	A	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-
P04_A5_AS2									-	-	-	-	-	-
P05_A5_BS1	GTT	TCT	GCT	GTT	GCT	GCT	GGCT	GCT	GCT
P05_A5_BS2									GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	...
P05_A5_AS1	V	S	A	V	A	A	G	C	C					
P05_A5_AS2							A	A	A	A	A	A	A	-
P06_A5_BS1	GTT	TCT	GCT	GTT	GCT	GCT	GGCT	GCT	GCT
P06_A5_BS2								
P06_A5_AS1	V	S	A	V	A	A	G	C	C					
P06_A5_AS2							A	A	A	A	A	A	A	-
P07_A5_BS1	GTT	TCT	GCT	GTT	GCT	GCT	GCT	GCT
P07_A5_BS2								
P07_A5_AS1	V	S	A	V	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-
P07_A5_AS2									-	-	-	-	-	-
P08_A5_BS1	GTT	TCT	GCT	GTT	GCT	GCT	GGCT	GCT	GCT
P08_A5_BS2								
P08_A5_AS1	V	S	A	V	A	A	G	C	C					
P08_A5_AS2							A	A	-	-	-	-	-	-
P09_A5_BS1	GTT	TCT	GCT	GTT	GCT	GCT	GGCT	GCT	GCT
P09_A5_BS2									GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	...
P09_A5_AS1	V	S	A	V	A	A	G	C	C					
P09_A5_AS2							A	A	A	A	A	A	A	-

Abb. 37: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 5 (Position 289-296).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. In blau ist die Baseninsertion an Position 295 gekennzeichnet und der daraus resultierende Frameshift mit Änderung der Aminosäuresequenz. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A5 = mica Exon 5, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2,

Anhang

	300	305													
A5_Var001_BS	ATT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	TTC	TAT	GTC	CGT	TGT	TGT	TGT	AAG	
A5_Var001_AS	I	F	V	I	I	I	F	Y	V	R	C	C	K		
P01_A5_BS1	ATT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	TTC	TAC	GTC	TGT	TGT	TGT	AAG		
P01_A5_BS2								T	C						
P01_A5_AS1	I	F	V	I	I	I	F	Y	V	C	C	C	K		
P01_A5_AS2								Y		R					
P02_A5_BS1	ATT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	TTC	TAT	GTC	CGT	TGT	TGT	TGT	AAG	
P02_A5_BS2															
P02_A5_AS1	Y	F	C	Y	Y	Y	F	L	C	F	L	L	X		
P02_A5_AS2	I	F	V	I	I	I	F	Y	V	R	C	C	K		
P03_A5_BS1	ATT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	TTC	TAC	GTC	TGT	TGT	TGT	AAG		
P03_A5_BS2															
P03_A5_AS1	I	F	V	I	I	I	F	Y	V	C	C	C	K		
P03_A5_AS2															
P04_A5_BS1	ATT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	TTC	TAC	GTC	TGT	TGT	TGT	AAG		
P04_A5_BS2															
P04_A5_AS1	I	F	V	I	I	I	F	Y	V	C	C	C	K		
P04_A5_AS2															
P05_A5_BS1	ATT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	TTC	TAT	GTC	CGT	TGT	TGT	TGT	AAG	
P05_A5_BS2										T					
P05_A5_AS1	Y	F	C	Y	Y	Y	F	L	C	P	L	L	X		
P05_A5_AS2	I	F	V	I	I	I	F	Y	V	C	C	C	K		
P06_A5_BS1	ATT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	TTC	TAT	GTC	CGT	TGT	TGT	TGT	AAG	
P06_A5_BS2															
P06_A5_AS1	Y	F	C	Y	Y	Y	F	L	C	F	L	L	X		
P06_A5_AS2	I	F	V	I	I	I	F	Y	V	R	C	C	K		
P07_A5_BS1	ATT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	TTC	TAT	GTC	CGT	TGT	TGT	TGT	AAG	
P07_A5_BS2															
P07_A5_AS1	I	F	V	I	I	I	F	Y	V	R	C	C	K		
P07_A5_AS2															
P08_A5_BS1	ATT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	TTC	TAT	GTC	CGT	TGT	TGT	TGT	AAG	
P08_A5_BS2															
P08_A5_AS1	Y	F	C	Y	Y	Y	F	L	C	P	L	L	X		
P08_A5_AS2	I	F	V	I	I	I	F	Y	V	R	C	C	K		
P09_A5_BS1	ATT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	TTC	TAT	GTC	CGT	TGT	TGT	TGT	AAG	
P09_A5_BS2										C	T				
P09_A5_AS1	Y	F	C	Y	Y	Y	F	L	C	F	L	L	X		
P09_A5_AS2	I	F	V	I	I	I	F	Y	V	C	C	C	K		

Abb. 38: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 5 (Position 297-309).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. In blau ist die Baseninsertion an Position 295 gekennzeichnet und der daraus resultierende Frameshift mit Änderung der Aminosäuresequenz. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A5 = mica Exon 5, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2,

Anhang

	310					315				
A5_Var001_BS	AAG	AAA	ACA	TCA	GCT	GCA	GAG	GGT	CCA	G
A5_Var001_AS	K	K	T	S	A	A	E	G	P	
P01_A5_BS1	AAG	AAA	ACA	TCA	GCT	GCA	GAG	GGT	CCA	G
P01_A5_BS2										
P01_A5_AS1	K	K	T	S	A	A	E	G	P	
P01_A5_AS2										
P02_A5_BS1	AAG	AAA	ACA	TCA	GCT	GCA	GAG	GGT	CCA	G
P02_A5_BS2										
P02_A5_AS1	K	K	T	S	A	A	E	G	P	
P02_A5_AS2										
P03_A5_BS1	AAG	AAA	ACA	TCA	GCT	GCA	GAG	GGT	CCA	G
P03_A5_BS2										
P03_A5_AS1	K	K	T	S	A	A	E	G	P	
P03_A5_AS2										
P04_A5_BS1	AAG	AAA	ACA	TCA	GCT	GCA	GAG	GGT	CCA	G
P04_A5_BS2										
P04_A5_AS1	K	K	T	S	A	A	E	G	P	
P04_A5_AS2										
P05_A5_BS1	AAG	AAA	ACA	TCA	GCT	GCA	GAG	GGT	CCA	G
P05_A5_BS2										
P05_A5_AS1	K	K	T	S	A	A	E	G	P	
P05_A5_AS2										
P06_A5_BS1	AAG	AAA	ACA	TCA	GCT	GCA	GAG	GGT	CCA	G
P06_A5_BS2										
P06_A5_AS1	K	K	T	S	A	A	E	G	P	
P06_A5_AS2										
P07_A5_BS1	AAG	AAA	ACA	TCA	GCT	GCA	GAG	GGT	CCA	G
P07_A5_BS2										
P07_A5_AS1	K	K	T	S	A	A	E	G	P	
P07_A5_AS2										
P08_A5_BS1	AAG	AAA	ACA	TCA	GCT	GCA	GAG	GGT	CCA	G
P08_A5_BS2										
P08_A5_AS1	K	K	T	S	A	A	E	G	P	
P08_A5_AS2										
P09_A5_BS1	AAG	AAA	ACA	TCA	GCT	GCA	GAG	GGT	CCA	G
P05_A5_BS2										
P05_A5_AS1	K	K	T	S	A	A	E	G	P	
P05_A5_AS2										

Abb. 39: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 5 (Position 310-318).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A5 = mica Exon 5, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

	320	325	330											
A6_Var001_BS	AG	CTC	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
A6_Var001_AS	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P01_A6_BS1	AG	CTC	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P01_A6_BS2														
P01_A6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P01_A6_AS2														
P02_A6_BS1	AG	CTC	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P02_A6_BS2														
P02_A6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P02_A6_AS2														
P03_A6_BS1	AG	CTC	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P03_A6_BS2														
P03_A6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P03_A6_AS2														
P04_A6_BS1	AG	CTC	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P04_A6_BS2														
P04_A6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P04_A6_AS2														
P05_A6_BS1	AG	CTC	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P05_A6_BS2														
P05_A6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P05_A6_AS2														
P06_A6_BS1	AG	CTC	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P06_A6_BS2														
P06_A6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P06_A6_AS2														
P07_A6_BS1	AG	CTC	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P07_A6_BS2														
P07_A6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P07_A6_AS2														
P08_A6_BS1	AG	CTC	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P08_A6_BS2														
P08_A6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P08_A6_AS2														
P09_A6_BS1	AG	CTC	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P09_A6_BS2														
P09_A6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P09_A6_AS2														

Abb. 40: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *mica* Exon 6 (Position 320-333).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A6 = mica Exon 6, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

	335						340						345
A6_Var001_BS	ACG	AGT	GAC	CAC	AGG	GAT	GCC	ACA	CAG	CTC	GGA	TTT	CAG
A6_Var001_AS	T	S	D	H	R	D	A	T	Q	L	G	F	Q
P01_A6_BS1	ACG	AGT	GAC	CAC	AGG	GAT	GCC	ACA	CAG	CTC	GGA	TTT	CAG
P01_A6_BS2													
P01_A6_AS1	T	S	D	H	R	D	A	T	Q	L	G	F	Q
P01_A6_AS2													
P02_A6_BS1	ACG	AGT	GAC	CAC	AGG	GAT	GCC	ACA	CAG	CTC	GGA	TTT	CAG
P02_A6_BS2													
P02_A6_AS1	T	S	D	H	R	D	A	T	Q	L	G	F	Q
P02_A6_AS2													
P03_A6_BS1	ACG	AGT	GAC	CAC	AGG	GAT	GCC	ACA	CAG	CTC	GGA	TTT	CAG
P03_A6_BS2													
P03_A6_AS1	T	S	D	H	R	D	A	T	Q	L	G	F	Q
P03_A6_AS2													
P04_A6_BS1	ACG	AGT	GAC	CAC	AGG	GAT	GCC	ACA	CAG	CTC	GGA	TTT	CAG
P04_A6_BS2													
P04_A6_AS1	T	S	D	H	R	D	A	T	Q	L	G	F	Q
P04_A6_AS2													
P05_A6_BS1	ACG	AGT	GAC	CAC	AGG	GAT	GCC	ACA	CAG	CTC	GGA	TTT	CAG
P05_A6_BS2													
P05_A6_AS1	T	S	D	H	R	D	A	T	Q	L	G	F	Q
P05_A6_AS2													
P06_A6_BS1	ACG	AGT	GAC	CAC	AGG	GAT	GCC	ACA	CAG	CTC	GGA	TTT	CAG
P06_A6_BS2													
P06_A6_AS1	T	S	D	H	R	D	A	T	Q	L	G	F	Q
P06_A6_AS2													
P07_A6_BS1	ACG	AGT	GAC	CAC	AGG	GAT	GCC	ACA	CAG	CTC	GGA	TTT	CAG
P07_A6_BS2													
P07_A6_AS1	T	S	D	H	R	D	A	T	Q	L	G	F	Q
P07_A6_AS2													
P08_A6_BS1	ACG	AGT	GAC	CAC	AGG	GAT	GCC	ACA	CAG	CTC	GGA	TTT	CAG
P08_A6_BS2													
P08_A6_AS1	T	S	D	H	R	D	A	T	Q	L	G	F	Q
P08_A6_AS2													
P09_A6_BS1	ACG	AGT	GAC	CAC	AGG	GAT	GCC	ACA	CAG	CTC	GGA	TTT	CAG
P09_A6_BS2													
P09_A6_AS1	T	S	D	H	R	D	A	T	Q	L	G	F	Q
P09_A6_AS2													

Abb. 41: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 6 (Position 334-346).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A6 = mica Exon 6, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

	350	355											
A6_Var001_BS	CCT	CTG	ATG	TCA	GAT	CTT	GGG	TCC	ACT	GGC	TCC	ACT	GAG
A6_Var001_AS	P	L	M	S	D	L	G	S	T	G	S	T	E
P01_A6_BS1	CCT	CTG	ATG	TCA	GAT	CTT	GGG	TCC	ACT	GGC	TCC	ACT	GAG
P01_A6_BS2													
P01_A6_AS1	P	L	M	S	D	L	G	S	T	G	S	T	E
P01_A6_AS2													
P02_A6_BS1	CCT	CTG	ATG	TCA	GCT	CTT	GGG	TCC	ACT	GGC	TCC	ACT	GAG
P02_A6_BS2					A								
P02_A6_AS1	P	L	M	S	A	L	G	S	T	G	S	T	E
P02_A6_AS2					D								
P03_A6_BS1	CCT	CTG	ATG	TCA	GAT	CTT	GGG	TCC	ACT	GGC	TCC	ACT	GAG
P03_A6_BS2													
P03_A6_AS1	P	L	M	S	D	L	G	S	T	G	S	T	E
P03_A6_AS2													
P04_A6_BS1	CCT	CTG	ATG	TCA	GAT	CTT	GGG	TCC	ACT	GGC	TCC	ACT	GAG
P04_A6_BS2													
P04_A6_AS1	P	L	M	S	D	L	G	S	T	G	S	T	E
P04_A6_AS2													
P05_A6_BS1	CCT	CTG	ATG	TCA	GCT	CTT	GGG	TCC	ACT	GGC	TCC	ACT	GAG
P05_A6_BS2					A								
P05_A6_AS1	P	L	M	S	A	L	G	S	T	G	S	T	E
P05_A6_AS2					D								
P06_A6_BS1	CCT	CTG	ATG	TCA	GCT	CTT	GGG	TCC	ACT	GGC	TCC	ACT	GAG
P06_A6_BS2													
P06_A6_AS1	P	L	M	S	A	L	G	S	T	G	S	T	E
P06_A6_AS2													
P07_A6_BS1	CCT	CTG	ATG	TCA	GCT	CTT	GGG	TCC	ACT	GGC	TCC	ACT	GAG
P07_A6_BS2					A								
P07_A6_AS1	P	L	M	S	A	L	G	S	T	G	S	T	E
P07_A6_AS2					D								
P08_A6_BS1	CCT	CTG	ATG	TCA	GCT	CTT	GGG	TCC	ACT	GGC	TCC	ACT	GAG
P08_A6_BS2					A								
P08_A6_AS1	P	L	M	S	A	L	G	S	T	G	S	T	E
P08_A6_AS2					D								
P09_A6_BS1	CCT	CTG	ATG	TCA	GCT	CTT	GGG	TCC	ACT	GGC	TCC	ACT	GAG
P09_A6_BS2					A								
P09_A6_AS1	P	L	M	S	A	L	G	S	T	G	S	T	E
P09_A6_AS2					D								

Abb. 42: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 6 (Position 347-359).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A6 = mica Exon 6, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

	360
A6_Var001_BS	GGC GCC TAG
A6_Var001_AS	G A
P01_A6_BS1	GGC GCC TAG
P01_A6_BS2	
P01_A6_AS1	G A
P01_A6_AS2	
P02_A6_BS1	GGC ACC TAG
P02_A6_BS2	G
P02_A6_AS1	G T
P02_A6_AS2	A
P03_A6_BS1	GGC GCC TAG
P03_A6_BS2	
P03_A6_AS1	G A
P03_A6_AS2	
P04_A6_BS1	GGC GCC TAG
P04_A6_BS2	
P04_A6_AS1	G A
P04_A6_AS2	
P05_A6_BS1	GGC ACC TAG
P05_A6_BS2	G
P05_A6_AS1	G T
P05_A6_AS2	A
P06_A6_BS1	GGC ACC TAG
P06_A6_BS2	G
P06_A6_AS1	G T
P06_A6_AS2	A
P07_A6_BS1	GGC ACC TAG
P07_A6_BS2	G
P07_A6_AS1	G T
P07_A6_AS2	A
P08_A6_BS1	GGC ACC TAG
P08_A6_BS2	
P08_A6_AS1	G T
P08_A6_AS2	
P09_A6_BS1	GGC ACC TAG
P09_A6_BS2	G
P09_A6_AS1	G T
P09_A6_AS2	A

Abb. 43: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von mica Exon 6 (Position 360-362).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICA Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, A6 = mica Exon 6, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

						5									10
B2_Var001_BS	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAC	AAC	CTC	ATG	GTG	CTG	TCC	CAG	
B2_Var001_AS	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	M	V	L	S	Q	
P01_B2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAC	AAC	CTC	ATG	GTG	CTG	TCC	CAG	
P01_B2_BS2															
P01_B2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	M	V	L	S	Q	
P01_B2_AS2															
P02_B2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAC	AAC	CTC	ATG	GTG	CTG	TCC	CAG	
P02_B2_BS2															
P02_B2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	M	V	L	S	Q	
P02_B2_AS2															
P03_B2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAC	AAC	CTC	ATG	GTG	CTG	TCC	CAG	
P03_B2_BS2															
P03_B2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	M	V	L	S	Q	
P03_B2_AS2															
P04_B2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAC	AAC	CTC	ATG	GTG	CTG	TCC	CAG	
P04_B2_BS2															
P04_B2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	M	V	L	S	Q	
P04_B2_AS2															
P05_B2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAC	AAC	CTC	ATG	GTG	CTG	TCC	CAG	
P05_B2_BS2															
P05_B2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	M	V	L	S	Q	
P05_B2_AS2															
P06_B2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAC	AAC	CTC	ATG	GTG	CTG	TCC	CAG	
P06_B2_BS2															
P06_B2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	M	V	L	S	Q	
P06_B2_AS2															
P07_B2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAC	AAC	CTC	ATG	GTG	CTG	TCC	CAG	
P07_B2_BS2															
P07_B2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	M	V	L	S	Q	
P07_B2_AS2															
P08_B2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAC	AAC	CTC	ATG	GTG	CTG	TCC	CAG	
P08_B2_BS2															
P08_B2_AS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	M	V	L	S	Q	
P08_B2_AS2															
P09_B2_BS1	AG	CCC	CAC	AGT	CTT	CGT	TAC	AAC	CTC	ATG	GTG	CTG	TCC	CAG	
P09_B2_BS1															
P09_B2_BS1	E	P	H	S	L	R	Y	N	L	M	V	L	S	Q	
P09_B2_BS1															

Abb. 44: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 2 (Position 1-13).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B2 = micb Exon 2, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

	15					20						25		
B2_Var001_BS	GAT	GAA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTC	GCT	GAG	GGA	CAT	CTG
B2_Var001_AS	D	E	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	G	H	L
P01_B2_BS1	GAT	GAA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTC	GCT	GAG	GGA	CAT	CTG
P01_B2_BS2														
P01_B2_AS1	D	E	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	G	H	L
P01_B2_AS2														
P02_B2_BS1	GAT	GAA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTC	GCT	GAG	GGA	CAT	CTG
P02_B2_BS2														
P02_B2_AS1	D	E	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	G	H	L
P02_B2_AS2														
P03_B2_BS1	GAT	GAA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTC	GCT	GAG	GGA	CAT	CTG
P03_B2_BS2														
P03_B2_AS1	D	E	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	G	H	L
P03_B2_AS2														
P04_B2_BS1	GAT	GAA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTC	GCT	GAG	GGA	CAT	CTG
P04_B2_BS2														
P04_B2_AS1	D	E	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	G	H	L
P04_B2_AS2														
P05_B2_BS1	GAT	GAA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTC	GCT	GAG	GGA	CAT	CTG
P05_B2_BS2														
P05_B2_AS1	D	E	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	G	H	L
P05_B2_AS2														
P06_B2_BS1	GAT	GAA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTC	GCT	GAG	GGA	CAT	CTG
P06_B2_BS2														
P06_B2_AS1	D	E	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	G	H	L
P06_B2_AS2														
P07_B2_BS1	GAT	GAA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTC	GCT	GAG	GGA	CAT	CTG
P07_B2_BS2														
P07_B2_AS1	D	E	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	G	H	L
P07_B2_AS2														
P08_B2_BS1	GAT	GAA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTC	GCT	GAG	GGA	CAT	CTG
P08_B2_BS2														
P08_B2_AS1	D	E	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	G	H	L
P08_B2_AS2														
P09_B2_BS1	GAT	GAA	TCT	GTG	CAG	TCA	GGG	TTT	CTC	GCT	GAG	GGA	CAT	CTG
P09_B2_BS1														
P09_B2_BS1	D	E	S	V	Q	S	G	F	L	A	E	G	H	L
P09_B2_BS1														

Abb. 45: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 2 (Position 14-27).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In *lila* ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B2 = *micb* Exon 2, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

		30					35						40			
B2_Var001_BS	GAT	GGT	CAG	C	CC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	C	GC	AGG
B2_Var001_AS	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	R	R		
P01_B2_BS1	GAT	GGT	CAG	C	CC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	C	GC	AGG
P01_B2_BS2																
P01_B2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	R	R		
P01_B2_AS2																
P02_B2_BS1	GAT	GGT	CAG	C	CC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	C	GC	AGG
P02_B2_BS2																
P02_B2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	R	R		
P02_B2_AS2																
P03_B2_BS1	GAT	GGT	CAG	C	CC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	C	GC	AGG
P03_B2_BS2																
P03_B2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	R	R		
P03_B2_AS2																
P04_B2_BS1	GAT	GGT	CAG	C	CC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	C	GC	AGG
P04_B2_BS2																
P04_B2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	R	R		
P04_B2_AS2																
P05_B2_BS1	GAT	GGT	CAG	C	CC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	C	GC	AGG
P05_B2_BS2																
P05_B2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	R	R		
P05_B2_AS2																
P06_B2_BS1	GAT	GGT	CAG	C	CC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	C	GC	AGG
P06_B2_BS2																
P06_B2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	R	R		
P06_B2_AS2																
P07_B2_BS1	GAT	GGT	CAG	C	CC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	C	GC	AGG
P07_B2_BS2																
P07_B2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	R	R		
P07_B2_AS2																
P08_B2_BS1	GAT	GGT	CAG	C	CC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	C	GC	AGG
P08_B2_BS2																
P08_B2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	R	R		
P08_B2_AS2																
P09_B2_BS1	GAT	GGT	CAG	C	CC	TTC	CTG	CGC	TAT	GAC	AGG	CAG	AAA	C	GC	AGG
P09_B2_BS1																
P09_B2_AS1	D	G	Q	P	F	L	R	Y	D	R	Q	K	R	R		
P09_B2_AS1																

Abb. 46: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 2 (Position 28-41).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In *lila* ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B2 = *micb* Exon 2, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	45	50	55
B2_Var001_BS	GCA AAG CCC CAG GGA CAG TGG GCA GAA GAT GTC CTG GGA GCT		
B2_Var001_AS	A K P Q G Q W A E D V L G A		
P01_B2_BS1	GCA AAG CCC CAG GGA CAG TGG GCA GAA AAT GTC CTG GGA GCT		
P01_B2_BS2			G
P01_B2_AS1	A K P Q G Q W A E N V L G A		
P01_B2_AS2			D
P02_B2_BS1	GCA AAG CCC CAG GGA CAG TGG GCA GAA AAT GTC CTG GGA GCT		
P02_B2_BS2			
P02_B2_AS1	A K P Q G Q W A E N V L G A		
P02_B2_AS2			
P03_B2_BS1	GCA AAG CCC CAG GGA CAG TGG GCA GAA GAT GTC CTG GGA GCT		
P03_B2_BS2			
P03_B2_AS1	A K P Q G Q W A E D V L G A		
P03_B2_AS2			
P04_B2_BS1	GCA AAG CCC CAG GGA CAG TGG GCA GAA AAT GTC CTG GGA GCT		
P04_B2_BS2			G
P04_B2_AS1	A K P Q G Q W A E N V L G A		
P04_B2_AS2			D
P05_B2_BS1	GCA AAG CCC CAG GGA CAG TGG GCA GAA GAT GTC CTG GGA GCT		
P05_B2_BS2			
P05_B2_AS1	A K P Q G Q W A E D V L G A		
P05_B2_AS2			
P06_B2_BS1	GCA AAG CCC CAG GGA CAG TGG GCA GAA AAT GTC CTG GGA GCT		
P06_B2_BS2			G
P06_B2_AS1	A K P Q G Q W A E N V L G A		
P06_B2_AS2			D
P07_B2_BS1	GCA AAG CCC CAG GGA CAG TGG GCA GAA GAT GTC CTG GGA GCT		
P07_B2_BS2			
P07_B2_AS1	A K P Q G Q W A E D V L G A		
P07_B2_AS2			
P08_B2_BS1	GCA AAG CCC CAG GGA CAG TGG GCA GAA GAT GTC CTG GGA GCT		
P08_B2_BS2			
P08_B2_AS1	A K P Q G Q W A E D V L G A		
P08_B2_AS2			
P09_B2_BS1	GCA AAG CCC CAG GGA CAG TGG GCA GAA GAT GTC CTG GGA GCT		
P09_B2_BS1			
P09_B2_AS1	A K P Q G Q W A E D V L G A		
P09_B2_AS1			

Abb. 47: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 2 (Position 42-55).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In *lila* ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B2 = *micb* Exon 2, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

		60							65						
B2_Var001_BS	AAG	ACC	TGG	GAC	ACA	GAG	ACC	GAG	GAC	TTG	ACA	GAG	AAT	GGG	
B2_Var001_AS	K	T	W	D	T	E	T	E	D	L	T	E	N	G	
P01_B2_BS1	AAG	ACC	TGG	GAC	ACA	GAG	ACC	GAG	GAC	TTG	ACA	GAG	AAT	GGG	
P01_B2_BS2															
P01_B2_AS1	K	T	W	D	T	E	T	E	D	L	T	E	N	G	
P01_B2_AS2															
P02_B2_BS1	AAG	ACC	TGG	GAC	ACA	GAG	ACC	GAG	GAC	TTG	ACA	GAG	AAT	GGG	
P02_B2_BS2															
P02_B2_AS1	K	T	W	D	T	E	T	E	D	L	T	E	N	G	
P02_B2_AS2															
P03_B2_BS1	GAG	ACC	TGG	GAC	ACA	GAG	ACC	GAG	GAC	TTG	ACA	GAG	AAT	GGG	
P03_B2_BS2	A														
P03_B2_AS1	E	T	W	D	T	E	T	E	D	L	T	E	N	G	
P03_B2_AS2	K														
P04_B2_BS1	AAG	ACC	TGG	GAC	ACA	GAG	ACC	GAG	GAC	TTG	ACA	GAG	AAT	GGG	
P04_B2_BS2															
P04_B2_AS1	K	T	W	D	T	E	T	E	D	L	T	E	N	G	
P04_B2_AS2															
P05_B2_BS1	AAG	ACC	TGG	GAC	ACA	GAG	ACC	GAG	GAC	TTG	ACA	GAG	AAT	GGG	
P05_B2_BS2															
P05_B2_AS1	K	T	W	D	T	E	T	E	D	L	T	E	N	G	
P05_B2_AS2															
P06_B2_BS1	AAG	ACC	TGG	GAC	ACA	GAG	ACC	GAG	GAC	TTG	ACA	GAG	AAT	GGG	
P06_B2_BS2															
P06_B2_AS1	K	T	W	D	T	E	T	E	D	L	T	E	N	G	
P06_B2_AS2															
P07_B2_BS1	GAG	ACC	TGG	GAC	ACA	GAG	ACC	GAG	GAC	TTG	ACA	GAG	AAT	GGG	
P07_B2_BS2															
P07_B2_AS1	E	T	W	D	T	E	T	E	D	L	T	E	N	G	
P07_B2_AS2															
P08_B2_BS1	AAG	ACC	TGG	GAC	ACA	GAG	ACC	GAG	GAC	TTG	ACA	GAG	AAT	GGG	
P08_B2_BS2															
P08_B2_AS1	K	T	W	D	T	E	T	E	D	L	T	E	N	G	
P08_B2_AS2															
P09_B2_BS1	GAG	ACC	TGG	GAC	ACA	GAG	ACC	GAG	GAC	TTG	ACA	GAG	AAT	GGG	
P09_B2_BS1	A														
P09_B2_BS1	E	T	W	D	T	E	T	E	D	L	T	E	N	G	
P09_B2_BS1	K														

Abb. 48: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 2 (Position 56-69).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur *MICB* Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B2 = *micb* Exon 2, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	70					75						80			
B2_Var001_BS	CAA	GAC	CTC	AGG	AGG	ACC	CTG	ACT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG	AAA	
B2_Var001_AS	Q	D	L	R	R	T	L	T	H	I	K	D	Q	K	
P01_B2_BS1	CAA	GAC	CTC	AGG	AGG	ACC	CTG	ACT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG	AAA	
P01_B2_BS2															
P01_B2_AS1	Q	D	L	R	R	T	L	T	H	I	K	D	Q	K	
P01_B2_AS2															
P02_B2_BS1	CAA	GAC	CTC	AGG	AGG	ACC	CTG	ACT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG	AAA	
P02_B2_BS2															
P02_B2_AS1	Q	D	L	R	R	T	L	T	H	I	K	D	Q	K	
P02_B2_AS2															
P03_B2_BS1	CAA	GAC	CTC	AGG	AGG	ACC	CTG	ACT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG	AAA	
P03_B2_BS2															
P03_B2_AS1	Q	D	L	R	R	T	L	T	H	I	K	D	Q	K	
P03_B2_AS2															
P04_B2_BS1	CAA	GAC	CTC	AGG	AGG	ACC	CTG	ACT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG	AAA	
P04_B2_BS2															
P04_B2_AS1	Q	D	L	R	R	T	L	T	H	I	K	D	Q	K	
P04_B2_AS2															
P05_B2_BS1	CAA	GAC	CTC	AGG	AGG	ACC	CTG	ACT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG	AAA	
P05_B2_BS2															
P05_B2_AS1	Q	D	L	R	R	T	L	T	H	I	K	D	Q	K	
P05_B2_AS2															
P06_B2_BS1	CAA	GAC	CTC	AGG	AGG	ACC	CTG	ACT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG	AAA	
P06_B2_BS2															
P06_B2_AS1	Q	D	L	R	R	T	L	T	H	I	K	D	Q	K	
P06_B2_AS2															
P07_B2_BS1	CAA	GAC	CTC	AGG	AGG	ACC	CTG	ACT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG	AAA	
P07_B2_BS2															
P07_B2_AS1	Q	D	L	R	R	T	L	T	H	I	K	D	Q	K	
P07_B2_AS2															
P08_B2_BS1	CAA	GAC	CTC	AGG	AGG	ACC	CTG	ACT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG	AAA	
P08_B2_BS2															
P08_B2_AS1	Q	D	L	R	R	T	L	T	H	I	K	D	Q	K	
P08_B2_AS2															
P09_B2_BS1	CAA	GAC	CTC	AGG	AGG	ACC	CTG	ACT	CAT	ATC	AAG	GAC	CAG	AAA	
P09_B2_BS1															
P09_B2_BS1	Q	D	L	R	R	T	L	T	H	I	K	D	Q	K	
P09_B2_BS1															

Abb. 49: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 2 (Position 70-83).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B2 = micb Exon 2, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

B2_Var001_BS	GGA G
B2_Var001_AS	G
P01_B2_BS1	GGA G
P01_B2_BS2	
P01_B2_AS1	G
P01_B2_AS2	
P02_B2_BS1	GGA G
P02_B2_BS2	
P02_B2_AS1	G
P02_B2_AS2	
P03_B2_BS1	GGA G
P03_B2_BS2	
P03_B2_AS1	G
P03_B2_AS2	
P04_B2_BS1	GGA G
P04_B2_BS2	
P04_B2_AS1	G
P04_B2_AS2	
P05_B2_BS1	GGA G
P05_B2_BS2	
P05_B2_AS1	G
P05_B2_AS2	
P06_B2_BS1	GGA G
P06_B2_BS2	
P06_B2_AS1	G
P06_B2_AS2	
P07_B2_BS1	GGA G
P07_B2_BS2	
P07_B2_AS1	G
P07_B2_AS2	
P08_B2_BS1	GGA G
P08_B2_BS2	
P08_B2_AS1	G
P08_B2_AS2	
P09_B2_BS1	GGA G
P09_B2_BS1	
P09_B2_BS1	G
P09_B2_BS1	

Abb. 50: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von micb Exon 2 (Position 84).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B2 = micb Exon 2, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

	90	95	
B3_Var001_BS	GC TTG CAT TCC CTC CAG GAG ATT AGG GTC TGT GAG AT	C	CAT
B3_Var001_AS	G L H S L Q E I R V C E	I	H
P01_B3_BS1	GC TTG CAT TCC CTC CAG GAG ATT AGG GTC TGT GAG AT	C	CAT
P01_B3_BS2			
P01_B3_AS1	G L H S L Q E I R V C E	I	H
P01_B3_AS2			
P02_B3_BS1	GC TTG CAT TCC CTC CAG GAG ATT AGG GTC TGT GAG AT	C	CAT
P02_B3_BS2			
P02_B3_AS1	G L H S L Q E I R V C E	I	H
P02_B3_AS2			
P03_B3_BS1	GC TTG CAT TCC CTC CAG GAG ATT AGG GTC TGT GAG AT	C	CAT
P03_B3_BS2			
P03_B3_AS1	G L H S L Q E I R V C E	I	H
P03_B3_AS2			
P04_B3_BS1	GC TTG CAT TCC CTC CAG GAG ATT AGG GTC TGT GAG AT	C	CAT
P04_B3_BS2			
P04_B3_AS1	G L H S L Q E I R V C E	I	H
P04_B3_AS2			
P05_B3_BS1	GC TTG CAT TCC CTC CAG GAG ATT AGG GTC TGT GAG AT	C	CAT
P05_B3_BS2			
P05_B3_AS1	G L H S L Q E I R V C E	I	H
P05_B3_AS2			
P06_B3_BS1	GC TTG CAT TCC CTC CAG GAG ATT AGG GTC TGT GAG AT	C	CAT
P06_B3_BS2			
P06_B3_AS1	G L H S L Q E I R V C E	I	H
P06_B3_AS2			
P07_B3_BS1	GC TTG CAT TCC CTC CAG GAG ATT AGG GTC TGT GAG AT	C	CAT
P07_B3_BS2			
P07_B3_AS1	G L H S L Q E I R V C E	I	H
P07_B3_AS2			
P08_B3_BS1	GC TTG CAT TCC CTC CAG GAG ATT AGG GTC TGT GAG AT	C	CAT
P08_B3_BS2			
P08_B3_AS1	G L H S L Q E I R V C E	I	H
P08_B3_AS2			
P09_B3_BS1	GC TTG CAT TCC CTC CAG GAG ATT AGG GTC TGT GAG AT	G	CAT
P09_B3_BS2		C	
P09_B3_AS1	G L H S L Q E I R V C E	M	H
P09_B3_AS2		I	

Abb. 51: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 3 (Position 85-99).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B3 = micb Exon 3, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

	100		105								110			
B3_Var001_BS	GAA	GAC	AGC	AGC	ACC	AGG	GGC	TCC	CGG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
B3_Var001_AS	E	D	S	S	T	R	G	S	R	H	F	Y	Y	D
P01_B3_BS1	GAA	GAC	AGC	AGC	ACC	AGG	GGC	TCC	CGG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P01_B3_BS2														
P01_B3_AS1	E	D	S	S	T	R	G	S	R	H	F	Y	Y	D
P01_B3_AS2														
P02_B3_BS1	GAA	GAC	AGC	AGC	ACC	AGG	GGC	TCC	CGG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P02_B3_BS2														
P02_B3_AS1	E	D	S	S	T	R	G	S	R	H	F	Y	Y	D
P02_B3_AS2														
P03_B3_BS1	GAA	GAC	AGC	AGC	ACC	AGG	GGC	TCC	CGG	CAT	TTC	TAC	TAC	AAT
P03_B3_BS2														G
P03_B3_AS1	E	D	S	S	T	R	G	S	R	H	F	Y	Y	N
P03_B3_AS2														D
P04_B3_BS1	GAA	GAC	AGC	AGC	ACC	AGG	GGC	TCC	CGG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P04_B3_BS2														
P04_B3_AS1	E	D	S	S	T	R	G	S	R	H	F	Y	Y	D
P04_B3_AS2														
P05_B3_BS1	GAA	GAC	AGC	AGC	ACC	AGG	GGC	TCC	CGG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P05_B3_BS2														
P05_B3_AS1	E	D	S	S	T	R	G	S	R	H	F	Y	Y	D
P05_B3_AS2														
P06_B3_BS1	GAA	GAC	AGC	AGC	ACC	AGG	GGC	TCC	CGG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P06_B3_BS2														
P06_B3_AS1	E	D	S	S	T	R	G	S	R	H	F	Y	Y	D
P06_B3_AS2														
P07_B3_BS1	GAA	GAC	AGC	AGC	ACC	AGG	GGC	TCC	CGG	CAT	TTC	TAC	TAC	AAT
P07_B3_BS2														G
P07_B3_AS1	E	D	S	S	T	R	G	S	R	H	F	Y	Y	N
P07_B3_AS2														D
P08_B3_BS1	GAA	GAC	AGC	AGC	ACC	AGG	GGC	TCC	CGG	CAT	TTC	TAC	TAC	GAT
P08_B3_BS2														
P08_B3_AS1	E	D	S	S	T	R	G	S	R	H	F	Y	Y	D
P08_B3_AS2														
P09_B3_BS1	GAA	GAC	AGC	AGC	ACC	AGG	GGC	TCC	CGG	CAT	TTC	TAC	TAC	AAT
P09_B3_BS2														G
P09_B3_AS1	E	D	S	S	T	R	G	S	R	H	F	Y	Y	N
P09_B3_AS2														D

Abb. 52: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 3 (Position 100-113).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur *MICB* Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B3 = *micb* Exon 3, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	115						120						125		
B3_Var001_BS	GGG	GAG	CTC	TTC	CTC	TCC	CAA	AAC	CTG	GAG	ACT	CAA	GAA	TCG	
B3_Var001_AS	G	E	L	F	L	S	Q	N	L	E	T	Q	E	S	
P01_B3_BS1	GGG	GAG	CTC	TTC	CTC	TCC	CAA	AAC	CTG	GAG	ACT	CAA	GAA	TCG	
P01_B3_BS2															
P01_B3_AS1	G	E	L	F	L	S	Q	N	L	E	T	Q	E	S	
P01_B3_AS2															
P02_B3_BS1	GGG	GAG	CTC	TTC	CTC	TCC	CAA	AAC	CTG	GAG	ACT	CAA	GAA	TCG	
P02_B3_BS2															
P02_B3_AS1	G	E	L	F	L	S	Q	N	L	E	T	Q	E	S	
P02_B3_AS2															
P03_B3_BS1	GAG	CTC	TTC	CTC	TCC	CAA	AAC	CTG	GAG	ACT	CAA	GAA	TCG	ACA	
P03_B3_BS2															
P03_B3_AS1	G	E	L	F	L	S	Q	N	L	E	T	Q	E	S	
P03_B3_AS2															
P04_B3_BS1	GGG	GAG	CTC	TTC	CTC	TCC	CAA	AAC	CTG	GAG	ACT	CAA	GAA	TCG	
P04_B3_BS2															
P04_B3_AS1	G	E	L	F	L	S	Q	N	L	E	T	Q	E	S	
P04_B3_AS2															
P05_B3_BS1	GGG	GAG	CTC	TTC	CTC	TCC	CAA	AAC	CTG	GAG	ACT	CAA	GAA	TCG	
P05_B3_BS2															
P05_B3_AS1	G	E	L	F	L	S	Q	N	L	E	T	Q	E	S	
P05_B3_AS2															
P06_B3_BS1	GGG	GAG	CTC	TTC	CTC	TCC	CAA	AAC	CTG	GAG	ACT	CAA	GAA	TCG	
P06_B3_BS2															
P06_B3_AS1	G	E	L	F	L	S	Q	N	L	E	T	Q	E	S	
P06_B3_AS2															
P07_B3_BS1	GGG	GAG	CTC	TTC	CTC	TCC	CAA	AAC	CTG	GAG	ACT	CAA	GAA	TCG	
P07_B3_BS2															
P07_B3_AS1	G	E	L	F	L	S	Q	N	L	E	T	Q	E	S	
P07_B3_AS2															
P08_B3_BS1	GGG	GAG	CTC	TTC	CTC	TCC	CAA	AAC	CTG	GAG	ACT	CAA	GAA	TCG	
P08_B3_BS2															
P08_B3_AS1	G	E	L	F	L	S	Q	N	L	E	T	Q	E	S	
P08_B3_AS2															
P09_B3_BS1	GGG	GAG	CTC	TTC	CTC	TCC	CAA	AAC	CTG	GAG	ACT	CAA	GAA	TCG	
P09_B3_BS2															
P09_B3_AS1	G	E	L	F	L	S	Q	N	L	E	T	Q	E	S	
P09_B3_AS2															

Abb. 53: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 3 (Position 114-127).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In *lila* ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B3 = *micb* Exon 3, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

		130					135					140		
B3_Var001_BS	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCT	ATG	AAC
B3_Var001_AS	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M	N
P01_B3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCT	ATG	AAC
P01_B3_BS2														
P01_B3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M	N
P01_B3_AS2														
P02_B3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCT	ATG	AAC
P02_B3_BS2														
P02_B3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M	N
P02_B3_AS2														
P03_B3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCT	ATG	AAC
P03_B3_BS2														
P03_B3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M	N
P03_B3_AS2														
P04_B3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCT	ATG	AAC
P04_B3_BS2														
P04_B3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M	N
P04_B3_AS2														
P05_B3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCT	ATG	AAC
P05_B3_BS2														
P05_B3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M	N
P05_B3_AS2														
P06_B3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCT	ATG	AAC
P06_B3_BS2														
P06_B3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M	N
P06_B3_AS2														
P07_B3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCT	ATG	AAC
P07_B3_BS2														
P07_B3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M	N
P07_B3_AS2														
P08_B3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCT	ATG	AAC
P08_B3_BS2														
P08_B3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M	N
P08_B3_AS2														
P09_B3_BS1	ACA	GTG	CCC	CAG	TCC	TCC	AGA	GCT	CAG	ACC	TTG	GCT	ATG	AAC
P09_B3_BS2														
P09_B3_AS1	T	V	P	Q	S	S	R	A	Q	T	L	A	M	N
P09_B3_AS2														

Abb. 54: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 3 (Position 128-141).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In *lila* ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B3 = *micb* Exon 3, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

					145				150					155
B3_Var001_BS	GTC	ACA	AAT	TTC	TGG	AAG	GAA	GAT	GCC	ATG	AAG	ACC	AAG	ACA
B3_Var001_AS	V	T	N	F	W	K	E	D	A	M	K	T	K	T
P01_B3_BS1	GTC	ACA	AAT	TTC	TGG	AAG	GAA	GAT	GCC	ATG	AAG	ACC	AAG	ACA
P01_B3_BS2														
P01_B3_AS1	V	T	N	F	W	K	E	D	A	M	K	T	K	T
P01_B3_AS2														
P02_B3_BS1	GTC	ACA	AAT	TTC	TGG	AAG	GAA	GAT	GCC	ATG	AAG	ACC	AAG	ACA
P02_B3_BS2														
P02_B3_AS1	V	T	N	F	W	K	E	D	A	M	K	T	K	T
P02_B3_AS2														
P03_B3_BS1	GTC	ACA	AAT	TTC	TGG	AAG	GAA	GAT	GCC	ATG	AAG	ACC	AAG	ACA
P03_B3_BS2														
P03_B3_AS1	V	T	N	F	W	K	E	D	A	M	K	T	K	T
P03_B3_AS2														
P04_B3_BS1	GTC	ACA	AAT	TTC	TGG	AAG	GAA	GAT	GCC	ATG	AAG	ACC	AAG	ACA
P04_B3_BS2														
P04_B3_AS1	V	T	N	F	W	K	E	D	A	M	K	T	K	T
P04_B3_AS2														
P05_B3_BS1	GTC	ACA	AAT	TTC	TGG	AAG	GAA	GAT	GCC	ATG	AAG	ACC	AAG	ACA
P05_B3_BS2														
P05_B3_AS1	V	T	N	F	W	K	E	D	A	M	K	T	K	T
P05_B3_AS2														
P06_B3_BS1	GTC	ACA	AAT	TTC	TGG	AAG	GAA	GAT	GCC	ATG	AAG	ACC	AAG	ACA
P06_B3_BS2														
P06_B3_AS1	V	T	N	F	W	K	E	D	A	M	K	T	K	T
P06_B3_AS2														
P07_B3_BS1	GTC	ACA	AAT	TTC	TGG	AAG	GAA	GAT	GCC	ATG	AAG	ACC	AAG	ACA
P07_B3_BS2														
P07_B3_AS1	V	T	N	F	W	K	E	D	A	M	K	T	K	T
P07_B3_AS2														
P08_B3_BS1	GTC	ACA	AAT	TTC	TGG	AAG	GAA	GAT	GCC	ATG	AAG	ACC	AAG	ACA
P08_B3_BS2														
P08_B3_AS1	V	T	N	F	W	K	E	D	A	M	K	T	K	T
P08_B3_AS2														
P09_B3_BS1	GTC	ACA	AAT	TTC	TGG	AAG	GAA	GAT	GCC	ATG	AAG	ACC	AAG	ACA
P09_B3_BS2														
P09_B3_AS1	V	T	N	F	W	K	E	D	A	M	K	T	K	T
P09_B3_AS2														

Abb. 55: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 3 (Position 142-155).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B3 = *micb* Exon 3, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

				160						165				
B3_Var001_BS	CAC	TAT	CGC	GCT	ATG	CAG	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	AAA	CTA	CAG
B3_Var001_AS	H	Y	R	A	M	Q	A	D	C	L	Q	K	L	Q
P01_B3_BS1	CAC	TAT	CGC	GCT	ATG	CAG	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	AAA	CTA	CAG
P01_B3_BS2														
P01_B3_AS1	H	Y	R	A	M	Q	A	D	C	L	Q	K	L	Q
P01_B3_AS2														
P02_B3_BS1	CAC	TAT	CGC	GCT	ATG	CAG	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	AAA	CTA	CAG
P02_B3_BS2														
P02_B3_AS1	H	Y	R	A	M	Q	A	D	C	L	Q	K	L	Q
P02_B3_AS2														
P03_B3_BS1	CAC	TAT	CGC	GCT	ATG	CAG	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	AAA	CTA	CAG
P03_B3_BS2														
P03_B3_AS1	H	Y	R	A	M	Q	A	D	C	L	Q	K	L	Q
P03_B3_AS2														
P04_B3_BS1	CAC	TAT	CGC	GCT	ATG	CAG	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	AAA	CTA	CAG
P04_B3_BS2														
P04_B3_AS1	H	Y	R	A	M	Q	A	D	C	L	Q	K	L	Q
P04_B3_AS2														
P05_B3_BS1	CAC	TAT	CGC	GCT	ATG	CAG	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	AAA	CTA	CAG
P05_B3_BS2														
P05_B3_AS1	H	Y	R	A	M	Q	A	D	C	L	Q	K	L	Q
P05_B3_AS2														
P06_B3_BS1	CAC	TAT	CGC	GCT	ATG	CAG	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	AAA	CTA	CAG
P06_B3_BS2														
P06_B3_AS1	H	Y	R	A	M	Q	A	D	C	L	Q	K	L	Q
P06_B3_AS2														
P07_B3_BS1	CAC	TAT	CGC	GCT	ATG	CAG	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	AAA	CTA	CAG
P07_B3_BS2														
P07_B3_AS1	H	Y	R	A	M	Q	A	D	C	L	Q	K	L	Q
P07_B3_AS2														
P08_B3_BS1	CAC	TAT	CGC	GCT	ATG	CAG	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	AAA	CTA	CAG
P08_B3_BS2														
P08_B3_AS1	H	Y	R	A	M	Q	A	D	C	L	Q	K	L	Q
P08_B3_AS2														
P09_B3_BS1	CAC	TAT	CGC	GCT	ATG	CAG	GCA	GAC	TGC	CTG	CAG	AAA	CTA	CAG
P09_B3_BS2														
P09_B3_AS1	H	Y	R	A	M	Q	A	D	C	L	Q	K	L	Q
P09_B3_AS2														

Abb. 56: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 3 (Position 156-169).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In *lila* ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B3 = *micb* Exon 3, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	170					175						180
B3_Var001_BS	CGA	TAT	CTG	AAA	TCC	GGG	GTG	GCC	ATC	AGG	AGA	ACA G
B3_Var001_AS	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P01_B3_BS1	CGA	TAT	CTG	AAA	TCC	GGG	GTG	GCC	ATC	AGG	AGA	ACA G
P01_B3_BS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P01_B3_AS1	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P01_B3_AS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P02_B3_BS1	CGA	TAT	CTG	AAA	TCC	GGG	GTG	GCC	ATC	AGG	AGA	ACA G
P02_B3_BS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P02_B3_AS1	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P02_B3_AS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P03_B3_BS1	CGA	TAT	CTG	AAA	TCC	GGG	GTG	GCC	ATC	AGG	AGA	ACA G
P03_B3_BS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P03_B3_AS1	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P03_B3_AS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P04_B3_BS1	CGA	TAT	CTG	AAA	TCC	GGG	GTG	GCC	ATC	AGG	AGA	ACA G
P04_B3_BS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P04_B3_AS1	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P04_B3_AS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P05_B3_BS1	CGA	TAT	CTG	AAA	TCC	GGG	GTG	GCC	ATC	AGG	AGA	ACA G
P05_B3_BS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P05_B3_AS1	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P05_B3_AS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P06_B3_BS1	CGA	TAT	CTG	AAA	TCC	GGG	GTG	GCC	ATC	AGG	AGA	ACA G
P06_B3_BS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P06_B3_AS1	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P06_B3_AS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P07_B3_BS1	CGA	TAT	CTG	AAA	TCC	GGG	GTG	GCC	ATC	AGG	AGA	ACA G
P07_B3_BS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P07_B3_AS1	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P07_B3_AS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P08_B3_BS1	CGA	TAT	CTG	AAA	TCC	GGG	GTG	GCC	ATC	AGG	AGA	ACA G
P08_B3_BS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P08_B3_AS1	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P08_B3_AS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P09_B3_BS1	CGA	TAT	CTG	AAA	TCC	GGG	GTG	GCC	ATC	AGG	AGA	ACA G
P09_B3_BS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P09_B3_AS1	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T
P09_B3_AS2	R	Y	L	K	S	G	V	A	I	R	R	T

Abb. 57: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 3 (Position 170-181).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B3 = micb Exon 3, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

	185	190	195
B4_Var001_BS	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	TGC AGC GAG	GTC TCA GAG
B4_Var001_AS	V P P M V N V T	C S E	V S E
P01_B4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	TGC AGC GAG	GTC TCA GAG
P01_B4_BS2			
P01_B4_AS1	V P P M V N V T	C S E	V S E
P01_B4_AS2			
P02_B4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	TGC AGC GAG	GTC TCA GAG
P02_B4_BS2			
P02_B4_AS1	V P P M V N V T	C S E	V S E
P02_B4_AS2			
P03_B4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	TGC AGC GAG	GTC TCA GAG
P03_B4_BS2			
P03_B4_AS1	V P P M V N V T	C S E	V S E
P03_B4_AS2			
P04_B4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	TGC AGC GAG	GTC TCA GAG
P04_B4_BS2			
P04_B4_AS1	V P P M V N V T	C S E	V S E
P04_B4_AS2			
P05_B4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ATC	TGC AGC GAG	GTC TCA GAG
P05_B4_BS2			
P05_B4_AS1	V P P M V N V I	C S E	V S E
P05_B4_AS2			
P06_B4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	TGC AGC GAG	GTC TCA GAG
P06_B4_BS2			
P06_B4_AS1	V P P M V N V T	C S E	V S E
P06_B4_AS2			
P07_B4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	TGC AGC GAG	GTC TCA GAG
P07_B4_BS2			
P07_B4_AS1	V P P M V N V T	C S E	V S E
P07_B4_AS2			
P08_B4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ACC	TGC AGC GAG	GTC TCA GAG
P08_B4_BS2			
P08_B4_AS1	V P P M V N V T	C S E	V S E
P08_B4_AS2			
P09_B4_BS1	TG CCC CCC ATG GTG AAT GTC ATC	TGC AGC GAG	GTC TCA GAG
P09_B4_BS2			
P09_B4_AS1	V P P M V N V I	C S E	V S E
P09_B4_AS2			

Abb. 58: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 4 (Position 182-195).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In *lila* ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B4 = *micb* Exon 4, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	200	205												
B4_Var001_BS	GGC	AAC	ATC	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC	AGC	TTC	TAT	CCC
B4_Var001_AS	G	N	I	T	V	T	C	R	A	S	S	F	Y	P
P01_B4_BS1	GGC	AAC	ATC	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC	AGC	TTC	TAT	CCC
P01_B4_BS2														
P01_B4_AS1	G	N	I	T	V	T	C	R	A	S	S	F	Y	P
P01_B4_AS2														
P02_B4_BS1	GGC	AAC	ATC	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC	AGC	TTC	TAT	CCC
P02_B4_BS2														
P02_B4_AS1	G	N	I	T	V	T	C	R	A	S	S	F	Y	P
P02_B4_AS2														
P03_B4_BS1	GGC	AAC	ATC	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC	AGC	TTC	TAT	CCC
P03_B4_BS2														
P03_B4_AS1	G	N	I	T	V	T	C	R	A	S	S	F	Y	P
P03_B4_AS2														
P04_B4_BS1	GGC	AAC	ATC	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC	AGC	TTC	TAT	CCC
P04_B4_BS2														
P04_B4_AS1	G	N	I	T	V	T	C	R	A	S	S	F	Y	P
P04_B4_AS2														
P05_B4_BS1	GGC	AAC	ATC	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC	AGC	TTC	TAT	CCC
P05_B4_BS2														
P05_B4_AS1	G	N	I	T	V	T	C	R	A	S	S	F	Y	P
P05_B4_AS2														
P06_B4_BS1	GGC	AAC	ATC	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC	AGC	TTC	TAT	CCC
P06_B4_BS2														
P06_B4_AS1	G	N	I	T	V	T	C	R	A	S	S	F	Y	P
P06_B4_AS2														
P07_B4_BS1	GGC	AAC	ATC	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC	AGC	TTC	TAT	CCC
P07_B4_BS2														
P07_B4_AS1	G	N	I	T	V	T	C	R	A	S	S	F	Y	P
P07_B4_AS2														
P08_B4_BS1	GGC	AAC	ATC	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC	AGC	TTC	TAT	CCC
P08_B4_BS2														
P08_B4_AS1	G	N	I	T	V	T	C	R	A	S	S	F	Y	P
P08_B4_AS2														
P09_B4_BS1	GGC	AAC	ATC	ACC	GTG	ACA	TGC	AGG	GCT	TCC	AGC	TTC	TAT	CCC
P09_B4_BS2														
P09_B4_AS1	G	N	I	T	V	T	C	R	A	S	S	F	Y	P
P09_B4_AS2														

Abb. 59: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 4 (Position 196-209).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In *lila* ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B4 = *micb* Exon 4, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	210					215							220			
B4_Var001_BS	CGG	AAT	ATC	ACA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA	TCT	TTG		
B4_Var001_AS	R	N	I	T	L	T	W	R	Q	D	G	V	S	L		
P01_B4_BS1	CGG	AAT	ATC	ACA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA	TCT	TTG		
P01_B4_BS2																
P01_B4_AS1	R	N	I	T	L	T	W	R	Q	D	G	V	S	L		
P01_B4_AS2																
P02_B4_BS1	CGG	AAT	ATC	ACA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA	TCT	TTG		
P02_B4_BS2																
P02_B4_AS1	R	N	I	T	L	T	W	R	Q	D	G	V	S	L		
P02_B4_AS2																
P03_B4_BS1	CGG	AAT	ATC	ACA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA	TCT	TTG		
P03_B4_BS2																
P03_B4_AS1	R	N	I	T	L	T	W	R	Q	D	G	V	S	L		
P03_B4_AS2																
P04_B4_BS1	CGG	AAT	ATC	ACA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA	TCT	TTG		
P04_B4_BS2																
P04_B4_AS1	R	N	I	T	L	T	W	R	Q	D	G	V	S	L		
P04_B4_AS2																
P05_B4_BS1	CGG	AAT	ATC	ACA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA	TCT	TTG		
P05_B4_BS2																
P05_B4_AS1	R	N	I	T	L	T	W	R	Q	D	G	V	S	L		
P05_B4_AS2																
P06_B4_BS1	CGG	AAT	ATC	ACA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA	TCT	TTG		
P06_B4_BS2																
P06_B4_AS1	R	N	I	T	L	T	W	R	Q	D	G	V	S	L		
P06_B4_AS2																
P07_B4_BS1	CGG	AAT	ATC	ACA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA	TCT	TTG		
P07_B4_BS2																
P07_B4_AS1	R	N	I	T	L	T	W	R	Q	D	G	V	S	L		
P07_B4_AS2																
P08_B4_BS1	CGG	AAT	ATC	ACA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA	TCT	TTG		
P08_B4_BS2																
P08_B4_AS1	R	N	I	T	L	T	W	R	Q	D	G	V	S	L		
P08_B4_AS2																
P09_B4_BS1	CGG	AAT	ATC	ACA	CTG	ACC	TGG	CGT	CAG	GAT	GGG	GTA	TCT	TTG		
P09_B4_BS2																
P09_B4_AS1	R	N	I	T	L	T	W	R	Q	D	G	V	S	L		
P09_B4_AS2																

Abb. 60: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 4 (Position 210-223).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B4 = *micb* Exon 4, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	225						230					235		
B4_Var001_BS	AGC	CAC	AAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG	CCT	GAT	GGG
B4_Var001_AS	S	H	N	T	Q	Q	W	G	D	V	L	P	D	G
P01_B4_BS1	AGC	CAC	AAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG	CCT	GAT	GGG
P01_B4_BS2														
P01_B4_AS1	S	H	N	T	Q	Q	W	G	D	V	L	P	D	G
P01_B4_AS2														
P02_B4_BS1	AGC	CAC	AAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG	CCT	GAT	GGG
P02_B4_BS2														
P02_B4_AS1	S	H	N	T	Q	Q	W	G	D	V	L	P	D	G
P02_B4_AS2														
P03_B4_BS1	AGC	CAC	AAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG	CCT	GAT	GGG
P03_B4_BS2														
P03_B4_AS1	S	H	N	T	Q	Q	W	G	D	V	L	P	D	G
P03_B4_AS2														
P04_B4_BS1	AGC	CAC	AAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG	CCT	GAT	GGG
P04_B4_BS2														
P04_B4_AS1	S	H	N	T	Q	Q	W	G	D	V	L	P	D	G
P04_B4_AS2														
P05_B4_BS1	AGC	CAC	AAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG	CCT	GAT	GGG
P05_B4_BS2														
P05_B4_AS1	S	H	N	T	Q	Q	W	G	D	V	L	P	D	G
P05_B4_AS2														
P06_B4_BS1	AGC	CAC	AAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG	CCT	GAT	GGG
P06_B4_BS2														
P06_B4_AS1	S	H	N	T	Q	Q	W	G	D	V	L	P	D	G
P06_B4_AS2														
P07_B4_BS1	AGC	CAC	AAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG	CCT	GAT	GGG
P07_B4_BS2														
P07_B4_AS1	S	H	N	T	Q	Q	W	G	D	V	L	P	D	G
P07_B4_AS2														
P08_B4_BS1	AGC	CAC	AAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG	CCT	GAT	GGG
P08_B4_BS2														
P08_B4_AS1	S	H	N	T	Q	Q	W	G	D	V	L	P	D	G
P08_B4_AS2														
P09_B4_BS1	AGC	CAC	AAC	ACC	CAG	CAG	TGG	GGG	GAT	GTC	CTG	CCT	GAT	GGG
P09_B4_BS2														
P09_B4_AS1	S	H	N	T	Q	Q	W	G	D	V	L	P	D	G
P09_B4_AS2														

Abb. 61: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 4 (Position 224-237).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B4 = micb Exon 4, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

	240	245	250											
B4_Var001_BS	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	AC	TGG	GTG	GCC	ACC	AGG	ATT	CGC	CAA
B4_Var001_AS	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	R	I	R	Q
P01_B4_BS1	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	AC	TGG	GTG	GCC	ACC	AGG	ATT	CGC	CAA
P01_B4_BS2														
P01_B4_AS1	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	R	I	R	Q
P01_B4_AS2														
P02_B4_BS1	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	AC	TGG	GTG	GCC	ACC	AGG	ATT	CGC	CAA
P02_B4_BS2														
P02_B4_AS1	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	R	I	R	Q
P02_B4_AS2														
P03_B4_BS1	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	AC	TGG	GTG	GCC	ACC	AGG	ATT	CGC	CAA
P03_B4_BS2														
P03_B4_AS1	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	R	I	R	Q
P03_B4_AS2														
P04_B4_BS1	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	AC	TGG	GTG	GCC	ACC	AGG	ATT	CGC	CAA
P04_B4_BS2														
P04_B4_AS1	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	R	I	R	Q
P04_B4_AS2														
P05_B4_BS1	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	AC	TGG	GTG	GCC	ACC	AGG	ATT	CGC	CAA
P05_B4_BS2														
P05_B4_AS1	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	R	I	R	Q
P05_B4_AS2														
P06_B4_BS1	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	AC	TGG	GTG	GCC	ACC	AGG	ATT	CGC	CAA
P06_B4_BS2														
P06_B4_AS1	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	R	I	R	Q
P06_B4_AS2														
P07_B4_BS1	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	AC	TGG	GTG	GCC	ACC	AGG	ATT	CGC	CAA
P07_B4_BS2														
P07_B4_AS1	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	R	I	R	Q
P07_B4_AS2														
P08_B4_BS1	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	AC	TGG	GTG	GCC	ACC	AGG	ATT	CGC	CAA
P08_B4_BS2														
P08_B4_AS1	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	R	I	R	Q
P08_B4_AS2														
P09_B4_BS1	AAT	GGA	ACC	TAC	CAG	AC	TGG	GTG	GCC	ACC	AGG	ATT	CGC	CAA
P09_B4_BS2														
P09_B4_AS1	N	G	T	Y	Q	T	W	V	A	T	R	I	R	Q
P09_B4_AS2														

Abb. 62: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 4 (Position 238-251).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B4 = micb Exon 4, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

				255				260					265	
B4_Var001_BS	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG
B4_Var001_AS	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y	M	E	H	S	G
P01_B4_BS1	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG
P01_B4_BS2														
P01_B4_AS1	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y	M	E	H	S	G
P01_B4_AS2														
P02_B4_BS1	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG
P02_B4_BS2														
P02_B4_AS1	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y	M	E	H	S	G
P02_B4_AS2														
P03_B4_BS1	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG
P03_B4_BS2														
P03_B4_AS1	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y	M	E	H	S	G
P03_B4_AS2														
P04_B4_BS1	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG
P04_B4_BS2														
P04_B4_AS1	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y	M	E	H	S	G
P04_B4_AS2														
P05_B4_BS1	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG
P05_B4_BS2														
P05_B4_AS1	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y	M	E	H	S	G
P05_B4_AS2														
P06_B4_BS1	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG
P06_B4_BS2														
P06_B4_AS1	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y	M	E	H	S	G
P06_B4_AS2														
P07_B4_BS1	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG
P07_B4_BS2														
P07_B4_AS1	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y	M	E	H	S	G
P07_B4_AS2														
P08_B4_BS1	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG
P08_B4_BS2														
P08_B4_AS1	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y	M	E	H	S	G
P08_B4_AS2														
P09_B4_BS1	GGA	GAG	GAG	CAG	AGG	TTC	ACC	TGC	TAC	ATG	GAA	CAC	AGC	GGG
P09_B4_BS2														
P09_B4_AS1	G	E	E	Q	R	F	T	C	Y	M	E	H	S	G
P09_B4_AS2														

Abb. 63: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 4 (Position 252-265).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B4 = *micb* Exon 4, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	270									
B4_Var001_BS	AAT	CAC	GGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G
B4_Var001_AS	N	H	G	T	H	P	V	P	S	
P01_B4_BS1	AAT	CAC	GGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G
P01_B4_BS2										
P01_B4_AS1	N	H	G	T	H	P	V	P	S	
P01_B4_AS2										
P02_B4_BS1	AAT	CAC	GGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G
P02_B4_BS2										
P02_B4_AS1	N	H	G	T	H	P	V	P	S	
P02_B4_AS2										
P03_B4_BS1	AAT	CAC	GGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G
P03_B4_BS2										
P03_B4_AS1	N	H	G	T	H	P	V	P	S	
P03_B4_AS2										
P04_B4_BS1	AAT	CAC	GGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G
P04_B4_BS2										
P04_B4_AS1	N	H	G	T	H	P	V	P	S	
P04_B4_AS2										
P05_B4_BS1	AAT	CAC	GGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G
P05_B4_BS2										
P05_B4_AS1	N	H	G	T	H	P	V	P	S	
P05_B4_AS2										
P06_B4_BS1	AAT	CAC	GGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G
P06_B4_BS2										
P06_B4_AS1	N	H	G	T	H	P	V	P	S	
P06_B4_AS2										
P07_B4_BS1	AAT	CAC	GGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G
P07_B4_BS2										
P07_B4_AS1	N	H	G	T	H	P	V	P	S	
P07_B4_AS2										
P08_B4_BS1	AAT	CAC	GGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G
P08_B4_BS2										
P08_B4_AS1	N	H	G	T	H	P	V	P	S	
P08_B4_AS2										
P09_B4_BS1	AAT	CAC	GGC	ACT	CAC	CCT	GTG	CCC	TCT	G
P09_B4_BS2										
P09_B4_AS1	N	H	G	T	H	P	V	P	S	
P09_B4_AS2										

Abb. 64: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 4 (Position 266-274).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B4 = micb Exon 4, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

	275			280						285				
B5_Var001_BS	GG	AAG	GTG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAA	CGG	ACA	GAC	TTT	CCA
B5_Var001_AS	G	K	V	L	V	L	Q	S	Q	R	T	D	F	P
P01_B5_BS1	GG	AAG	GCG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAA	CGG	ACA	GAC	TTT	CCA
P01_B5_BS2														
P01_B5_AS1	G	K	A	L	V	L	Q	S	Q	R	T	D	F	P
P01_B5_AS2														
P02_B5_BS1	GG	AAG	GCG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAA	CGG	ACA	GAC	TTT	CCA
P02_B5_BS2														
P02_B5_AS1	G	K	A	L	V	L	Q	S	Q	R	T	D	F	P
P02_B5_AS2														
P03_B5_BS1	GG	AAG	GCG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAA	CGG	ACA	GAC	TTT	CCA
P03_B5_BS2														
P03_B5_AS1	G	K	A	L	V	L	Q	S	Q	R	T	D	F	P
P03_B5_AS2														
P04_B5_BS1	GG	AAG	GCG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAA	CGG	ACA	GAC	TTT	CCA
P04_B5_BS2														
P04_B5_AS1	G	K	A	L	V	L	Q	S	Q	R	T	D	F	P
P04_B5_AS2														
P05_B5_BS1	GG	AAG	GCG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAA	CGG	ACA	GAC	TTT	CCA
P05_B5_BS2														
P05_B5_AS1	G	K	A	L	V	L	Q	S	Q	R	T	D	F	P
P05_B5_AS2														
P06_B5_BS1	GG	AAG	GCG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAA	CGG	ACA	GAC	TTT	CCA
P06_B5_BS2														
P06_B5_AS1	G	K	A	L	V	L	Q	S	Q	R	T	D	F	P
P06_B5_AS2														
P07_B5_BS1	GG	AAG	GCG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAA	CGG	ACA	GAC	TTT	CCA
P07_B5_BS2														
P07_B5_AS1	G	K	A	L	V	L	Q	S	Q	R	T	D	F	P
P07_B5_AS2														
P08_B5_BS1	GG	AAG	GCG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAA	CGG	ACA	GAC	TTT	CCA
P08_B5_BS2														
P08_B5_AS1	G	K	A	L	V	L	Q	S	Q	R	T	D	F	P
P08_B5_AS2														
P09_B5_BS1	GG	AAG	GCG	CTG	GTG	CTT	CAG	AGT	CAA	CGG	ACA	GAC	TTT	CCA
P09_B5_BS2														
P09_B5_AS1	G	K	A	L	V	L	Q	S	Q	R	T	D	F	P
P09_B5_AS2														

Abb. 65: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 5 (Position 275-288).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B5 = *micb* Exon 5, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	290					295					300			
B5_Var001_BS	TAT	GTT	TCT	GCT	GCT	ATG	CCA	TGT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	ATT
B5_Var001_AS	Y	V	S	A	A	M	P	C	F	V	I	I	I	I
P01_B5_BS1	TAT	GTT	TCT	GCT	GCT	ATG	CCA	TGT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	ATT
P01_B5_BS2														
P01_B5_AS1	Y	V	S	A	A	M	P	C	F	V	I	I	I	I
P01_B5_AS2														
P02_B5_BS1	TAT	GTT	TCT	GCT	GCT	ATG	CCA	TGT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	ATT
P02_B5_BS2														
P02_B5_AS1	Y	V	S	A	A	M	P	C	F	V	I	I	I	I
P02_B5_AS2														
P03_B5_BS1	TAT	GTT	TCT	GCT	GCT	ATG	CCA	TGT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	ATT
P03_B5_BS2														
P03_B5_AS1	Y	V	S	A	A	M	P	C	F	V	I	I	I	I
P03_B5_AS2														
P04_B5_BS1	TAT	GTT	TCT	GCT	GCT	ATG	CCA	TGT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	ATT
P04_B5_BS2														
P04_B5_AS1	Y	V	S	A	A	M	P	C	F	V	I	I	I	I
P04_B5_AS2														
P05_B5_BS1	TAT	GTT	TCT	GCT	GCT	ATG	CCA	TGT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	ATT
P05_B5_BS2														
P05_B5_AS1	Y	V	S	A	A	M	P	C	F	V	I	I	I	I
P05_B5_AS2														
P06_B5_BS1	TAT	GTT	TCT	GCT	GCT	ATG	CCA	TGT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	ATT
P06_B5_BS2														
P06_B5_AS1	Y	V	S	A	A	M	P	C	F	V	I	I	I	I
P06_B5_AS2														
P07_B5_BS1	TAT	GTT	TCT	GCT	GCT	ATG	CCA	TGT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	ATT
P07_B5_BS2														
P07_B5_AS1	Y	V	S	A	A	M	P	C	F	V	I	I	I	I
P07_B5_AS2														
P08_B5_BS1	TAT	GTT	TCT	GCT	GCT	ATG	CCA	TGT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	ATT
P08_B5_BS2														
P08_B5_AS1	Y	V	S	A	A	M	P	C	F	V	I	I	I	I
P08_B5_AS2														
P09_B5_BS1	TAT	GTT	TCT	GCT	GCT	ATG	CCA	TGT	TTT	GTT	ATT	ATT	ATT	ATT
P09_B5_BS2														
P09_B5_AS1	Y	V	S	A	A	M	P	C	F	V	I	I	I	I
P09_B5_AS2														

Abb. 66: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 5 (Position 289-302).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B5 = micb Exon 5, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

		305					310					315		
B5_Var001_BS	CTC	TGT	GTC	CCT	TGT	TGC	AAG	AAG	AAA	ACA	TCA	GCG	GCA	GAG
B5_Var001_AS	L	C	V	P	C	C	K	K	K	T	S	A	A	E
P01_B5_BS1	CTC	TGT	GTC	CCT	TGT	TGC	AAG	AAG	AAA	ACA	TCA	GCG	GCA	GAG
P01_B5_BS2														
P01_B5_AS1	L	C	V	P	C	C	K	K	K	T	S	A	A	E
P01_B5_AS2														
P02_B5_BS1	CTC	TGT	GTC	CCT	TGT	TGC	AAG	AAG	AAA	ACA	TCA	GCG	GCA	GAG
P02_B5_BS2														
P02_B5_AS1	L	C	V	P	C	C	K	K	K	T	S	A	A	E
P02_B5_AS2														
P03_B5_BS1	CTC	TGT	GTC	CCT	TGT	TGC	AAG	AAG	AAA	ACA	TCA	GCG	GCA	GAG
P03_B5_BS2														
P03_B5_AS1	L	C	V	P	C	C	K	K	K	T	S	A	A	E
P03_B5_AS2														
P04_B5_BS1	CTC	TGT	GTC	CCT	TGT	TGC	AAG	AAG	AAA	ACA	TCA	GCG	GCA	GAG
P04_B5_BS2														
P04_B5_AS1	L	C	V	P	C	C	K	K	K	T	S	A	A	E
P04_B5_AS2														
P05_B5_BS1	CTC	TGT	GTC	CCT	TGT	TGC	AAG	AAG	AAA	ACA	TCA	GCG	GCA	GAG
P05_B5_BS2														
P05_B5_AS1	L	C	V	P	C	C	K	K	K	T	S	A	A	E
P05_B5_AS2														
P06_B5_BS1	CTC	TGT	GTC	CCT	TGT	TGC	AAG	AAG	AAA	ACA	TCA	GCG	GCA	GAG
P06_B5_BS2														
P06_B5_AS1	L	C	V	P	C	C	K	K	K	T	S	A	A	E
P06_B5_AS2														
P07_B5_BS1	CTC	TGT	GTC	CCT	TGT	TGC	AAG	AAG	AAA	ACA	TCA	GCG	GCA	GAG
P07_B5_BS2														
P07_B5_AS1	L	C	V	P	C	C	K	K	K	T	S	A	A	E
P07_B5_AS2														
P08_B5_BS1	CTC	TGT	GTC	CCT	TGT	TGC	AAG	AAG	AAA	ACA	TCA	GCG	GCA	GAG
P08_B5_BS2														
P08_B5_AS1	L	C	V	P	C	C	K	K	K	T	S	A	A	E
P08_B5_AS2														
P09_B5_BS1	CTC	TGT	GTC	CCT	TGT	TGC	AAG	AAG	AAA	ACA	TCA	GCG	GCA	GAG
P09_B5_BS2														
P09_B5_AS1	L	C	V	P	C	C	K	K	K	T	S	A	A	E
P09_B5_AS2														

Abb. 67: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 5 (Position 303-316).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In *lila* ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B5 = *micb* Exon 5, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

B5_Var001_BS	GGT CCA G
B5_Var001_AS	G P
P01_B5_BS1	GGT CCA G
P01_B5_BS2	
P01_B5_AS1	G P
P01_B5_AS2	
P02_B5_BS1	GGT CCA G
P02_B5_BS2	
P02_B5_AS1	G P
P02_B5_AS2	
P03_B5_BS1	GGT CCA G
P03_B5_BS2	
P03_B5_AS1	G P
P03_B5_AS2	
P04_B5_BS1	GGT CCA G
P04_B5_BS2	
P04_B5_AS1	G P
P04_B5_AS2	
P05_B5_BS1	GGT CCA G
P05_B5_BS2	
P05_B5_AS1	G P
P05_B5_AS2	
P06_B5_BS1	GGT CCA G
P06_B5_BS2	
P06_B5_AS1	G P
P06_B5_AS2	
P07_B5_BS1	GGT CCA G
P07_B5_BS2	
P07_B5_AS1	G P
P07_B5_AS2	
P08_B5_BS1	GGT CCA G
P08_B5_BS2	
P08_B5_AS1	G P
P08_B5_AS2	
P09_B5_BS1	GGT CCA G
P09_B5_BS2	
P09_B5_AS1	G P
P09_B5_AS2	

Abb. 68: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von micb Exon 5 (Position 317-318).

*Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B5 = micb Exon 5, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.*

Anhang

	320					325					330			
B6_Var001_BS	AG	CTT	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
B6_Var001_AS	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P01_B6_BS1	AG	CTT	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P01_B6_BS2														
P01_B6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P01_B6_AS2														
P02_B6_BS1	AG	CTT	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P02_B6_BS2														
P02_B6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P02_B6_AS2														
P03_B6_BS1	AG	CTT	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P03_B6_BS2														
P03_B6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P03_B6_AS2														
P04_B6_BS1	AG	CTT	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P04_B6_BS2														
P04_B6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P04_B6_AS2														
P05_B6_BS1	AG	CTT	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P05_B6_BS2														
P05_B6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P05_B6_AS2														
P06_B6_BS1	AG	CTT	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P06_B6_BS2														
P06_B6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P06_B6_AS2														
P07_B6_BS1	AG	CTT	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P07_B6_BS2														
P07_B6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P07_B6_AS2														
P08_B6_BS1	AG	CTT	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P08_B6_BS2														
P08_B6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P08_B6_AS2														
P09_B6_BS1	AG	CTT	GTG	AGC	CTG	CAG	GTC	CTG	GAT	CAA	CAC	CCA	GTT	GGG
P09_B6_BS2														
P09_B6_AS1	E	L	V	S	L	Q	V	L	D	Q	H	P	V	G
P09_B6_AS2														

Abb. 69: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 6 (Position 319-332).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In *lila* ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B6 = *micb* Exon 6, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

	335	340	345											
B6_Var001_BS	ACA	GGA	GAC	CAC	AGG	GAT	GCA	GCA	CAG	CTG	GGA	TTT	CAG	CCT
B6_Var001_AS	T	G	D	H	R	D	A	A	Q	L	G	F	Q	P
P01_B6_BS1	ACA	GGA	GAC	CAC	AGG	GAT	GCA	GCA	CAG	CTG	GGA	TTT	CAG	CCT
P01_B6_BS2														
P01_B6_AS1	T	G	D	H	R	D	A	A	Q	L	G	F	Q	P
P01_B6_AS2														
P02_B6_BS1	ACA	GGA	GAC	CAC	AGG	GAT	GCA	GCA	CAG	CTG	GGA	TTT	CAG	CCT
P02_B6_BS2														
P02_B6_AS1	T	G	D	H	R	D	A	A	Q	L	G	F	Q	P
P02_B6_AS2														
P03_B6_BS1	ACA	GGA	GAC	CAC	AGG	GAT	GCA	GCA	CAG	CTG	GGA	TTT	CAG	CCT
P03_B6_BS2														
P03_B6_AS1	T	G	D	H	R	D	A	A	Q	L	G	F	Q	P
P03_B6_AS2														
P04_B6_BS1	ACA	GGA	GAC	CAC	AGG	GAT	GCA	GCA	CAG	CTG	GGA	TTT	CAG	CCT
P04_B6_BS2														
P04_B6_AS1	T	G	D	H	R	D	A	A	Q	L	G	F	Q	P
P04_B6_AS2														
P05_B6_BS1	ACA	GGA	GAC	CAC	AGG	GAT	GCA	GCA	CAG	CTG	GGA	TTT	CAG	CCT
P05_B6_BS2														
P05_B6_AS1	T	G	D	H	R	D	A	A	Q	L	G	F	Q	P
P05_B6_AS2														
P06_B6_BS1	ACA	GGA	GAC	CAC	AGG	GAT	GCA	GCA	CAG	CTG	GGA	TTT	CAG	CCT
P06_B6_BS2														
P06_B6_AS1	T	G	D	H	R	D	A	A	Q	L	G	F	Q	P
P06_B6_AS2														
P07_B6_BS1	ACA	GGA	GAC	CAC	AGG	GAT	GCA	GCA	CAG	CTG	GGA	TTT	CAG	CCT
P07_B6_BS2														
P07_B6_AS1	T	G	D	H	R	D	A	A	Q	L	G	F	Q	P
P07_B6_AS2														
P08_B6_BS1	ACA	GGA	GAC	CAC	AGG	GAT	GCA	GCA	CAG	CTG	GGA	TTT	CAG	CCT
P08_B6_BS2														
P08_B6_AS1	T	G	D	H	R	D	A	A	Q	L	G	F	Q	P
P08_B6_AS2														
P09_B6_BS1	ACA	GGA	GAC	CAC	AGG	GAT	GCA	GCA	CAG	CTG	GGA	TTT	CAG	CCT
P09_B6_BS2														
P09_B6_AS1	T	G	D	H	R	D	A	A	Q	L	G	F	Q	P
P09_B6_AS2														

Abb. 70: Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von *micb* Exon 6 (Position 333-346).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In *lila* ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B6 = *micb* Exon 6, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

Anhang

		350							355					360	
B6_Var001_BS	CTG	ATG	TCA	GCT	ACT	GGG	TCC	ACT	GGT	TCC	ACT	GAG	GGC	GCC	TAG
B6_Var001_AS	L	M	S	A	T	G	S	T	G	S	T	E	G	A	
P01_B6_BS1	CTG	ATG	TCA	GCT	ACT	GGG	TCC	ACT	GGT	TCC	ACT	GAG	GGC	ACC	TAG
P01_B6_BS2														G	
P01_B6_AS1	L	M	S	A	T	G	S	T	G	S	T	E	G	T	
P01_B6_AS2														A	
P02_B6_BS1	CTG	ATG	TCA	GCT	ACT	GGG	TCC	ACT	GGT	TCC	ACT	GAG	GGC	ACC	TAG
P02_B6_BS2															
P02_B6_AS1	L	M	S	A	T	G	S	T	G	S	T	E	G	T	
P02_B6_AS2															
P03_B6_BS1	CTG	ATG	TCA	GCT	ACT	GGG	TCC	ACT	GGT	TCC	ACT	GAG	GGC	GCC	TAG
P03_B6_BS2															
P03_B6_AS1	L	M	S	A	T	G	S	T	G	S	T	E	G	A	
P03_B6_AS2															
P04_B6_BS1	CTG	ATG	TCA	GCT	ACT	GGG	TCC	ACT	GGT	TCC	ACT	GAG	GGC	ACC	TAG
P04_B6_BS2														G	
P04_B6_AS1	L	M	S	A	T	G	S	T	G	S	T	E	G	T	
P04_B6_AS2														A	
P05_B6_BS1	CTG	ATG	TCA	GCT	ACT	GGG	TCC	ACT	GGT	TCC	ACT	GAG	GGC	ACC	TAG
P05_B6_BS2														G	
P05_B6_AS1	L	M	S	A	T	G	S	T	G	S	T	E	G	T	
P05_B6_AS2														A	
P06_B6_BS1	CTG	ATG	TCA	GCT	ACT	GGG	TCC	ACT	GGT	TCC	ACT	GAG	GGC	ACC	TAG
P06_B6_BS2														G	
P06_B6_AS1	L	M	S	A	T	G	S	T	G	S	T	E	G	T	
P06_B6_AS2														A	
P07_B6_BS1	CTG	ATG	TCA	GCT	ACT	GGG	TCC	ACT	GGT	TCC	ACT	GAG	GGC	GCC	TAG
P07_B6_BS2															
P07_B6_AS1	L	M	S	A	T	G	S	T	G	S	T	E	G	A	
P07_B6_AS2															
P08_B6_BS1	CTG	ATG	TCA	GCT	ACT	GGG	TCC	ACT	GGT	TCC	ACT	GAG	GGC	GCC	TAG
P08_B6_BS2															
P08_B6_AS1	L	M	S	A	T	G	S	T	G	S	T	E	G	A	
P08_B6_AS2															
P09_B6_BS1	CTG	ATG	TCA	GCT	ACT	GGG	TCC	ACT	GGT	TCC	ACT	GAG	GGC	GCC	TAG
P09_B6_BS2															
P09_B6_AS1	L	M	S	A	T	G	S	T	G	S	T	E	G	A	
P09_B6_AS2															

Abb. 71 Alignment der fortlaufenden Basen- und Aminosäuresequenz der Probanden von micb Exon 6 (Position 347-361).

Gelb markiert sind die SNP-Stellen, welche identisch zur MICB Variante *001 sind. In lila ist eine abweichende Base und/oder Aminosäure gekennzeichnet. Bei Probanden mit biallelischen SNP-Stellen gibt es sowohl eine gelb wie auch eine lila gefärbte Markierung. Var001 = Variante *001, P01-P09 = Proband Nr. 01 – Nr. 09, B6 = micb Exon 6, BS1 = Basensequenz 1, BS2 = Basensequenz 2, AS1 = Aminosäuresequenz 1, AS2 = Aminosäuresequenz 2.

7 Literaturverzeichnis

- Achour, Y. *et al.* (2014) 'Association study of MICA gene polymorphisms with rheumatoid arthritis susceptibility in south Tunisian population', *International Journal of Immunogenetics*, 41(6), pp. 486–492. doi: 10.1111/iji.12146
- Adams, E.J. *et al.* (2008) 'An autonomous CDR3delta is sufficient for recognition of the nonclassical MHC class I molecules T10 and T22 by gammadelta T cells', *Nature Immunology*, 9(7), pp. 777–784. doi: 10.1038/ni.1620
- Allison, J.P. and Havran, W.L. (1991) 'The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors', *Annual Review of Immunology*, 9, pp. 679–705. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.003335
- Alvarez-Rodriguez, U. *et al.* (2018) 'Quantum Artificial Life in an IBM Quantum Computer', *Scientific Reports*, 8. doi: 10.1038/s41598-018-33125-3
- Amroun, H. *et al.* (2005) 'Early-onset ankylosing spondylitis is associated with a functional MICA polymorphism', *Human Immunology*, 66(10), pp. 1057–1061. doi: 10.1016/j.humimm.2005.09.004
- Anderson, B.E. *et al.* (2004) 'Recipient CD4+ T cells that survive irradiation regulate chronic graft-versus-host disease', *Blood*, 104(5), pp. 1565–1573. doi: 10.1182/blood-2004-01-0328
- Anderson, E. *et al.* (2009) 'Limited role of MHC class I chain-related gene A (MICA) typing in assessing graft-versus-host disease risk after fully human leukocyte antigen-matched unrelated donor transplantation', *Blood*, 114(21), 4753-4; author reply 4754-5. doi: 10.1182/blood-2009-08-239301
- Apithy, M.-J. *et al.* (2018) 'Impact of MICA and NKG2D polymorphisms in HLA-fully matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation', *Bone marrow transplantation*, 53(7), p. 918. doi: 10.1038/s41409-017-0083-3
- Artyomov, M.N. *et al.* (2010) 'CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39), pp. 16916–16921. doi: 10.1073/pnas.1010568107

Ashiru, O. *et al.* (2013) 'A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA*008', *The Biochemical Journal*, 454(2), pp. 295–302. doi: 10.1042/BJ20130194

Askar, M. *et al.* (2014) 'Synergistic effect of major histocompatibility complex class I-related chain a and human leukocyte antigen-DPB1 mismatches in association with acute graft-versus-host disease after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation', *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 20(11), pp. 1835–1840. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.07.019

Bahram, S. *et al.* (1994) 'A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(14), pp. 6259–6263.

Balbi, B. *et al.* (1993) 'T-lymphocytes with gamma delta+ V delta 2+ antigen receptors are present in increased proportions in a fraction of patients with tuberculosis or with sarcoidosis', *The American Review of Respiratory Disease*, 148(6 Pt 1), pp. 1685–1690. doi: 10.1164/ajrccm/148.6_Pt_1.1685

Ban, G.H. *et al.* (2001) 'Distribution of MICA microsatellite in 13 population groups of China', *Yi chuan xue bao = Acta genetica Sinica*, 28(12), pp. 1085–1092.

Baranwal, A.K. and Mehra, N.K. (2017) 'Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related A (MICA) Molecules: Relevance in Solid Organ Transplantation', *Frontiers in Immunology*, 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.00182

Bauer, S. *et al.* (1999) 'Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA // Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA', *Science*, 285(285 // 5428), pp. 727–729. doi: 10.1126/science.285.5428.727

Bertotto, A. *et al.* (1993) 'Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection', *European Journal of Immunology*, 23(5), pp. 1177–1180. doi: 10.1002/eji.1830230531

Bilbao, J.R. *et al.* (2002) 'HLA-DRB1 and MHC class 1 chain-related A haplotypes in Basque families with celiac disease', *Tissue Antigens*, 60(1), pp. 71–76.

Blazar, B.R. *et al.* (1996) 'Lethal murine graft-versus-host disease induced by donor gamma/delta expressing T cells with specificity for host nonclassical major histocompatibility complex class Ib antigens', *Blood*, 87(2), pp. 827–837.

Borst, J. *et al.* (1989) 'Non-random expression of T cell receptor γ and δ variable gene segments in functional T lymphocyte clones from human peripheral blood', *European Journal of Immunology*, 19(9), pp. 1559–1568.
doi: 10.1002/eji.1830190907

Boukouaci, W. *et al.* (2009) 'MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease', *Blood*, 114(25), pp. 5216–5224. doi: 10.1182/blood-2009-04-217430

Brandes, M. *et al.* (2009) 'Cross-presenting human $\gamma\delta$ T cells induce robust CD8+ $\alpha\beta$ T cell responses', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), pp. 2307–2312.
doi: 10.1073/pnas.0810059106

Brandes, M., Willimann, K. and Moser, B. (2005) 'Professional Antigen-Presentation Function by Human $\gamma\delta$ T Cells', *Science*, 309(5732), pp. 264–268.
doi: 10.1126/science.1110267

Brenner, M.B. *et al.* (1986) 'Identification of a putative second T-cell receptor', *Nature*, 322(6075), pp. 145–149. doi: 10.1038/322145a0

Carapito, R. *et al.* (2016) 'Matching for the nonconventional MHC-I MICA gene significantly reduces the incidence of acute and chronic GVHD', *Blood*, 128(15), pp. 1979–1986. doi: 10.1182/blood-2016-05-719070

Carapito, R. *et al.* (2017) 'A new MHC-linked susceptibility locus for primary Sjögren's syndrome: MICA', *Human Molecular Genetics*, 26(13), pp. 2565–2576.
doi: 10.1093/hmg/ddx135

Carillon, E. *et al.* (2005) *IMGT RPI entry from gene to protein for Homo sapiens MICA: IMGT Repertoire. IMGT®, the international ImMunoGenetics information system®* <http://www.imgt.org>. <http://www.imgt.org>, 22 December CET. Available at: <http://www.imgt.org/IMGTrepertoireRPI/Proteins/tables/index.php?species=human&gene=MICA>.

Carillon, E. and Frigoul, A. (2005) *IMGT RPI entry from gene to protein for Homo sapiens MICB: IMGT Repertoire. IMGT®, the international ImMunoGenetics information system®* <http://www.imgt.org>. <http://www.imgt.org>, 22 December CET.

Carvalho, A. *et al.* (2002) 'γδ T lymphocytes in the peripheral blood of patients with tuberculosis with and without HIV co-infection', *Thorax*, 57(4), pp. 357–360. doi: 10.1136/thorax.57.4.357

Casorati, G. *et al.* (1989) 'Molecular analysis of human gamma/delta+ clones from thymus and peripheral blood', *The Journal of Experimental Medicine*, 170(5), pp. 1521–1535.

Champagne, E. (2011) 'γδ T cell receptor ligands and modes of antigen recognition', *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 59(2), pp. 117–137. doi: 10.1007/s00005-011-0118-1

Chaudhury, S. *et al.* (2007) 'Incorporating biochemical information and backbone flexibility in RosettaDock for CAPRI rounds 6–12', *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 69(4), pp. 793–800. doi: 10.1002/prot.21731

Chaudhury, S. *et al.* (2011) 'Benchmarking and analysis of protein docking performance in Rosetta v3.2', *PloS One*, 6(8), e22477. doi: 10.1371/journal.pone.0022477

Chen, D. and Gyllenstein, U. (2014) 'MICA polymorphism: biology and importance in cancer', *Carcinogenesis*, 35(12), pp. 2633–2642. doi: 10.1093/carcin/bgu215

Chen, Z. and Freedman, M.S. (2011) 'gammadelta T cells and multiple sclerosis: Friends, foes, or both?' *Autoimmunity Reviews*, 10(6), pp. 364–367. doi: 10.1016/j.autrev.2010.12.005

Chien, Y.H. *et al.* (1987) 'T-cell receptor delta gene rearrangements in early thymocytes', *Nature*, 330(6150), pp. 722–727. doi: 10.1038/330722a0

Chien, Y.H., Jores, R. and Crowley, M.P. (1996) 'Recognition by gamma/delta T cells', *Annual Review of Immunology*, 14, pp. 511–532. doi: 10.1146/annurev.immunol.14.1.511

Chien, Y.-H., Meyer, C. and Bonneville, M. (2014) 'γδ T cells: first line of defense and beyond', *Annual Review of Immunology*, 32, pp. 121–155. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120216

Choi, H.B. *et al.* (2000) 'MICA 5.1 allele is a susceptibility marker for psoriasis in the Korean population', *Tissue Antigens*, 56(6), pp. 548–550. doi: 10.1034/j.1399-0039.2000.560609.x

Chothia, C., Boswell, D.R. and Lesk, A.M. (1988) 'The outline structure of the T-cell alpha beta receptor', *The EMBO Journal*, 7(12), pp. 3745–3755.

Choy, M.-K. and Phipps, M.E. (2010) 'MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease', *Trends in Molecular Medicine*, 16(3), pp. 97–106. doi: 10.1016/j.molmed.2010.01.002

Cohen, R. *et al.* (2002) 'Association of the MIC-A gene and HLA-B51 with Behçet's disease in Arabs and non-Ashkenazi Jews in Israel', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61(2), pp. 157–160. doi: 10.1136/ard.61.2.157

Cox, S.T. *et al.* (2011) 'Major histocompatibility complex class I-related chain A allele mismatching, antibodies, and rejection in renal transplantation', *Human Immunology*, 72(10), pp. 827–834. doi: 10.1016/j.humimm.2011.05.004

Dai, Y. *et al.* (2012) 'Ectopically expressed human tumor biomarker MutS homologue 2 is a novel endogenous ligand that is recognized by human gammadelta T cells to induce innate anti-tumor/virus immunity', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(20), pp. 16812–16819. doi: 10.1074/jbc.M111.327650

Daily, M.D. *et al.* (2005) 'CAPRI rounds 3–5 reveal promising successes and future challenges for RosettaDock', *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 60(2), pp. 181–186. doi: 10.1002/prot.20555

Das, H. *et al.* (2001) 'MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function', *Immunity*, 15(1), pp. 83–93.

Davey, M.S. *et al.* (2018) 'Recasting Human Vδ1 Lymphocytes in an Adaptive Role', *Trends in Immunology*, 39(6), pp. 446–459. doi: 10.1016/j.it.2018.03.003

Davis, M.M. and Bjorkman, P.J. (1988) 'T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition', *Nature*, 334(6181), pp. 395–402. doi: 10.1038/334395a0

Davis, S.J. *et al.* (1998) 'CD2 and the nature of protein interactions mediating cell-cell recognition', *Immunological Reviews*, 163(1), pp. 217–236. doi: 10.1111/j.1600-065X.1998.tb01199.x

Domae, E. *et al.* (2017) 'Cytokine-mediated activation of human ex vivo-expanded V γ 9V δ 2 T cells', *Oncotarget*, 8(28), pp. 45928–45942. doi: 10.18632/oncotarget.17498

Dopfer, E.P. *et al.* (2014) 'The CD3 Conformational Change in the $\gamma\delta$ T Cell Receptor Is Not Triggered by Antigens but Can Be Enforced to Enhance Tumor Killing', *Cell reports*, 7(5), pp. 1704–1715. doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.049

Drobyski, W.R., Vodanovic-Jankovic, S. and Klein, J. (2000) 'Adoptively Transferred T Cells Indirectly Regulate Murine Graft-Versus-Host Reactivity Following Donor Leukocyte Infusion Therapy in Mice', *The Journal of Immunology*, 165(3), pp. 1634–1640. doi: 10.4049/jimmunol.165.3.1634

Eleme, K. *et al.* (2004) 'Cell surface organization of stress-inducible proteins ULBP and MICA that stimulate human NK cells and T cells via NKG2D', *The Journal of Experimental Medicine*, 199(7), pp. 1005–1010. doi: 10.1084/jem.20032194

Ferrick, D.A. *et al.* (1995) 'Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo', *Nature*, 373(6511), pp. 255–257. doi: 10.1038/373255a0

Field, S.F. *et al.* (2008) 'Sequencing-based genotyping and association analysis of the MICA and MICB genes in type 1 diabetes', *Diabetes*, 57(6), pp. 1753–1756. doi: 10.2337/db07-1402

Fodil, N. *et al.* (1996) 'Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene', *Immunogenetics*, 44(5), pp. 351–357. doi: 10.1007/BF02602779

Fodil, N. *et al.* (1999) 'MICA haplotypic diversity', *Immunogenetics*, 49(6), pp. 557–560. doi: 10.1007/s002510050536

Follows, G.A. *et al.* (1992) 'Gamma interferon and interleukin 2, but not interleukin 4, are detectable in gamma/delta T-cell cultures after activation with bacteria', *Infection and Immunity*, 60(3), pp. 1229–1231.

Freedman, M.S. *et al.* (1991) 'Peripheral blood γ - δ T cells lyse fresh human brain—Derived oligodendrocytes', *Annals of Neurology*, 30(6), pp. 794–800. doi: 10.1002/ana.410300608

Freitas, A.A. and Rocha, B. (1999) 'Peripheral T cell survival', *Current Opinion in Immunology*, 11(2), pp. 152–156. doi: 10.1016/S0952-7915(99)80026-0

Frigoul, A. and Lefranc, M.-P. (2005) 'MICA: Standardized IMGT allele nomenclature, polymorphisms and diseases', pp. 95–145.

Gambelunghe, G. *et al.* (1999) 'Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(10), pp. 3701–3707. doi: 10.1210/jcem.84.10.6069

Gambelunghe, G. *et al.* (2000) 'Association of MHC Class I chain-related A (MIC-A) gene polymorphism with Type I diabetes', *Diabetologia*, 43(4), pp. 507–514. doi: 10.1007/s001250051336

Ghadially, H. *et al.* (2017) 'MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) are predominantly expressed intracellularly in tumour and normal tissue', *British Journal of Cancer*, 116(9), pp. 1208–1217. doi: 10.1038/bjc.2017.79

Godder, K.T. *et al.* (2007) 'Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation', *Bone Marrow Transplantation*, 39(12), pp. 751–757. doi: 10.1038/sj.bmt.1705650

Gonzalez, S. *et al.* (1999) 'The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw*0602 in psoriasis', *Arthritis & Rheumatism*, 42(5), pp. 1010–1016. doi: 10.1002/1529-0131(199905)42:5<1010::AID-ANR21>3.0.CO;2-H

Gonzalez-Escribano, M.F. *et al.* (1999) 'Lack of association of MICA transmembrane region polymorphism and Behcet's disease in Spain', *Tissue Antigens*, 54(3), pp. 278–281. doi: 10.1034/j.1399-0039.1999.540309.x

Gorski, J. *et al.* (1994) 'Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(10), pp. 5109–5119.

Gray, J.J. *et al.* (2003) 'Protein–protein docking predictions for the CAPRI experiment', *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 52(1), pp. 118–122. doi: 10.1002/prot.10384

Gray, J.J. *et al.* (2003) 'Protein–Protein Docking with Simultaneous Optimization of Rigid-body Displacement and Side-chain Conformations', *Journal of Molecular Biology*, 331(1), pp. 281–299. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00670-3

Groh, V. *et al.* (1996) 'Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22), pp. 12445–12450.

Groh, V. *et al.* (1998) 'Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells', *Science (New York, N.Y.)*, 279(5357), pp. 1737–1740.

Groh, V. *et al.* (1999) 'Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12), pp. 6879–6884.

Groh, V. *et al.* (2001) 'Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells', *Nature Immunology*, 2(3), pp. 255–260. doi: 10.1038/85321

Groh, V. *et al.* (2003) 'Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis', *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(16), pp. 9452–9457. doi: 10.1073/pnas.1632807100

Guo, Y. *et al.* (1995) 'Human T-cell recognition of *Listeria monocytogenes*: recognition of listeriolysin O by TcR alpha beta + and TcR gamma delta + T cells', *Infection and Immunity*, 63(6), pp. 2288–2294.

Gupta, M. *et al.* (2003) 'Association between the transmembrane region polymorphism of MHC class I chain related gene-A and type 1 diabetes mellitus in Sweden', *Human Immunology*, 64(5), pp. 553–561.

Haas, W., Pereira, P. and Tonegawa, S. (1993) 'Gamma/delta cells', *Annual Review of Immunology*, 11, pp. 637–685. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.003225

Hampfl, J. *et al.* (1999) 'The Specificity of a Weak $\gamma\delta$ TCR Interaction Can Be Modulated by the Glycosylation of the Ligand', *The Journal of Immunology*, 163(1), pp. 288–294. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/163/1/288.full.pdf>.

Hara, T. *et al.* (1992) 'Predominant activation and expansion of V gamma 9-bearing gamma delta T cells in vivo as well as in vitro in *Salmonella* infection', *Journal of Clinical Investigation*, 90(1), pp. 204–210.

Harly, C. *et al.* (2012) 'Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset', *Blood*, 120(11), pp. 2269–2279. doi: 10.1182/blood-2012-05-430470

Hayday, A.C. and Spencer, J. (2009) 'Barrier immunity', *Seminars in Immunology*, 21(3), pp. 99–100. doi: 10.1016/j.smim.2009.04.003

Herold, G. (ed.) (2016) *Innere Medizin 2016: Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln: Selbstverlag.

Holoshitz, J. *et al.* (1992) 'Dual antigenic recognition by cloned human gamma delta T cells', *Journal of Clinical Investigation*, 89(1), pp. 308–314.

Horton, R. *et al.* (2004) 'Gene map of the extended human MHC', *Nature Reviews. Genetics*, 5(12), pp. 889–899. doi: 10.1038/nrg1489

Huang, S. and Moody, D.B. (2016) 'Donor-unrestricted T cells in the human CD1 system', *Immunogenetics*, 68(8), pp. 577–596. doi: 10.1007/s00251-016-0942-x

Hüe, S. *et al.* (2003) 'Potential role of NKG2D/MHC class I-related chain A interaction in intrathymic maturation of single-positive CD8 T cells', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(4), pp. 1909–1917.

Hüe, S. *et al.* (2004) 'A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease', *Immunity*, 21(3), pp. 367–377. doi: 10.1016/j.immuni.2004.06.018

Hunt, C. and Morimoto, R.I. (1985) 'Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(19), pp. 6455–6459.

Isernhagen, A. *et al.* (2015) 'The MICA-129 dimorphism affects NKG2D signaling and outcome of hematopoietic stem cell transplantation', *EMBO Molecular Medicine*, 7(11), pp. 1480–1502. doi: 10.15252/emmm.201505246

Jonsson, P. *et al.* (2016) 'Remarkably low affinity of CD4/peptide-major histocompatibility complex class II protein interactions', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(20), pp. 5682–5687. doi: 10.1073/pnas.1513918113

Kaufmann, S.H. (1996) 'gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do?' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6), pp. 2272–2279.

Kemal Aydintug, M. *et al.* (2014) 'γδ T cells recognize the insulin B:9–23 peptide antigen when it is dimerized through thiol oxidation', *Molecular Immunology*, 60(2), pp. 116–128. doi: 10.1016/j.molimm.2014.04.007

Kirsten, H. *et al.* (2009) 'Association of MICA with rheumatoid arthritis independent of known HLA-DRB1 risk alleles in a family-based and a case control study', *Arthritis Research & Therapy*, 11(3), R60. doi: 10.1186/ar2683

Komatsu-Wakui, M. *et al.* (1999) 'MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype', *Immunogenetics*, 49(7-8), pp. 620–628.

Kong, Y. *et al.* (2009) 'The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCR γ 9/ δ 2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCR γ δ and NKG2D', *Blood*, 114(2), pp. 310–317. doi: 10.1182/blood-2008-12-196287

Kozbor, D. *et al.* (1989) 'Human TCR-gamma+/delta+, CD8+ T lymphocytes recognize tetanus toxoid in an MHC-restricted fashion', *The Journal of Experimental Medicine*, 169(5), pp. 1847–1851.

Lamb, L.S., JR *et al.* (1996) 'Increased frequency of TCR gamma delta + T cells in disease-free survivors following T cell-depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia', *Journal of Hematotherapy*, 5(5), pp. 503–509. doi: 10.1089/scd.1.1996.5.503

Lang, F. *et al.* (1995) 'Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 154(11), pp. 5986–5994.

Lefranc, M.-P. (2003) 'IMGT, the international ImMunoGeneTics database®', *Nucleic Acids Research*, 31(1), pp. 307–310.

Lefranc, M.-P. *et al.* (2015) 'IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on', *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D413-22. doi: 10.1093/nar/gku1056

Li, P. *et al.* (1999) 'Crystal Structure of the MHC Class I Homolog MIC-A, a $\gamma\delta$ T Cell Ligand // Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand', *Immunity*, 10(10 // 5), pp. 577–584.

Li, P. *et al.* (2001) 'Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA', *Nature Immunology*, 2(5), pp. 443–451. doi: 10.1038/87757

Li, Q.-J. *et al.* (2004) 'CD4 enhances T cell sensitivity to antigen by coordinating Lck accumulation at the immunological synapse', *Nature Immunology*, 5(8), pp. 791–799. doi: 10.1038/ni1095

- Li, Y. *et al.* (2017) 'V γ 4 $\gamma\delta$ T Cells Provide an Early Source of IL-17A and Accelerate Skin Graft Rejection', *Journal of Investigative Dermatology*, 137(12), pp. 2513–2522. doi: 10.1016/j.jid.2017.03.043
- Lopez-Vazquez, A. *et al.* (2002) 'MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1*0501/DQB1*0201', *Gut*, 50(3), pp. 336–340.
- Lu, J. *et al.* (2011) *The effect of MICA antigens on transplant outcomes: a systematic review*. England.
- Luoma, A.M. *et al.* (2013) 'Crystal structure of V δ 1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human $\gamma\delta$ T cells', *Immunity*, 39(6), pp. 1032–1042. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.001
- Lyskov, S. *et al.* (2013) 'Serverification of Molecular Modeling Applications: The Rosetta Online Server That Includes Everyone (ROSIE)', *PLOS ONE*, 8(5), e63906. doi: 10.1371/journal.pone.0063906
- Lyskov, S. and Gray, J.J. (2008) 'The RosettaDock server for local protein-protein docking', *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), W233-8. doi: 10.1093/nar/gkn216
- Maeda, Y. *et al.* (2005) 'Critical role of host gammadelta T cells in experimental acute graft-versus-host disease', *Blood*, 106(2), pp. 749–755. doi: 10.1182/blood-2004-10-4087
- Maria, A. de *et al.* (1992) 'Selective Increase of a Subset of T Cell Receptor $\gamma\delta$ T Lymphocytes in the Peripheral Blood of Patients with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection', *The Journal of Infectious Diseases*, 165(5), pp. 917–919. doi: 10.1093/infdis/165.5.917
- Minculescu, L. and Sengelov, H. (2015) 'The role of gamma delta T cells in haematopoietic stem cell transplantation', *Scandinavian Journal of Immunology*, 81(6), pp. 459–468. doi: 10.1111/sji.12289
- Mitsuishi Y (1999) *Accession numbers AF106632 to AF106655 (AH007472 to AH007479) in EMBL/GenBank/DDBJ databases.*

Mizuki, N. *et al.* (1997) 'Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(4), pp. 1298–1303.

Mizuki, N. *et al.* (1999) 'Association analysis between the MIC-A and HLA-B alleles in Japanese patients with Behet's disease', *Arthritis & Rheumatism*, 42(9), pp. 1961–1966. doi: 10.1002/1529-0131(199909)42:9<1961::AID-ANR23>3.0.CO;2-7

Mizuki, N. *et al.* (2000) 'Localization of the Pathogenic Gene of Behcet's Disease by Microsatellite Analysis of Three Different Populations', *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(12), pp. 3702–3708.

Mohd Razali, N. and Yap, B. (2011) 'Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling Tests', *J. Stat. Model. Analytics*, 2(1), pp. 21–33.

Morita, C.T. *et al.* (2007) 'Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human V γ 2V δ 2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens', *Immunological Reviews*, 215(1), pp. 59–76. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00479.x

Moser, B. and Brandes, M. (2006) ' $\gamma\delta$ T cells: an alternative type of professional APC', *Trends in Immunology*, 27(3), pp. 112–118. doi: 10.1016/j.it.2006.01.002

Munk, M.E., Gatrill, A.J. and Kaufmann, S.H. (1990) 'Target cell lysis and IL-2 secretion by gamma/delta T lymphocytes after activation with bacteria', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 145(8), pp. 2434–2439.

Murphy, K. and Weaver, C. (eds.) (2018) *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Murphy, K.M. and Weaver, C. (2017) *Janeway's immunobiology*. 9th edn. New York: GS Garland Science Taylor & Francis Group.

Murphy, K.M. and Weaver, C. (2018) *Janeway Immunologie*. 9th edn. (Springer Lehrbuch). Berlin: Springer Spektrum. Available at: <http://www.springer.com/>.

Naruse, T.K. *et al.* (2011) 'ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey', *Immunogenetics*, 63(8), pp. 501–509. doi: 10.1007/s00251-011-0531-y

Nielsen, M. *et al.* (2010) 'CPHmodels-3.0--remote homology modeling using structure-guided sequence profiles', *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server issue), W576-81. doi: 10.1093/nar/gkq535

Nishimura, H. *et al.* (1995) 'The role of gamma delta T cells in priming macrophages to produce tumor necrosis factor-alpha', *European Journal of Immunology*, 25(5), pp. 1465–1468. doi: 10.1002/eji.1830250551

Obuchi, N. *et al.* (2001) 'Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4', *Tissue Antigens*, 57(6), pp. 520–535.

Orchard, T.R. *et al.* (2001) 'MHC class I chain-like gene A (MICA) and its associations with inflammatory bowel disease and peripheral arthropathy', *Clinical and Experimental Immunology*, 126(3), pp. 437–440. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01662.x

Pabst, C. *et al.* (2007) 'The graft content of donor T cells expressing gamma delta TCR+ and CD4+foxp3+ predicts the risk of acute graft versus host disease after transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells from unrelated donors', *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(10), pp. 2916–2922. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2602

Panigrahi, A. *et al.* (2007) 'Post Transplant Development of MICA and Anti-HLA Antibodies is Associated with Acute Rejection Episodes and Renal Allograft Loss', *Human Immunology*, 68(5), pp. 362–367. doi: 10.1016/j.humimm.2007.01.006

Papotto, P.H. *et al.* (2018) 'Innately versatile: $\gamma\delta 17$ T cells in inflammatory and autoimmune diseases', *Journal of Autoimmunity*, 87, pp. 26–37. doi: 10.1016/j.jaut.2017.11.006

Parker, C.M. *et al.* (1990) 'Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire', *The Journal of Experimental Medicine*, 171(5), pp. 1597–1612.

Parmar, S. *et al.* (2009) 'Donor-recipient mismatches in MHC class I chain-related gene A in unrelated donor transplantation lead to increased incidence of acute graft-versus-host disease', *Blood*, 114(14), pp. 2884–2887. doi: 10.1182/blood-2009-05-223172

Perera, M.K. *et al.* (1994) 'Transient increase in circulating gamma/delta T cells during Plasmodium vivax malarial paroxysms', *The Journal of Experimental Medicine*, 179(1), pp. 311–315.

Perez-Rodriguez, M. *et al.* (2000) 'A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite', *Tissue Antigens*, 55(2), pp. 162–165. doi: 10.1034/j.1399-0039.2000.550209.x

Perez-Rodriguez, M. *et al.* (2002) 'Further polymorphism of the MICA gene', *European Journal of Immunogenetics*, 29(1), pp. 35–46. doi: 10.1046/j.0960-7420.2001.00275.x

Perko, R. *et al.* (2015) 'Gamma delta T cell reconstitution is associated with fewer infections and improved event-free survival after hematopoietic stem cell transplantation for pediatric leukemia', *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 21(1), pp. 130–136. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.09.027

Petersdorf, E.W. *et al.* (1999) 'Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene', *Immunogenetics*, 49(7), pp. 605–612. doi: 10.1007/s002510050655

Pettersen, E.F. *et al.* (2004) 'UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis', *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), pp. 1605–1612. doi: 10.1002/jcc.20084

Poquet, Y. *et al.* (1998) 'Expansion of V γ 9V δ 2 T Cells Is Triggered by Francisella tularensis-Derived Phosphoantigens in Tularemia but Not after Tularemia Vaccination', *Infection and Immunity*, 66(5), pp. 2107–2114.

- Quiroga, I. *et al.* (2004) 'Identification of a novel MICA allele: MICA*051', *Tissue Antigens*, 63(5), pp. 466–469. doi: 10.1111/j.0001-2815.2004.00195.x
- Raziuddin, S. *et al.* (1992) 'γδ T cells and the immune response in visceral leishmaniasis', *European Journal of Immunology*, 22(5), pp. 1143–1148. doi: 10.1002/eji.1830220506
- Reiher, M. *et al.* (2017) 'Elucidating reaction mechanisms on quantum computers', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(29), pp. 7555–7560. doi: 10.1073/pnas.1619152114
- Rellahan, B.L. *et al.* (1991) 'Junctional sequences influence the specificity of gamma/delta T cell receptors', *The Journal of Experimental Medicine*, 173(2), pp. 503–506.
- Rhodes, D.A. *et al.* (2001) 'The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex', *Genomics*, 71(3), pp. 351–362. doi: 10.1006/geno.2000.6406
- Rhodes, D.A., Reith, W. and Trowsdale, J. (2016) 'Regulation of Immunity by Butyrophilins', *Annual Review of Immunology*, 34, pp. 151–172. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055435
- Robinson, J. *et al.* (2001) 'MICA Sequences 2000', *Immunogenetics*, 53(2), pp. 150–169. doi: 10.1007/s002510100303
- Robinson, J. *et al.* (2006) 'The IMGT/HLA and IPD databases', *Human Mutation*, 27(12), pp. 1192–1199. doi: 10.1002/humu.20406
- Robinson, J. *et al.* (2013) 'IPD--the Immuno Polymorphism Database', *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D1234-40. doi: 10.1093/nar/gks1140
- Robinson, J. *et al.* (2015) 'The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases', *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D423-31. doi: 10.1093/nar/gku1161
- Romain, M. *et al.* (2013) 'Key role of Free Heavy Chain of HLA class I molecules in HCMV and tumor stress sensing by gamma-delta TCR', *Frontiers in Immunology*, 4. doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00960

Rueda, B. *et al.* (2002) 'A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats', *Tissue Antigens*, 60(6), pp. 526–528. doi: 10.1034/j.1399-0039.2002.600608.x

Salvarani, C. *et al.* (2001) 'Association of MICA alleles and HLA-B51 in Italian patients with Behçet's disease.', *The Journal of Rheumatology*, 28(8), pp. 1867–1870.

Sanchez-Zapardiel, E. *et al.* (2013) 'Harmful effect of preformed anti-MICA antibodies on renal allograft evolution in early posttransplantation period', *Transplantation*, 96(1), pp. 70–78. doi: 10.1097/TP.0b013e3182943506

Scalise, F. *et al.* (1992) 'Lymphocytes bearing the gamma delta T-cell receptor in acute toxoplasmosis', *Immunology*, 76(4), pp. 668–670.

Schatz, D.G. (2004) 'Antigen receptor genes and the evolution of a recombinase', *Seminars in Immunology*, 16(4), pp. 245–256. doi: 10.1016/j.smim.2004.08.004

Schilbach, K. *et al.* (2008) 'Immune response of human propagated gammadelta-T-cells to neuroblastoma recommend the Vdelta1+ subset for gammadelta-T-cell-based immunotherapy', *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 31(9), pp. 896–905. doi: 10.1097/CJI.0b013e31818955ad

Schild, H. *et al.* (1994) 'The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells', *Cell*, 76(1), pp. 29–37.

Schrambach, S. *et al.* (2007) 'In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer', *PloS One*, 2(6), e518. doi: 10.1371/journal.pone.0000518

Sebestyen, Z. *et al.* (2016) 'RhoB mediates phosphoantigen recognition by Vγ9Vδ2 T cell receptor', *Cell Reports*, 15(9), pp. 1973–1985. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.081

Shiromizu, C.M. and Jancic, C.C. (2018) 'γδ T Lymphocytes: An Effector Cell in Autoimmunity and Infection', *Frontiers in Immunology*, 9, p. 2389. doi: 10.3389/fimmu.2018.02389

Siegers, G.M. (2018) 'Integral Roles for Integrins in $\gamma\delta$ T Cell Function', *Frontiers in Immunology*, 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.00521

Sivasubramanian, A. *et al.* (2006) 'Structural Model of the mAb 806-EGFR Complex Using Computational Docking followed by Computational and Experimental Mutagenesis', *Structure*, 14(3), pp. 401–414. doi: 10.1016/j.str.2005.11.022

Sivasubramanian, A., Maynard, J.A. and Gray, J.J. (2008) 'Modeling the structure of mAb 14B7 bound to the anthrax protective antigen', *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 70(1), pp. 218–230. doi: 10.1002/prot.21595

Skeen, M.J. and Ziegler, H.K. (1995) 'Activation of gamma delta T cells for production of IFN-gamma is mediated by bacteria via macrophage-derived cytokines IL-1 and IL-12', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 154(11), pp. 5832–5841.

Solenov, D., Brieler, J. and Scherrer, J.F. (2018) 'The Potential of Quantum Computing and Machine Learning to Advance Clinical Research and Change the Practice of Medicine', *Missouri Medicine*, 115(5), pp. 463–467.

Spada, F.M. *et al.* (2000) 'Self-Recognition of Cd1 by $\gamma\delta$ T Cells: Implications for Innate Immunity', *The Journal of Experimental Medicine*, 191(6), pp. 937–948.

Steinle, A. *et al.* (2001) 'Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family', *Immunogenetics*, 53(4), pp. 279–287.

Steinle, A., Groh, V. and Spies, T. (1998) 'Diversification, expression, and $\gamma\delta$ T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), pp. 12510–12515.

Stepanek, O. *et al.* (2014) 'Coreceptor scanning by the T cell receptor provides a mechanism for T cell tolerance', *Cell*, 159(2), pp. 333–345. doi: 10.1016/j.cell.2014.08.042

Subauste, C.S. *et al.* (1995) 'Preferential activation and expansion of human peripheral blood gamma delta T cells in response to *Toxoplasma gondii* in vitro

and their cytokine production and cytotoxic activity against T. gondii-infected cells', *The Journal of Clinical Investigation*, 96(1), pp. 610–619. doi: 10.1172/JCI118076

Sumida, T. *et al.* (1992) 'Predominant expansion of V gamma 9/V delta 2 T cells in a tularemia patient', *Infection and Immunity*, 60(6), pp. 2554–2558.

Tieng, V. *et al.* (2002) 'Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), pp. 2977–2982. doi: 10.1073/pnas.032668099

Tsukaguchi, K., Balaji, K.N. and Boom, W.H. (1995) 'CD4+ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to Mycobacterium tuberculosis. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 154(4), pp. 1786–1796.

Uldrich, A.P. *et al.* (2013) 'CD1d-lipid antigen recognition by the $\gamma\delta$ TCR', *Nature immunology*, 14(11), p. 1137. doi: 10.1038/ni.2713

van der Merwe, P A and Barclay, A.N. (1994) 'Transient intercellular adhesion: the importance of weak protein-protein interactions', *Trends in Biochemical Sciences*, 19(9), pp. 354–358.

Vantourout, P. and Hayday, A. (2013) 'Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology*', *Nature Reviews. Immunology*, 13(2), pp. 88–100. doi: 10.1038/nri3384

Vermijlen, D. *et al.* (2018) ' $\gamma\delta$ T cell responses: How many ligands will it take till we know?' *Seminars in Cell & Developmental Biology*. doi: 10.1016/j.semcd.2017.10.009

Vetter, C.S. *et al.* (2002) 'Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma', *The Journal of Investigative Dermatology*, 118(4), pp. 600–605. doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01700.x

- Vetter, C.S. *et al.* (2004) 'Loss of nonclassical MHC molecules MIC-A/B expression during progression of uveal melanoma', *British Journal of Cancer*, 91(8), pp. 1495–1499. doi: 10.1038/sj.bjc.6602123
- Viale, M., Ferrini, S. and Bacigalupo, A. (1992) 'TCR gamma/delta positive lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation', *Bone Marrow Transplantation*, 10(3), pp. 249–253.
- Vidović, D. *et al.* (1989) 'Qa-1 restricted recognition of foreign antigen by a $\gamma\delta$ T-cell hybridoma', *Nature*, 340(6235), p. 646. doi: 10.1038/340646a0
- Visser, C.J.T. *et al.* (1999) 'Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes', *Immunogenetics*, 49(6), pp. 561–566. doi: 10.1007/s002510050537
- Vivier, E., Tomasello, E. and Paul, P. (2002) 'Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition?' *Current Opinion in Immunology*, 14(3), pp. 306–311.
- Wagner, D.H. (2007) 'Re-shaping the T cell repertoire: TCR editing and TCR revision for good and for bad', *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 123(1), pp. 1–6. doi: 10.1016/j.clim.2006.08.006
- Wallace, G.R. *et al.* (1999) 'MIC-A allele profiles and HLA class I associations in Behçet's disease', *Immunogenetics*, 49(7-8), pp. 613–617.
- Wang, C., Schueler-Furman, O. and Baker, D. (2005) 'Improved side-chain modeling for protein–protein docking', *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, 14(5), pp. 1328–1339. doi: 10.1110/ps.041222905
- Weber, S. and Karjalainen, K. (1993) 'Mouse CD4 binds MHC class II with extremely low affinity', *International Immunology*, 5(6), pp. 695–698. doi: 10.1093/intimm/5.6.695
- Wei, F., Zhang, Y.U. and Li, W. (2016) 'A meta-analysis of the association between Behçet's disease and MICA-A6', *Biomedical Reports*, 4(6), pp. 741–745. doi: 10.3892/br.2016.644

- Willcox, B.E. and Willcox, C.R. (2019) 'γδ TCR ligands: the quest to solve a 500-million-year-old mystery', *Nature immunology*, 20(2), p. 121. doi: 10.1038/s41590-018-0304-y
- Willcox, C.R. *et al.* (2012) 'Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human γδ T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor', *Nature immunology*, 13(9), p. 872. doi: 10.1038/ni.2394
- Wilson, I.A. and Stanfield, R.L. (2001) 'Unraveling the mysteries of γδ T cell recognition', *Nature immunology*, 2(7), p. 579. doi: 10.1038/89718
- Wright, G.J. (2009) 'Signal initiation in biological systems: the properties and detection of transient extracellular protein interactions††This article is part of a Molecular BioSystems themed issue on Computational and Systems Biology', *Molecular Biosystems*, 5(12), pp. 1405–1412. doi: 10.1039/b903580j
- Wu, J., Groh, V. and Spies, T. (2002) 'T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(3), pp. 1236–1240.
- Xu, B. *et al.* (2011) 'Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(6), pp. 2414–2419. doi: 10.1073/pnas.1015433108
- Yabe, M. *et al.* (1994) 'Transition of T cell receptor gamma/delta expressing double negative (CD4-/CD8-) lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation', *Bone Marrow Transplantation*, 14(5), pp. 741–746.
- Yabuki, K. *et al.* (1999) 'Association of MICA gene and HLA-B*5101 with Behçet's disease in Greece', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40(9), pp. 1921–1926.
- Yao, Z. *et al.* (1999) 'Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing', *European Journal of Immunogenetics*, 26(2), pp. 225–232. doi: 10.1046/j.1365-2370.1999.00094.x-i2

- Yap, B.W. and Sim, C.H. (2011) 'Comparisons of various types of normality tests', *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 81(12), pp. 2141–2155. doi: 10.1080/00949655.2010.520163
- Ye, J. *et al.* (2012) 'Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction', *BMC Bioinformatics*, 13, p. 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134
- Ying, Y. *et al.* (2013) 'Distribution of MICB diversity in the Zhejiang Han population: PCR sequence-based typing for exons 2-6 and identification of five novel MICB alleles', *Immunogenetics*, 65(7), pp. 485–492. doi: 10.1007/s00251-013-0699-4
- Yoshida, K. *et al.* (2011) 'Role of the MICA polymorphism in systemic lupus erythematosus', *Arthritis and Rheumatism*, 63(10), pp. 3058–3066. doi: 10.1002/art.30501
- Zeine, R. *et al.* (1998) 'Mechanism of $\gamma\delta$ T cell-induced human oligodendrocyte cytotoxicity: relevance to multiple sclerosis', *Journal of Neuroimmunology*, 87(1), pp. 49–61. doi: 10.1016/S0165-5728(98)00047-2
- Zeng, X. *et al.* (2014) 'Gamma delta T cells recognize haptens and mount a hapten-specific response', *ELife*, 3, e03609. doi: 10.7554/eLife.03609
- Zhang, J. *et al.* (2016) 'Association between Functional MICA-TM and Behcet's Disease: A Systematic Review and Meta-analysis', *Scientific Reports*, 6. doi: 10.1038/srep21033
- Zhao, J. *et al.* (2006) 'Vdelta1 T cell receptor binds specifically to MHC I chain related A: molecular and biochemical evidences', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339(1), pp. 232–240. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.198
- Zhao, Y. *et al.* (2017) 'Prognostic value of MICA/B in cancers: a systematic review and meta-analysis', *Oncotarget*, 8(56), pp. 96384–96395. doi: 10.18632/oncotarget.21466

Zhou, J. *et al.* (2012) 'Anti- $\gamma\delta$ TCR antibody-expanded $\gamma\delta$ T cells: a better choice for the adoptive immunotherapy of lymphoid malignancies', *Cellular and Molecular Immunology*, 9(1), pp. 34–44. doi: 10.1038/cmi.2011.16

Zou, Y. *et al.* (2006) 'Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry', *Human Immunology*, 67(3), pp. 230–237. doi: 10.1016/j.humimm.2006.02.017

Zou, Y. and Stastny, P. (2010) 'Role of MICA in the immune response to transplants', *Tissue Antigens*, 76(3), pp. 171–176. doi: 10.1111/j.1399-0039.2010.01527.x

Zwirner NW, Molinero LL, Fuertes MB and Fainboim L. (2003) *Accession number AY204547 in EMBL/GenBank/DDBJ databases.*



8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter Betreuung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach, Frau Katja Kühn und Frau Jenny Bauer von mir eigenständig mit Unterstützung durch die genannten Labormitglieder durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig nach Anleitung durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

David Josef Heister

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Karin Schilbach ausdrücken, die mir bei allen Fragen oder Problemen über die gesamte Zeit hilfreich zur Seite stand. Neben den konstruktiven Anregungen und dem mir entgegengebrachtem Verständnis wurde nie der zwischenmenschliche Aspekt aus den Augen verloren und ich in meinen Bestrebungen auch abseits der Promotion immer unterstützt.

Zudem möchte ich mich bei Frau Katja Kühn und Frau Jenny Bauer für die sehr gute Einarbeitung und Unterstützung, insbesondere in den Labortätigkeiten, sowie die konstruktiven Ideen während der gesamten Forschungszeit, bedanken. Das freundschaftliche Verhältnis hat stets eine sehr angenehme Atmosphäre geschaffen.

Ebenfalls möchte ich mich außerordentlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die immer hinter mir standen und mir Motivation gegeben haben. In diesem Zusammenhang geht ein außerordentlicher Dank an Frau Kathrin Härtig.

Ein besonderer Dank geht zudem an Herrn Maximilian Holweg für seine treue und enge Freundschaft während der gesamten Zeit des Studiums und darüber hinaus.

Nur mit Hilfe der oben aufgeführten Menschen war es mir möglich meinen bisherigen Lebensweg voller Motivation und Freude zu beschreiten.

Vielen Dank.