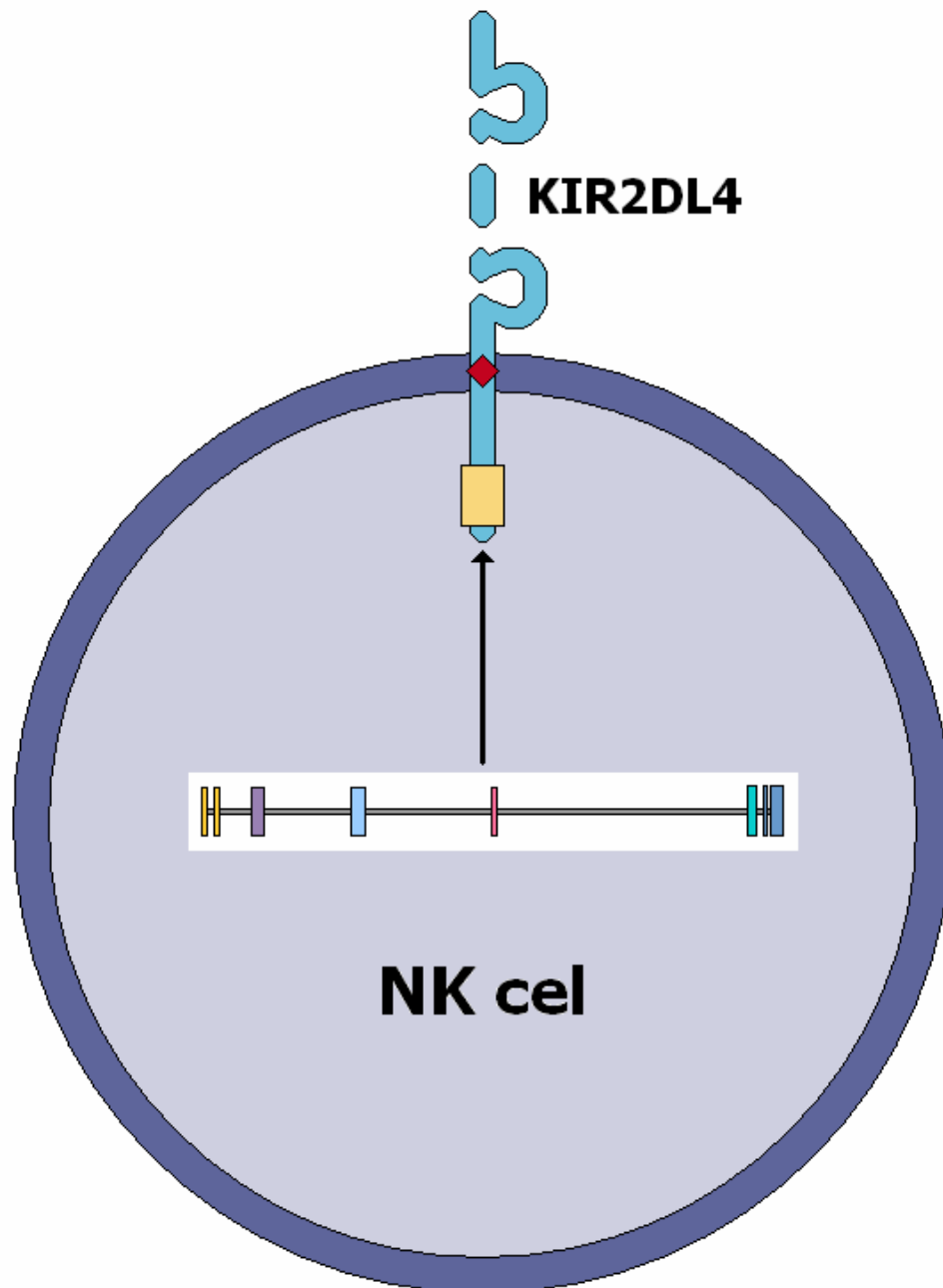


# Karakterisatie van KIR2DL4 polymorfismen

## Characterization of KIR2DL4 polymorphisms



**Linda van Oijen**

Verslag van afstudeeropdracht  
januari 2007 tot en met juli 2007  
Life Sciences, afstudeerrichting Molecular Biology

# Karakterisatie van KIR2DL4 polymorfismen

## Characterization of KIR2DL4 polymorphisms



Universitair Medisch Centrum  
*Utrecht*

### **Afstudeerplaats:**

**Universitair Medisch Centrum Utrecht**  
Afdeling Immunologie  
Heidelberglaan 100, Utrecht

### **Afstudeerbegeleiders:**

Drs. Jennifer Schellekens  
Dr. Marcel G.J. Tilanus



### **Hogeschool:**

**Hogeschool Utrecht**  
Faculteit Natuur en Techniek  
Institute for Life Sciences en Chemistry  
F.C. Dondersstraat 65, Utrecht

### **Afstudeerdocent:**

Dr. Robert Jan Veldman

# Voorwoord

Dit is het verslag van mijn afstudeeropdracht voor de opleiding Life Sciences, afstudeerrichting Molecular Biology aan de faculteit Natuur en Techniek van de Hogeschool Utrecht. Deze afstudeeropdracht heb ik uitgevoerd op de afdeling Immunologie van het Universitair Medisch Centrum Utrecht. Ik werd hierin begeleid door Jennifer Schellekens en Marcel Tilanus vanuit het UMC, en door Robert Jan Veldman vanuit de HU.

Ik heb veel geleerd tijdens het uitvoeren van mijn afstudeeropdracht. En ik heb het heel erg naar mijn zin gehad op de afdeling Immunologie.

Hierbij wil ik Jennifer bedanken voor de tijd die ze vrij gemaakt heeft om mij te begeleiden. Ook wil ik haar bedanken voor alle hulp met mijn presentaties en verslag. Verder wil ik haar veel succes wensen met haar promotie.

Marcel wil ik bedanken voor zijn hulp bij de presentaties en het verslag. En voor zijn hulp bij het verder ontwikkelen van een aantal vaardigheden.

Robert Jan wil ik bedanken voor zijn tijd en tips.

Verder wil ik iedereen die me geholpen heeft bedanken. En iedereen van het AMI-HLA lab wil ik bedanken voor de gezelligheid.

# Samenvatting

Hematopoietische stamceltransplantatie is een behandeling voor onder andere patiënten met leukemie en lymfoma. Voor deze behandeling is een donor nodig. Het belangrijkste voor een donor is dat deze gematcht is met de patiënt op basis van het HLA repertoire. Omdat er allerlei immunoreacties op kunnen treden na de transplantatie is de balans tussen de patiënt- en donorcellen heel belangrijk. Afstoting van het transplantaat is een immunoreactie welke op kan treden na transplantatie. Een andere immunoreactie die op kan treden is het positieve graft versus leukemie effect. Hierbij elimineren de donor T cellen de achtergebleven leukemiecellen. Deze T cellen kunnen echter ook de gezonde cellen van de patiënt elimineren waardoor het ernstige graft versus host disease optreedt. Om graft versus host disease te voorkómen kunnen de T cellen uit het transplantaat worden verwijderd en later worden toegediend. Hierdoor neemt wel de kans op afstoting toe en het graft versus leukemie effect neemt af, waardoor de kans op recidieven toeneemt.

Natural killer cellen zijn cellen van het cellulaire immuunsysteem en ze omvatten 10-15% van alle lymfocyten. Karakteristiek voor de natural killer cellen is de missing-self hypothese. Dit wil zeggen dat een natural killer cel een cel doodt als deze geen of niet het juiste HLA molecuul tot expressie brengt. Natural killer cellen brengen verscheidene soorten receptoren tot expressie. Eén van die soorten zijn de KIR receptoren, welke het opvallendst zijn vanwege hun rol in de hematopoietische stamcel transplantatie. De KIR receptor is een transmembraan receptor en kan een inhiberende of activerende functie hebben. Er zijn 14 verschillende KIR receptoren bekend die ieder worden gecodeerd door een apart gen. Het KIR genotype is niet voor alle personen hetzelfde. Eén van de drie KIR receptoren die wel bij elke persoon aanwezig is, is KIR2DL4. KIR2DL4 is qua opbouw een uitzondering op de andere 13 KIR receptoren. KIR2DL4 heeft zowel inhiberende als activerende eigenschappen, maar welke functie KIR2DL4 precies heeft is niet bekend. Er kan onderscheid gemaakt worden in 23 KIR2DL4 allelen op basis van verschillende polymorfe posities.

Van andere KIRs is bekend dat de polymorfismen invloed hebben op de expressie van de receptor op de membraan. Over de invloed van de polymorfismen van KIR2DL4 op de expressie is nog niets bekend. Om hier meer over te weten te komen moeten de allelen eerst geïdentificeerd worden met sequence based typing. Dit is gedaan met DNA van patiënten en donoren en hierbij zijn nieuwe combinaties van polymorfismen gevonden. Ook zijn er nieuwe polymorfe posities gevonden. De sequentie van het hele gescheiden gen is nodig om deze nog onbekende allelen te kunnen submitten naar de database. Het verkrijgen van deze sequentie is het doel van het onderzoek. Dit doel werd geprobeerd te bereiken met RNA als uitgangsmateriaal, omdat daarin geen intronen aanwezig zijn. Het RNA werd omgezet in cDNA en geamplificeerd. Hierna werd het product gekloneerd om de allelen te scheiden en vervolgens kon de sequentie bepaald worden.

Bij het optimaliseren van de amplificatie bleken de primers, rePCR en het gebruik van een kit voor lange PCR producten cruciaal te zijn. De eerder gevonden onbekende allelen werden nog niet bevestigd. Wel werd er een andere nieuwe polymorfe positie gevonden. Ook werd er alternatieve splicing van het KIR2DL4 gen gevonden. Hierdoor waren gedeelten van exonen of hele exonen niet aanwezig of waren er zelfs gedeelten van intronen aanwezig. Dit heeft invloed op de expressie van de receptor. Mogelijk wordt de receptor niet tot expressie gebracht. Een andere mogelijkheid is dat de receptor wel tot expressie komt, maar dat er gedeelten missen waardoor deze niet (goed) functioneert. Er werden dus inderdaad aanwijzingen gevonden voor veranderde expressie van de verschillende allelen. Of dit ook werkelijk zo is zal met verder onderzoek moeten worden aangetoond.

## Summary

Haematopoietic stem cell transplantation is a treatment for patients with leukaemia or lymphoma. For this treatment a donor is needed. Crucial for the selection of a donor is the matching of the HLA repertoire between patient and donor. The balance of patient and donor cells is very important, because of the immune responses after transplantation. Graft failure can occur after transplantation. Another immune response is the beneficial graft versus leukaemia effect. In this effect the donor T cells eliminate the residual leukaemia cells. However, these donor T cells could also eliminate the healthy cells of the patient, causing graft versus host disease. To prevent graft versus host disease, the T cells could be depleted from the transplant and injected later. Because of this the chance of graft failure increases and the graft versus leukaemia effect decreases which results in higher relapse rates.

Natural killer cells are cells of the cellular immune system and comprise 10-15% of all lymphocytes. Characteristic for the natural killer cells is the missing-self hypothesis. This hypothesis states that a target cell which expresses no or the wrong HLA molecule, is lysed by the natural killer cell. Natural killer cells express several types of receptors, of which the KIRs are most prominent for their role in haematopoietic stem cell transplantation. The KIR receptor is a transmembrane receptor with inhibitory or activating function. There are 14 different KIR receptors each encoded by an individual gene. The KIR genotype is not the same for each individual. One of the three KIR receptors that are present in each individual is KIR2DL4. Looking at the structure, KIR2DL4 is an exception compared to the other 13 KIR receptors. KIR2DL4 has both inhibiting and activating characteristics, but the exact function of KIR2DL4 is not known. Based on different polymorphic positions, 23 alleles of KIR2DL4 can be discriminated.

For other KIRs it is known that polymorphisms affect the expression of the receptor on the membrane. No data are available about the influence of KIR2DL4 polymorphism on the expression. For information about these polymorphisms, the alleles must first be identified with sequence based typing. This has been done with DNA of patients and donors and new polymorphic combinations were found. Also new polymorphic positions were found. The sequence of the full length gene of the separated alleles is requested for submission of these new alleles to the database. The purpose of the study was to obtain this sequence. To avoid interference of the large introns of KIR2DL4, RNA was used as start material. The RNA was synthesized into cDNA which was then amplified. The product was cloned to separate the alleles and the sequence could be analysed.

Crucial during the optimization of the amplification were the primers, rePCR and the use of a kit for long PCR products. The earlier found unknown alleles were not yet confirmed. Indeed another new polymorphic position was found. Also alternative splicing of the KIR2DL4 gene was found, through which parts of exons or whole exons were absent, or even parts of the introns were present. This could influence the expression of the receptor. A possibility is that the receptor will not be expressed. Another possibility is expression of the receptor with missing parts, through which this will not function (properly). Thus, clues were found for altered expression of the different alleles. However, additional research is needed to prove the exact changes in expression caused by the polymorphisms in the KIR2DL4 gene.

## Gebruikte afkortingen

|                   |                                                |
|-------------------|------------------------------------------------|
| $\beta_2$ M       | beta <sub>2</sub> -microglobuline              |
| BLAST             | basic local alignment search tool              |
| bp                | baseparen                                      |
| cDNA              | copy DNA                                       |
| ddNTP             | dideoxy-nucleotide-trifosfaat                  |
| DNA               | desoxyribonucleïnezuur                         |
| dNTP              | deoxy-nucleotide-trifosfaat                    |
| DTT               | dithiothreitol                                 |
| EBV               | Epstein-Barr virus                             |
| E.coli            | Escherichia coli                               |
| EDTA              | ethyleendiamino tetra-azijnzuur                |
| GAPDH             | glyceraldehyde-3-fosfaat dehydrogenase         |
| GVHD              | graft versus host disease                      |
| GVL               | graft versus leukemie                          |
| HLA               | humane leukocyt antigeen                       |
| HSCT              | hematopoietische stamcel transplantatie        |
| HVGD              | host versus graft disease                      |
| IgSF              | immunoglobuline superfamilie                   |
| IPD               | immuno polymorphism database                   |
| ITAM              | immunoreceptor tyrosine-based activation motif |
| ITIM              | immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif  |
| KIR               | killer cell immunoglobulin-like receptor       |
| KT                | kamertemperatuur                               |
| LiCl              | lithium chloride                               |
| LRC               | leukocyte receptor complex                     |
| MgCl <sub>2</sub> | magnesium chloride                             |
| mRNA              | messenger RNA                                  |
| MQ                | MilliQ                                         |
| nc                | negatieve controle                             |
| NK                | natural killer                                 |
| PCR               | polymerase chain reaction                      |
| RNA               | ribonucleïnezuur                               |
| rpm               | rotaties per minuut                            |
| RT                | reverse transcriptase                          |
| SBT               | sequence based typing                          |
| SDS               | natrium dodecyl sulfaat                        |
| SSO               | sequence specific oligonucleotide              |
| SSP               | sequence specific primer                       |
| T <sub>m</sub>    | smelttemperatuur                               |
| UTR               | untranslated region                            |

# Inhoud

|                                                   |           |
|---------------------------------------------------|-----------|
| <b>Hoofdstuk 1: Inleiding</b>                     | <b>9</b>  |
| 1.1 Hematopoietische stamcel transplantatie       | 9         |
| 1.1.1 Immuunreactie na transplantatie             | 10        |
| 1.1.2 T cel depletie                              | 11        |
| 1.2 Humane leukocyt antigeen                      | 11        |
| 1.2.1 HLA klasse I molecuul                       | 11        |
| 1.3 Natural killer cellen                         | 12        |
| 1.3.1 Missing-self hypothese                      | 12        |
| 1.3.2 NK cel receptoren                           | 13        |
| 1.4 KIR receptoren                                | 13        |
| 1.4.1 Genen                                       | 15        |
| 1.4.2 KIR2DL4                                     | 16        |
| <b>Hoofdstuk 2: Doel van het onderzoek</b>        | <b>17</b> |
| 2.1 Eerder gedaan onderzoek                       | 17        |
| 2.2 Doel van mijn onderzoek                       | 17        |
| <b>Hoofdstuk 3: Materiaal</b>                     | <b>18</b> |
| 3.1 Patiënten                                     | 18        |
| 3.2 Cellijnen                                     | 18        |
| <b>Hoofdstuk 4: Methoden</b>                      | <b>19</b> |
| 4.1 RNA isolatie                                  | 19        |
| 4.1.1 RNA isolatie met Trizol                     | 19        |
| 4.1.2 mRNA isolatie met magnetische beads         | 19        |
| 4.2 cDNA synthese                                 | 20        |
| 4.3 PCR                                           | 20        |
| 4.3.1 KIR2DL4 specifieke PCR                      | 20        |
| 4.3.2 GAPDH PCR                                   | 20        |
| 4.3.3 PCR met KIR2DL4 specifieke SSP primers      | 20        |
| 4.3.4 KIR2DL4 specifieke Expand Long Template PCR | 20        |
| 4.4 Kloneren                                      | 21        |
| 4.4.1 Zuiveren van het PCR product                | 21        |
| 4.4.2 Kloneren met behulp van topoisomerase       | 21        |
| 4.4.3 Miniprep                                    | 21        |
| 4.4.4 Het knippen van de vector                   | 21        |
| 4.5 Sequenzen                                     | 21        |
| 4.5.1 BigDye Terminator sequenzen                 | 21        |
| 4.5.2 Analyse van de sequentie                    | 22        |
| 4.6 Tm-multi                                      | 22        |
| 4.7 KIR-SSO typering                              | 23        |
| <b>Hoofdstuk 5: Resultaten</b>                    | <b>25</b> |
| 5.1 KIR amplificatie                              | 25        |
| 5.1.1 Optimalisatie van de PCR                    | 25        |
| 5.1.2 Kloneren                                    | 25        |
| 5.1.3 Sequenzen na kloneren                       | 26        |
| 5.1.4 GAPDH PCR                                   | 26        |
| 5.1.5 RNA zuiveren                                | 26        |
| 5.1.6 Primers                                     | 27        |
| 5.1.7 Cellijnen                                   | 28        |

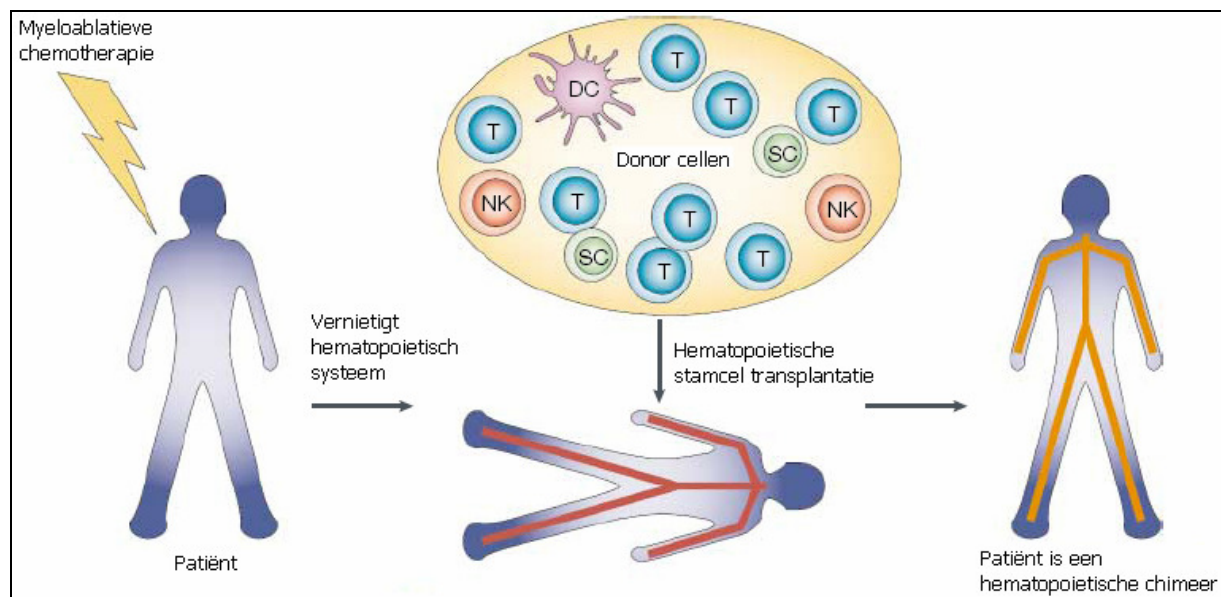
|                                               |           |
|-----------------------------------------------|-----------|
| <b>5.1.8</b> KIR-SSO typing                   | 29        |
| <b>5.1.9</b> UTR primers                      | 29        |
| <b>5.1.10</b> Expand Long Template PCR System | 29        |
| <b>5.1.11</b> Sequenzen na PCR                | 30        |
| <b>5.2</b> Samples                            | 31        |
| <b>5.2.1</b> Amplificatie                     | 31        |
| <b>5.2.2</b> Sequenzen                        | 31        |
| <b>Hoofdstuk 6: Discussie en conclusie</b>    | <b>33</b> |
| <b>Literatuur</b>                             | <b>35</b> |
| Websites                                      | 37        |
| <b>Bijlagen</b>                               | <b>38</b> |



# Hoofdstuk 1: Inleiding

## 1.1 Hematopoietische stamcel transplantatie

Hematopoietische Stamcel Transplantatie (HSCT) is een behandeling voor patiënten met onder andere leukemie en lymfoma. Bij deze behandeling wordt het hele hematopoietische systeem van de patiënt vervangen door hematopoietische cellen van een donor.<sup>1,2</sup> Voor de toediening van de hematopoietische cellen van de donor ondergaat de patiënt myeloablatieve chemotherapie. Deze behandeling heeft als doel het beenmerg van de patiënt, inclusief de meerderheid van de tumorcellen te vernietigen om 'ruimte' te maken voor de donor cellen.<sup>1</sup> De donor kan iemand uit de familie zijn, dan heet het een Familie Transplantatie (FT). Maar als er geen geschikte donor in de familie is, wordt er gezocht naar een ongerelateerde donor, ook wel Matched Unrelated Donor (MUD) genoemd.



**Figuur 1: Hematopoietische stamcel transplantatie<sup>1</sup>**

Na een voorbehandeling krijgt de patiënt het transplantaat van een donor. Dit transplantaat bestaat uit StamCellen (SC), T cellen (T), NK cellen (NK) en Dendritische Cellen (DC). Na transplantatie repopuleren de zich ontwikkelende stamcellen het hematopoietische systeem van de patiënt.

Als de donor een andere persoon is wordt er gesproken over een allogene transplantatie. Een andere vorm is autologe transplantatie waarbij de patiënt zijn of haar eigen cellen als transplantaat krijgt.<sup>A</sup> Het voornaamste immunologische obstakel bij allogene HSCT is het verschil in de Humane Leukocyt Antigeen (HLA) expressie tussen de verschillende individuen.<sup>1</sup>

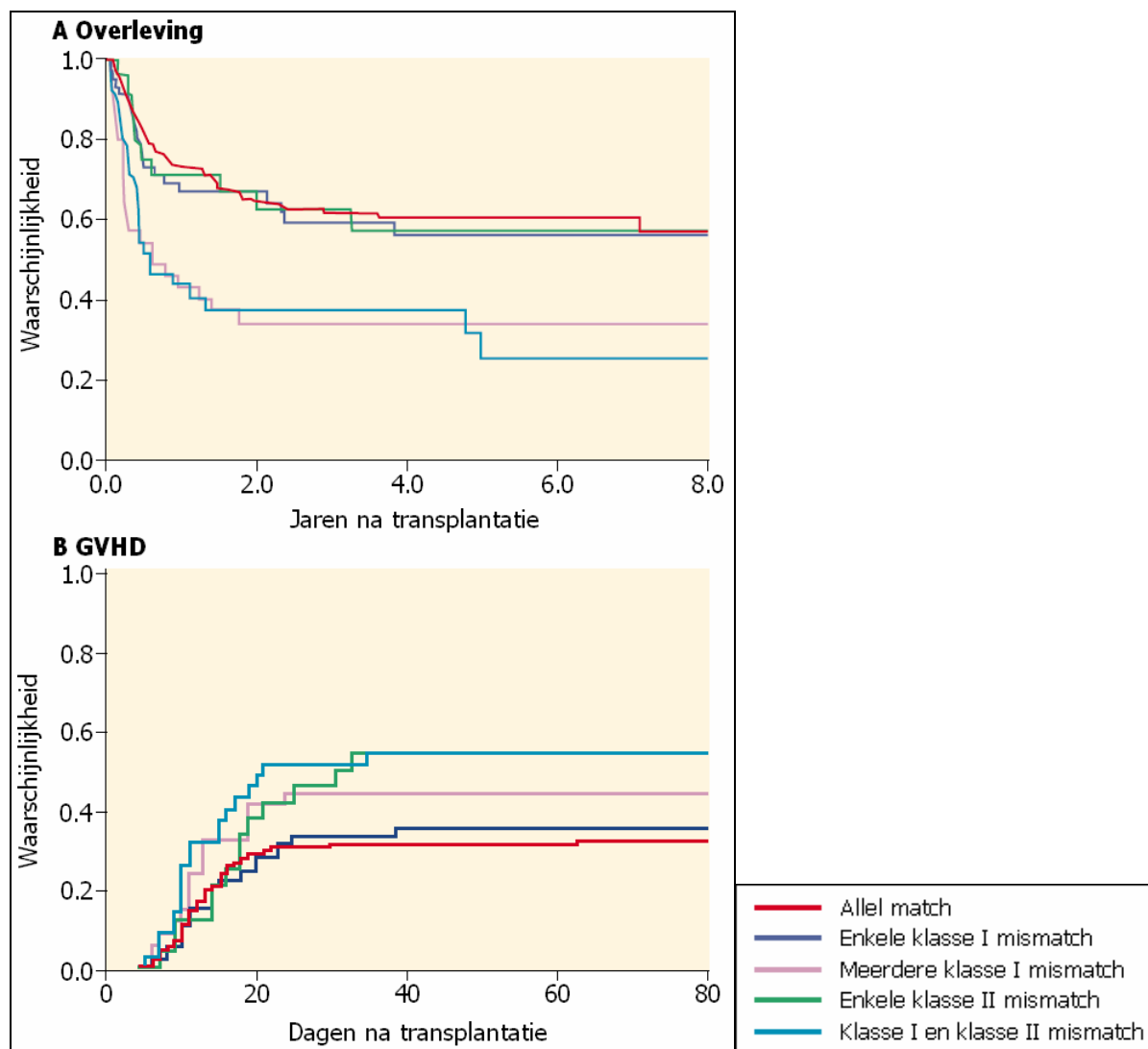
Omdat het moeilijk is om een gematchte donor in de familie te vinden zijn er wereldwijd vrijwillige donor registers opgericht voor HLA gematchte ongerelateerde transplantaten.<sup>3</sup> Dit netwerk bevat al meer dan tien miljoen HLA-getypeerde vrijwilligers.<sup>A</sup> Dit netwerk heeft echter zijn genzen, omdat het vinden van een gematchte ongerelateerde donor afhangt van de HLA diversiteit. De HLA diversiteit varieert per persoon per ras, en hierdoor worden de kansen verlaagd van 60-70% voor blanken tot onder de 10% voor etnische minderheden. Een andere grens is het verlopen van de tijd vanaf het registreren tot het identificeren van een donor, die kan leiden tot vooruitgang van de ziekte in patiënten welke dringend een transplantaat nodig hebben, zoals patiënten met acute leukemie. Ook leeftijd is een beperking, omdat de morbiditeit en mortaliteit stijgen met de leeftijd. Om deze redenen wordt er soms toch gekozen voor een alternatieve bron van de stamcellen zoals onder andere de gemismatchte familie donor.<sup>3</sup>

De balans tussen patiënt- en donorcellen is heel belangrijk, omdat er immunoreacties op kunnen treden door de interactie van vele celtypen.

De rode cijfers en letters verwijzen naar artikelen en websites welke vermeld worden op pagina 35, 36 en 37.

### 1.1.1 Immuunreactie na transplantatie

Voor de transplantatie van solide organen is afstoting van het transplantaat van de donor, door de cellen van het immuunsysteem van de patiënt, het grootste gevaar. Maar voor HSCT is de situatie anders. De myeloablatieve chemotherapie verzwakt het immuunsysteem van de patiënt, zodat afstoting een kleiner probleem is. De reactie van de donor T cellen tegen de HLA moleculen van de patiënt is een groter probleem. Hierbij vallen de alloreactieve cytotoxische CD8<sup>+</sup> T cellen van de donor de weefsels van de patiënt aan. In het bijzonder de huid, darmen en lever, wat Graft Versus Host Disease (GVHD) veroorzaakt. GVHD is van wisselende hevigheid en kan levensbedreigend zijn. Om de kans op GVHD te verkleinen wordt er naar gestreefd om een patiënt het transplantaat van een HLA gematchte donor te geven. Dit wil zeggen dat het HLA type van de donor identiek is aan het HLA type van de patiënt. Het matchen van de patiënt en donor voor de HLA klasse I en II moleculen verkleint niet alleen de kans op GVHD, maar het is noodzakelijk voor de patiënt om het specifieke immuunsysteem te herstellen.<sup>1</sup> In figuur 2 is de invloed van de HLA matching op de overleving en GVHD te zien. Hieruit blijkt dat minder mismatches beter is voor de overleving en de kans op GVHD.



**Figuur 2: De invloed van HLA matching op de overleving en op GVHD<sup>1</sup>**

HLA matching verbetert het resultaat van HSCT. De grafieken laten de gehele overleving (A) en het vóórkomen van acute GVHD (graad III en IV) (B) na transplantatie zien voor patiënten met chronische leukemie. Het resultaat van transplantatie tussen HLA-identieke broers en zussen is vergeleken met het resultaat van transplantatie van een HLA-gematchte ongerelateerde donor, en met het resultaat van transplantatie van gerelateerde en ongerelateerde donors welke van de patiënt verschillen door één of twee mismatches op de HLA-A, HLA-B en/of HLA-DR genen.

De T cellen in het transplantaat elimineren de achtergebleven cellen van de patiënt en maken zo het beenmerg verder "schoon". Deze achtergebleven cellen van de patiënt kunnen anders reactie's tegen de donor cellen veroorzaken.<sup>1</sup> Afstoting van het transplantaat is een voorbeeld hiervan. Afstoting van het transplantaat wordt Host Versus Graft Disease (HVGD) genoemd.

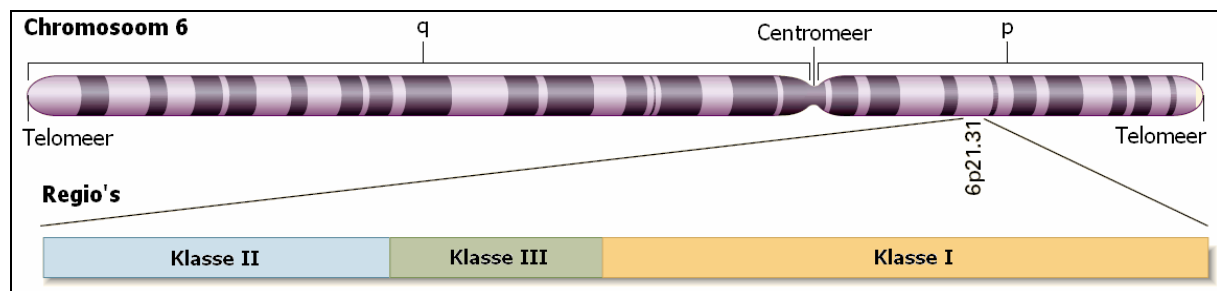
Ook elimineren de T cellen in het transplantaat de achtergebleven leukemie cellen omdat deze dezelfde HLA klasse I moleculen tot expressie brengen als de gezonde cellen van de patiënt. Dit type van een antitumor reactie wordt Graft Versus Leukemie (GVL) effect genoemd.<sup>1</sup> De leukemie cellen zorgen echter voor selectieve down-regulatie van sommige HLA moleculen waardoor ze ontsnappen aan cytotoxische T cellen en NK cellen.<sup>4,5</sup>

### 1.1.2 T cel depletie

De T cellen kunnen verwijderd worden uit het transplantaat, waardoor GVHD wordt voorkómen. Maar de T cel depletie heeft ook nadelen. En dat is de toename van de kans op afstoting en het terug komen van de ziekte, omdat de achtergebleven cellen van de patiënt niet geëlimineerd worden. De T cellen kunnen dan na de cytokine storm aan de patiënt worden gegeven met behulp van een Donor Lymfocyt Infusie (DLI). Met de cytokine storm wordt de hoge secretie van cytokine's en groeifactoren bedoeld, welke geïnduceerd wordt door de myeloablatieve chemotherapie, omdat deze de delende cellen beschadigd. De cytokine storm activeert de T cellen in het transplantaat wat leidt tot GVHD.<sup>1</sup>

## 1.2 Humane leukocyt antigeen

Het HLA complex is de humane versie van het Major Histocompatibility Complex (MHC). Het HLA complex ligt op chromosoom 6 (figuur 3) en bevat meer dan 200 genen. Zes tot tien van deze genen zijn direct betrokken bij een immuunreactie. De HLA genen vallen in twee klassen, klasse I en II. Deze klassen zijn structureel en functioneel verschillend.<sup>6</sup> De genen HLA-A, HLA-B en HLA-C zijn de klassieke klasse I genen en HLA-E, HLA-F en HLA-G zijn de niet-klassieke klasse I genen. Ook de klasse II genen kunnen ingedeeld worden in klassieke genen (HLA-DP, HLA-DQ en HLA-DR) en niet klassieke genen (HLA-DM en HLA-DO).<sup>7</sup> De HLA klasse I genen worden tot expressie gebracht door de meeste lichaamscellen. Echter, de HLA klasse II genen worden normaal alleen tot expressie gebracht door B cellen, geactiveerde T cellen, macrofagen, dendritische cellen en thymus epitheel cellen.<sup>6</sup> De HLA klasse I moleculen HLA-A, HLA-B en HLA-C presenteren peptiden aan de CD8<sup>+</sup> T cellen (cytotoxische T cellen), en de HLA klasse II moleculen HLA-DP, HLA-DQ en HLA-DR presenteren peptiden aan de CD4<sup>+</sup> T cellen (T helper cellen).<sup>1</sup>

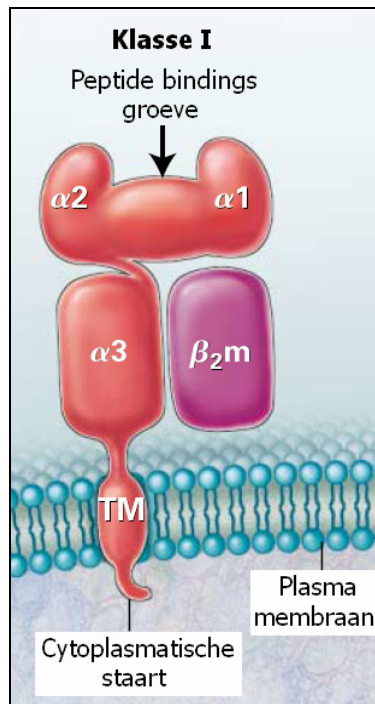


**Figuur 3: De locatie van het HLA complex<sup>6</sup>**

Het HLA complex ligt op chromosoom 6 en is in drie regio's verdeeld, klasse I, II en III. Elke regio bevat verschillende genen.

### 1.2.1 HLA klasse I molecuul

De klasse I genen coderen voor de  $\alpha$  polypeptide keten van het HLA klasse I molecuul. Deze keten bestaat uit vijf domeinen: twee peptide-binding domeinen ( $\alpha 1$  en  $\alpha 2$ ), één immunoglobulin-like domein ( $\alpha 3$ ), het transmembraan gebied en de cytoplasmatische staart. Dit is te zien in figuur 4.



**Figuur 4: De structuur van het HLA klasse I molecuul<sup>6</sup>**

Het HLA klasse I molecuul met een  $\alpha$  en een  $\beta$  keten.  $\beta_2M$  (beta<sub>2</sub>-microglobuline) is de lichte keten en de  $\alpha$  keten is de zware keten van het HLA klasse I molecuul. TM is het TransMembraan gebied.

De  $\beta$  keten van het HLA klasse I molecuul wordt gecodeerd door een gen op chromosoom 15, het Beta<sub>2</sub>-Microglobuline ( $\beta_2M$ ) gen.<sup>6</sup>

Er zijn veel verschillende allelen bekend van de HLA klasse I genen. In versie 2.18 van de IMGT/HLA database zijn er 1910 klasse I allelen bekend. Voor HLA-A zijn het er 580, voor HLA-B 921 en voor HLA-C zijn het 312 allelen.<sup>8</sup>

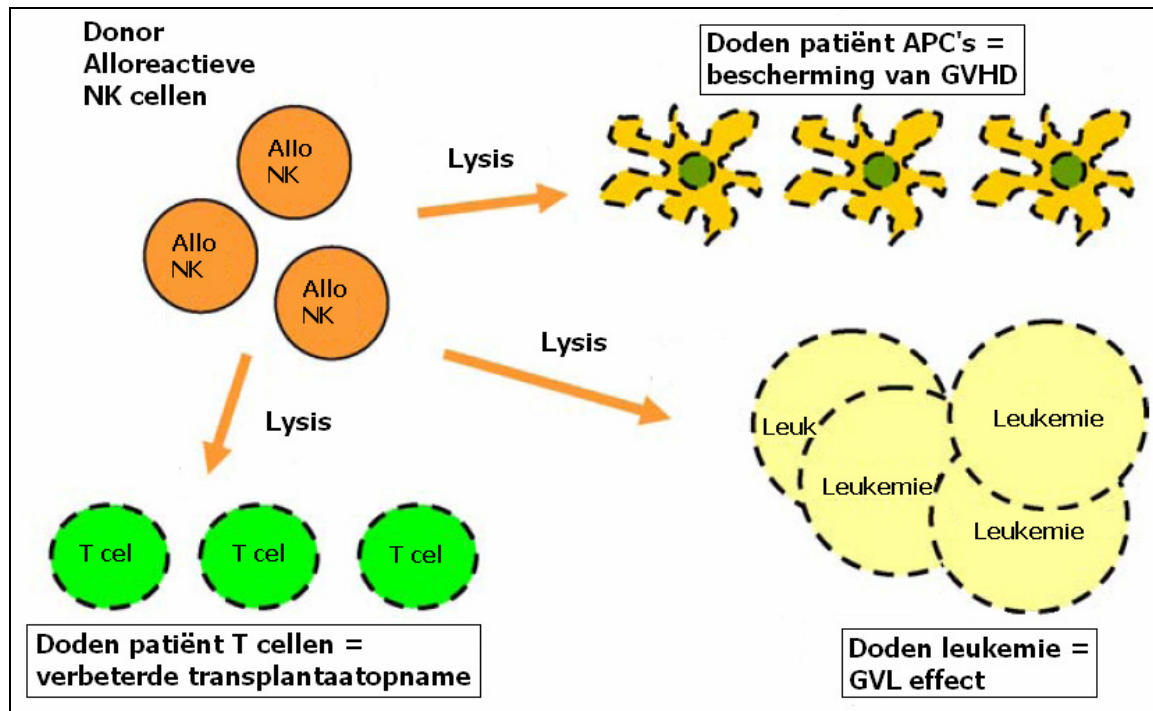
### 1.3 Natural killer cellen

Natural Killer (NK) cellen zijn uit beenmerg voortkomende lymfocyten welke dezelfde voorlopercel hebben als de T cellen. Ze brengen geen antigeenspecifieke celoppervlakte receptoren tot expressie en omvatten 10-15% van alle circulerende lymfocyten. De NK cellen zijn cruciale componenten van het cellulaire immuunsysteem vanwege hun vroege cytokinen en chemokinen productie en hun bekwaamheid om target cellen te lyseren.<sup>1,8</sup>

#### 1.3.1 Missing-self hypothese

De HLA klasse I moleculen zijn belangrijk bij het controleren van de effector functies van zowel cytotoxische T cellen als NK cellen. T cellen herkennen antigenen als peptide fragmenten die gebonden zijn aan HLA moleculen. NK cellen zijn echter, anders dan T cellen, functioneel bij de afwezigheid van HLA klasse I moleculen op target cellen. Dit wordt de missing-self hypothese genoemd. Deze missing-self hypothese stelt voor dat de T cel en NK cel immuniteit complementaire armen van de cellulaire immuunrespons representeren. T cellen herkennen en worden geactiveerd door targets die ongebruikelijke HLA/peptiden complexen tot expressie brengen. In contrast hierop doden NK cellen targets die de expressie van HLA klasse I moleculen hebben verloren. Ze worden zelfs geremd door herkenning van HLA klasse I moleculen.<sup>8</sup>

Figuur 5 vat de in vivo effecten die plaatsvinden door de infusie van donor versus patiënt alloreactieve NK cellen in muis modellen samen.<sup>9</sup>



**Figuur 5: Activiteit van alloreactieve donor NK cellen in muizen**<sup>9</sup>

Deze figuur geeft de effecten van donor alloreactieve NK cellen tegen patiënt cellen weer, in muis modellen na een milde immuun onderdrukking door verwijdering van de T cellen en andere hematopoietische cellen van de patiënt. De donor alloreactieve NK cellen voorkomen T cel gemedieerde GVHD door het doden van de dendritische cellen van de patiënt. Deze dendritische cellen starten GVHD op door alloantigenen van de patiënt te presenteren aan de donor T cellen. In muizen roeit overbrenging van humane alloreactieve NK cellen de getransplanteerde humane Acute Myeloïde Leukemie (AML) uit. Pre-transplantatie infusie van donor alloreactieve NK cellen voorkomen afstoting van HLA gemismatchte beenmergtransplantaties.

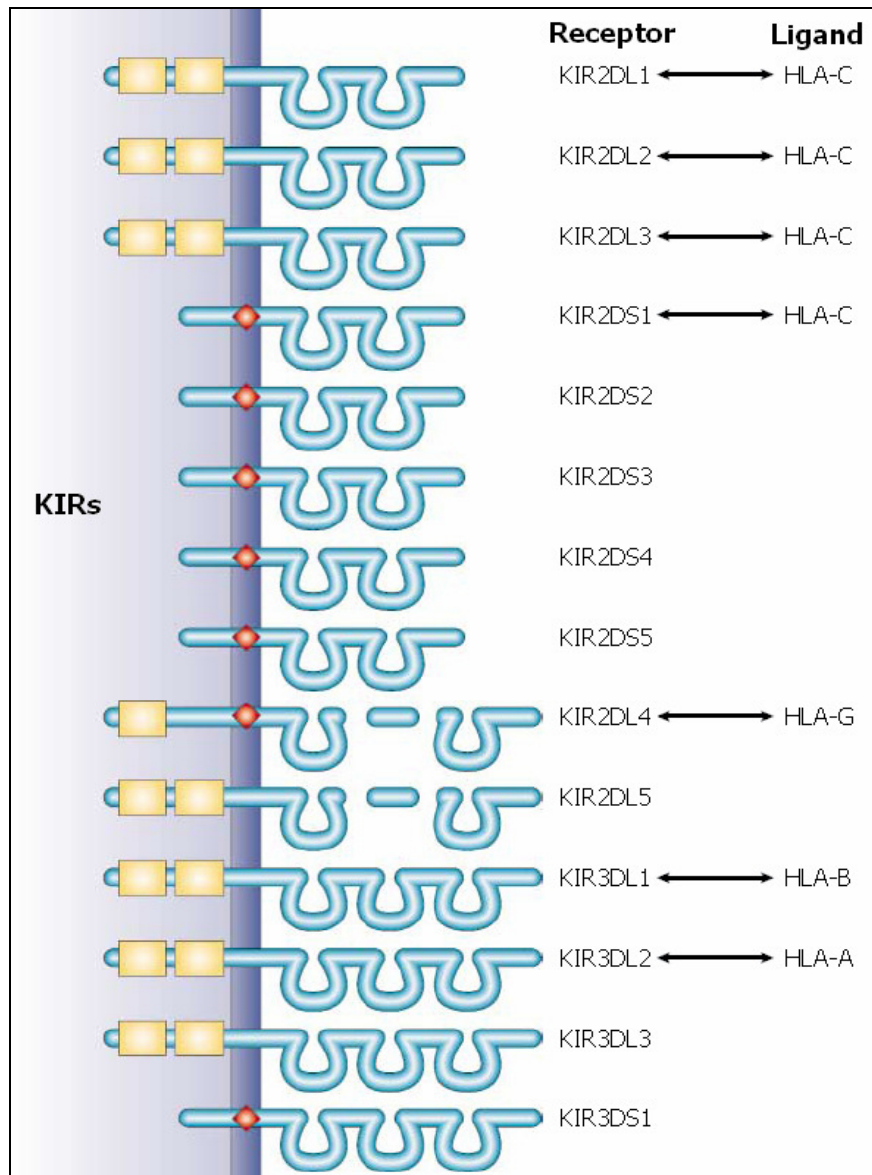
### 1.3.2 NK cel receptoren

Er zijn twee clusters NK cel receptoren, de Immunoglobuline SuperFamilie (IgSF) en de C-type lectine like receptor. De IgSF bestaan uit verschillende families waaronder de humane Killer cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR), de Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor (LILR), de Leukocyte-Associated Inhibitory Receptor (LAIR), de receptor van het IgA Fc fragment FCAR en de Natural Cytotoxicity Receptors (NCR). Deze laatste receptoren zijn specifiek voor niet HLA liganden. De genen van deze receptoren zijn geclusterd in het Leukocyt Receptor Complex (LRC), welke op chromosoom 19 ligt. Het tweede cluster, de C-type lectine like receptor, omvat de CD94/NKG2 heterodimeer in mensen. Dit gen ligt op chromosoom 12, aan de kant van de centromeer van het Natural Killer Complex (NKC).<sup>8,10</sup> In mijn onderzoek heb ik me geconcentreerd op een KIR receptor, daarom ga ik niet verder in op de andere receptoren.

### 1.4 KIR receptoren

De KIR genen liggen in de LRC regio op chromosoom 19 (19q13.4). Er zijn 14 KIR genen die tot expressie komen (figuur 6).<sup>11,12,13</sup> De liganden van de KIR receptoren zijn de HLA klasse I moleculen. Welk HLA klasse I molecuul de ligand is, is nog niet voor alle KIR receptoren bekend. Voor KIR3DL2 is het HLA-A, voor KIR3DL1 HLA-B, voor KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 en KIR2DS1 HLA-C en voor KIR2DL4 is het HLA-G.<sup>1,8,12</sup>



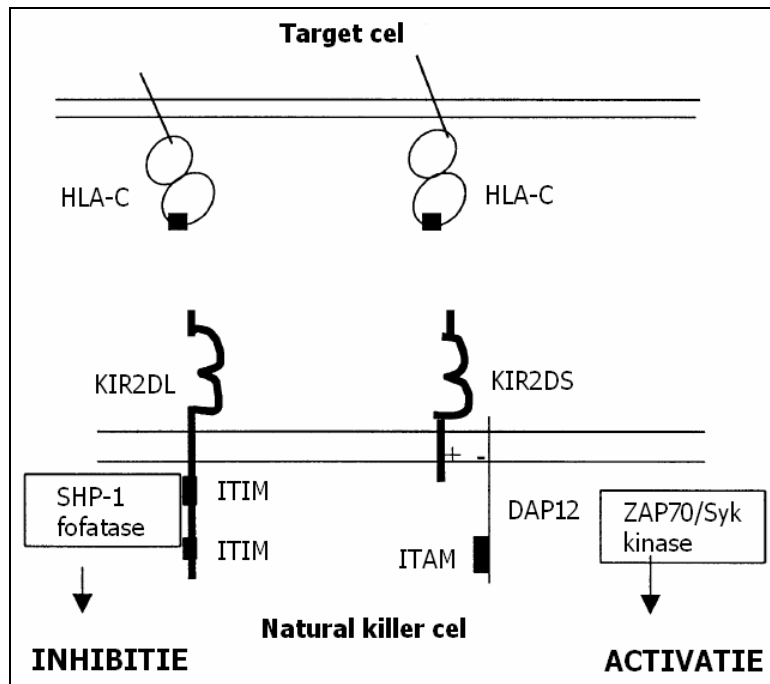


**Figuur 6: KIR receptoren<sup>1</sup>**

De structuren van de 14 KIR genen. De gele blokjes zijn de ITIM's en de rode ruitjes zijn de positief geladen aminozuren. Voor de KIR receptoren waarvan de HLA klasse I ligand bekend is staat deze er achter aangegeven.

Een KIR receptor is een transmembraan receptor en heeft dus een extracellulair en een intracellulair gedeelte. Het extracellulaire gedeelte bestaat uit twee of drie domeinen. Het intracellulaire gedeelte, ofwel de cytoplasmatische staart is lang of kort. De naamgeving van de KIR's is gebaseerd op deze structuur. Het aantal domeinen wordt aangegeven met 2D of 3D, en de lengte van de cytoplasmatische staart met een L (long) of een S (short).<sup>1,8,12,13,14</sup>

De KIR's met een lange staart hebben twee Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs (ITIM) en hebben hierdoor een inhiberende functie. En de KIR's met een korte staart hebben een positief geladen aminozuur in het transmembraan gebied waarmee ze heterodimeren kunnen vormen met DAP12 wat een Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM) bevat en hierdoor hebben ze een activerende functie (figuur 7).<sup>8,12,13</sup>

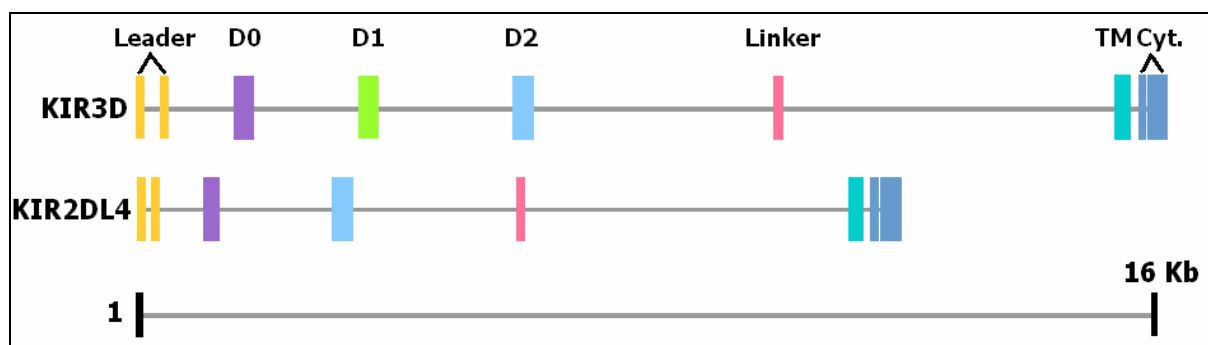


**Figuur 7: Inhiberende en activerende signalen<sup>8</sup>**

Binding van de KIR receptor met een lange staart met zijn HLA klasse I ligand leidt tot activatie van het tyrosine fosfatase (SHP-1). Dit leidt tot inhibitie van de NK cel cytotoxiciteit en cytokine uitscheiding. Het positief geladen aminozuur van een KIR receptor met een korte staart vormt een heterodimeer met het negatief geladen aminozuur in het transmembraan gebied van DAP12 (een transmembraan adaptor eiwit). Binding van de die KIR receptor met zijn HLA klasse I ligand leidt tot activatie van ZAP70 en Syk tyrosine kinasen door het ITAM van DAP12. Dit leidt tot activatie van de NK cel lysis. Voor meer details zie het artikel van Middleton et al (2002).<sup>8</sup>

#### 1.4.1 Genen

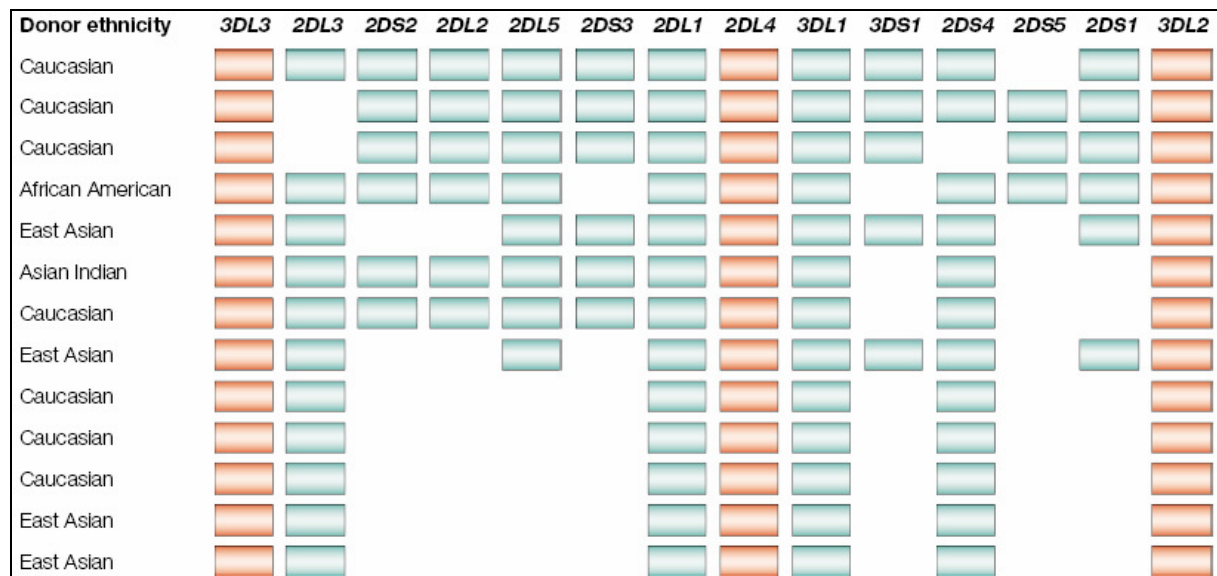
De genen die coderen voor de KIR receptoren hebben negen exonen. De eerste twee exonen coderen voor de signaal sequentie, exon 3,4 en 5 coderen voor de drie extracellulaire domeinen (respectievelijk D0, D1 en D2), de linker en het transmembraan gebied worden gecodeerd door respectievelijk exon 6 en 7 en de laatste twee exonen coderen voor de cytoplasmatische staart (figuur 8). De receptoren met twee extracellulaire domeinen hebben de domeinen D0 en D2 of de domeinen D1 en D2. De genen van deze receptoren missen dus of exon 4 (D1) of exon 3 (D0).<sup>8,12,13</sup>



**Figuur 8: Exon-intron structuur van de KIR genen<sup>12</sup>**

Hier is te zien welk exon codeert voor welk gedeelte van de KIR receptor. Exon 1 en 2 zijn geel. Exon 3, 4 en 5 zijn respectievelijk paars, groen en lichtblauw. Exon 6 is roze en exon 7 is turquoise. En exon 8 en 9 zijn donkerblauw. Dit is aangegeven voor KIR's met drie domeinen, omdat deze alle exonen bezitten. Ook KIR2DL4 is weergegeven en daarbij is te zien dat deze KIR exon 4 (groen) mist, waardoor deze geen domein D1 bevat.

Niet alle KIR genen zijn bij iedereen aanwezig. Er zijn drie genen die wel bij iedereen voorkomen en dat zijn KIR3DL3, KIR2DL4 en KIR3DL2. Dit zijn de framework genen. De combinatie van KIR genen op één chromosoom wordt het KIR haplotype genoemd.<sup>1</sup> Er zijn een heleboel verschillende haplotypes, met het aantal genen variërend van zeven tot veertien KIR genen. Gebaseerd op verschillende populatie studies naar het KIR genotype komen twee hoofdgroepen haplotypes naar boven, groep A en groep B. Groep A haplotypes bevatten de inhiberende genen KIR3DL3, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR3DL2 en het activerende gen KIR2DS4. Groep B haplotypes zijn meer variabel en hebben meer dan één activerend KIR gen.<sup>11,14</sup> Het KIR genotype (figuur 9) is de som van de twee KIR haplotypes.<sup>1</sup>



**Figuur 9: Representatieve humane KIR genotypen<sup>1</sup>**

Deze figuur illustreert hoe de gen inhoud van humane KIR genotypen varieert, gebruik makend van data verkregen van gezonde bloed donoren van verschillende etnische afkomst. De genotypen zijn geordend volgens het aantal KIR genen dat ze bevatten, met als eerste de donor met de meeste genen.

#### 1.4.2 KIR2DL4

KIR2DL4 is qua opbouw een uitzondering op de andere 13 KIR's. KIR2DL4 heeft maar één ITIM en ook een positief geladen aminozuur in het transmembraan gebied. Dus KIR2DL4 heeft zowel inhiberende als activerende kenmerken.<sup>8,15</sup> Ook is het mRNA van KIR2DL4 aanwezig in iedere NK cel, omdat KIR2DL4 een framework gen is. En KIR2DL4 heeft de ongebruikelijke D0-D2 domein configuratie doordat exon 4 niet aanwezig is (figuur 8). Verder bindt KIR2DL4 aan cellen die HLA-G tot expressie brengen. Of KIR2DL4 een inhiberende of activerende functie heeft is niet bekend. Uit een studie met gemuteerde KIR2DL4 receptoren blijkt dat KIR2DL4 zonder ITIM de NK cel cytotoxiciteit activeert. En ook dat KIR2DL4 zonder positief geladen aminozuur inhiberende signalen geeft.<sup>15</sup>

Het gen van KIR2DL4 heeft net als de andere KIR genen ook polymorfismen. Op basis van deze polymorfismen kan er in de Immuno Polymorphism Database (IPD) voor KIR onderscheid gemaakt worden in 23 verschillende allelen (versie 1.4.0).<sup>C</sup>



## Hoofdstuk 2: Doel van het onderzoek

Over de invloed van de verschillende polymorfismen in de KIR genen is nog niet veel bekend. Voor KIR3DL1 laten Carr et al (2005) zien dat het \*002 allel de HLA-Bw4 ligand sterker remt dan het \*007 allel.<sup>16</sup> Van KIR2DL4 is de invloed van de polymorfismen nog niet bekend. Om hier meer over te weten te komen moeten eerst de allelen geïdentificeerd worden. De methoden Sequence Specific Primer (SSP) en Sequence Specific Oligonucleotide (SSO) kunnen gebruikt worden om de aanwezigheid van het KIR2DL4 gen aan te tonen, maar om een allel bepaling te kunnen doen moet het gen gesequenced worden. Dit kan met Sequence Based Typing (SBT).

### **2.1 Eerder gedaan onderzoek**

Eerder zijn alle exonen van het KIR2DL4 gen van 47 patiënten en donoren op DNA niveau geamplificeerd en gesequenced. Er zijn hierbij nieuwe polymorfe posities gevonden. En er waren ook samples die geen nieuwe polymorfe posities bevatten maar toch niet geïdentificeerd konden worden met een combinatie van twee van de 23 (versie 1.4.0) bekende KIR2DL4 allelen.<sup>C</sup> Er zijn dus één of meerdere nog onbekende allelen gevonden. Maar om deze nieuwe allelen te kunnen publiceren moet de sequentie van de allelen naar de IPD/KIR database gestuurd worden. De database vereist echter minimaal de hele coderende sequentie van de gescheiden allelen. De hele sequentie van deze onbekende allelen is nog niet bekend. Dit komt omdat de PCR gedaan is met DNA. En het probleem hiermee is dat het gen van KIR2DL4 op DNA niveau door de intronen te groot is om in één keer te amplificeren. Ook werd er met meerdere PCR's en sequencereacties geen overlap van de sequenties verkregen. En de allelen zijn niet gescheiden. De twee allelen dienen gescheiden te worden, omdat de twee allelen door hun verschillen een heterozygote sequentie veroorzaken. Op basis van deze heterozygote sequentie kan er geen onderscheid gemaakt worden tussen de twee allelen.

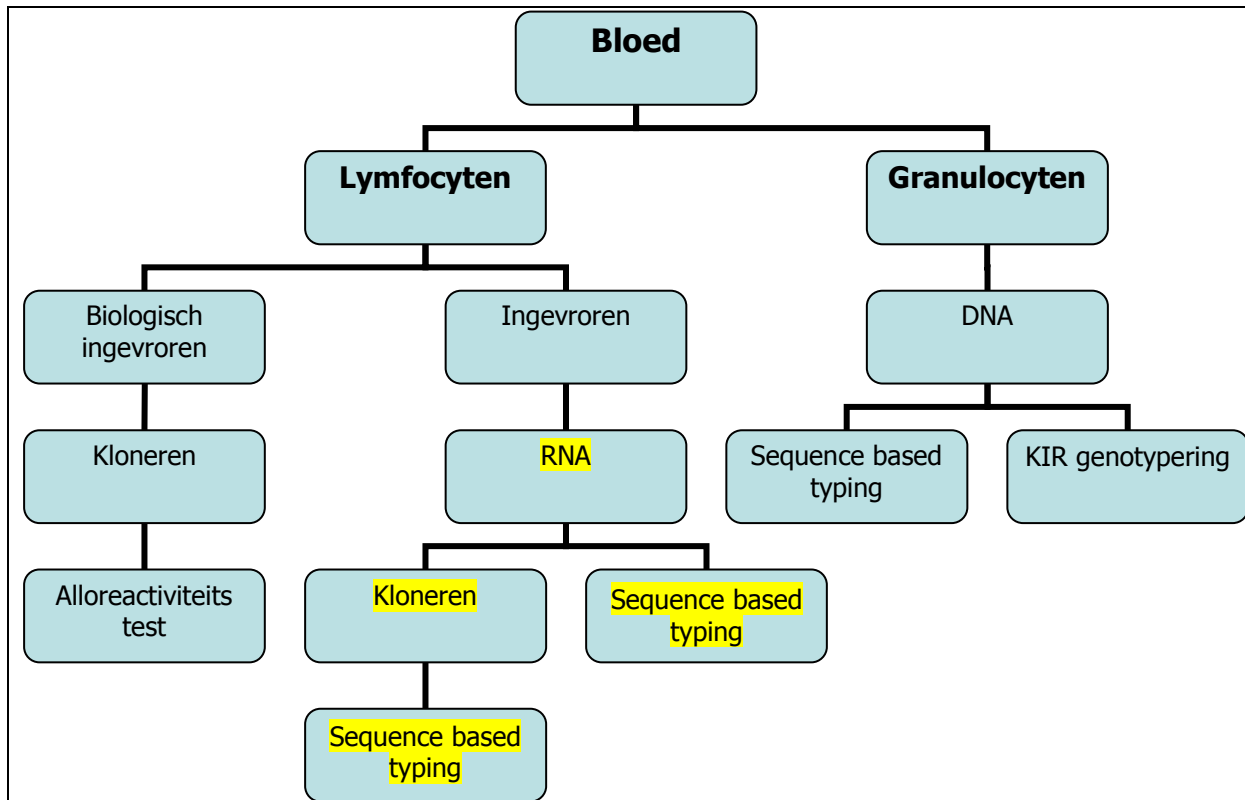
### **2.2 Doel van mijn onderzoek**

Mijn doel is om deze potentieel nieuwe allelen van KIR2DL4 te karakteriseren, om in latere studies de functie van de KIR2DL4 polymorfismen te bepalen. Omdat dit op DNA niveau niet lukt vanwege de lange PCR, ga ik RNA gebruiken als uitgangsmateriaal. Hiervoor ga ik het RNA omzetten in cDNA, waarmee ik dan een PCR ga doen. Door daarna het PCR product te kloneren worden de allelen gescheiden. Vervolgens kan ik met de sequentie van de inserts de nieuwe allelen karakteriseren. Al deze stappen moeten geoptimaliseerd worden. Dit is een uitdaging, omdat er maar een kleine hoeveelheid mRNA van KIR2DL4 aanwezig is in de cel.

## Hoofdstuk 3: Materiaal

### 3.1 Patiënten

Van 47 HSCT patiënten en hun ongerelateerde donoren is bloed afgenomen. Met een Ficoll scheiding werd er een granulocyten en een lymfocyten fractie geïsoleerd (figuur 10). Uit de granulocyten fractie is DNA geïsoleerd met behulp van het uitzoutprotocol, dat beschreven is door Miller et al (1988).<sup>17</sup> Dit DNA is gebruikt om de KIR genotypering van de patiënt of donor vast te stellen.



**Figuur 10: Overzicht samples**

In deze figuur is te zien dat het bloed gesplitst is in een lymfocyten en een granulocyten fractie. En verder is te zien wat er met deze fracties gedaan is. Met geel is de RNA fractie die gebruikt wordt voor dit onderzoek en de route die gevolgd wordt aangegeven.

De lymfocyten (onder andere de NK cellen) in de lymfocytenfractie werden geteld. Bij de aanwezigheid van meer dan  $20 \times 10^6$  cellen werd er een deel van de lymfocytenfractie biologisch ingevroren. Deze fractie kan na ontdooien weer in kweek gebracht worden, voor een alloreactiviteitstest van de NK cellen. De overige cellen uit de lymfocytenfractie werden ingevroren en bewaard bij  $-80^\circ\text{C}$ . Hieruit is later RNA geïsoleerd. Deze RNA samples werden gebruikt om de nieuwe allelen te identificeren.

### 3.2 Cellijnen

Er zijn drie cellijnen gebruikt om de KIR2DL4 specifieke PCR op te zetten en te optimaliseren. Dit zijn de Epstein-Barr virus (EBV) getransformeerde T cellijn WT47, de EBV getransformeerde B cellijn JBush en de NK cellijn YT. Uit celpellets van deze cellijnen is mRNA geïsoleerd met behulp van magnetische beads. Na een cDNA synthese zijn de samples gebruikt voor de KIR2DL4 specifieke PCR.

## Hoofdstuk 4: Methoden

### 4.1 RNA isolatie

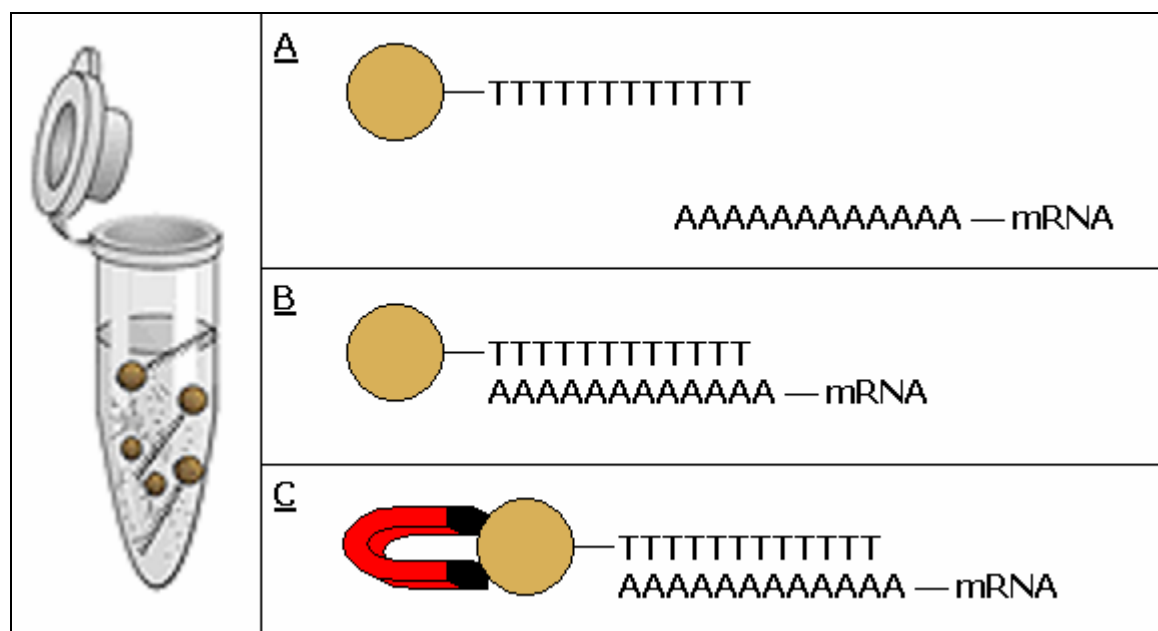
RNA isolatie uit de lymfocytenfracties van het bloed van patiënten en donoren is gedaan met behulp van de Trizol methode. Voor de isolatie van het mRNA uit de celpellets van de cellijnen WT47, JBush en YT is gebruik gemaakt van magnetische beads.

#### 4.1.1 RNA isolatie met Trizol

Het protocol dat gevolgd werd bij de RNA isolatie uit de lymfocytenfracties is te vinden in bijlage **1.1**. Toevoeging van Proteïnase K zorgt voor inactivatie van de RNase's bij 55°C. Ook gaan bij 55°C de cellen kapot en lossen de celcomponenten op. Door toevoeging van chloroform werden na centrifugatie 3 fasen verkregen. Een waterfase met het RNA, een interfase en een organische fase, welke beiden eiwitten en DNA bevatten. Vervolgens is er isopropanol toegevoegd aan de waterfase om het RNA te precipiteren. Na wassen met ethanol en drogen van de RNA pellet werd deze opgelost in MilliQ (MQ). Uiteindelijk is de RNA concentratie gemeten.

#### 4.1.2 mRNA isolatie met magnetische beads

Om het mRNA te isoleren uit de celpellets werd gebruik gemaakt van magnetische beads met een Oligo dT extensie (Dynabeads® Oligo(dT)<sub>25</sub> van Dynal). Zie figuur **11** voor het principe en zie bijlage **1.8** voor het protocol.



**Figuur 11:** Het principe van de mRNA isolatie met Dynabeads® Oligo(dT)<sub>25</sub> van Dynal

Het sample met daarin het mRNA wordt aan de beads toegevoegd (A). Bij B is te zien dat het mRNA met zijn poly A staart bindt aan de Oligo dT staart van de bead. Wanneer het epje daarna op een magneet geplaatst wordt, worden de beads aangetrokken door de magneet (C). Dan wordt het supernatant verwijderd en het mRNA kan worden geëluëerd.

Voor de isolatie is er aan de celpellet Lysis/Binding Buffer en proteïnase K toegevoegd. Plaatsing bij 56°C zorgt ervoor dat de Lysis/Binding Buffer de cellen lyseert. Het vrijkomen van DNA tijdens de lysis resulteerde in een viskeuze oplossing wat een complete lysis bevestigde. En de proteïnase K zorgt voor afbraak van de eiwitten waardoor het eiwit/DNA/RNA complex verbroken wordt. Dit gelyseerde product is daarna toegevoegd aan de Dynabeads en het mRNA werd geïsoleerd (figuur **11**). Na verwijdering van het supernatant werd een aantal keer gewassen met Washing Buffer A en B. Vervolgens is het mRNA geëluëerd door toevoeging van water en plaatsing bij 80°C. Voor de meting van de concentratie van het mRNA is gebruik gemaakt van de NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 van NanoDrop Technologies. Het geïsoleerde mRNA werd gebruikt voor een cDNA synthese.

Deze methode van mRNA isolatie is ook gebruikt voor de zuivering van mRNA uit de totaal RNA samples. Zie bijlage **1.7** voor het protocol dat voor deze zuivering gebruikt is.

## **4.2 cDNA synthese**

Het geïsoleerde mRNA werd omgezet in cDNA met behulp van een kit van Invitrogen met SuperScript™ III RT (het protocol staat in bijlage **1.2**). Eerst zijn er dNTP's en primer toegevoegd aan het RNA en de plaatsing bij 65°C zorgt voor denaturatie. Vervolgens werd de cDNA synthese mix, met daarin onder andere buffer, MgCl<sub>2</sub> en SuperScript™ III RT toegevoegd. Omzetting van RNA naar cDNA, oftewel de cDNA synthese vindt plaats gedurende de stap bij 50°C. Deze omzetting wordt beëindigd bij 85°C. De daarna toegevoegde RNase H brak het overgebleven RNA af bij 37°C. Het uiteindelijk verkregen cDNA werd bewaard bij -20°C.

## **4.3 PCR**

Om uiteindelijk de nieuwe allelen te kunnen karakteriseren werd eerst het cDNA van KIR2DL4 geamplificeerd. Het gebruikte cDNA voor deze PCR is gecontroleerd met behulp van een GAPDH PCR. En de al geoptimaliseerde PCR met SSP primers werd gebruikt om te controleren of er cDNA van KIR2DL4 aanwezig is.

### **4.3.1 KIR2DL4 specifieke PCR**

Voor deze PCR op cDNA werden specifieke KIR2DL4 primers gebruikt in combinatie met primers gelegen in de UnTranslated Region (UTR). De eerste PCR reacties zijn uitgevoerd op de GeneAmp® PCR system 9600 van Applied Biosystems. Later is hiervoor de GeneAmp® PCR system 9700 van Applied Biosystems gebruikt. De gebruikte primers, samenstelling van de mix en het PCR programma van de eerste PCR zijn te vinden in bijlage **2.1**. De verwachte grootte van het PCR product is afhankelijk van de gebruikte primers en deze groottes zijn te vinden in bijlage **3.1**. Optimaliseren van de PCR werd gedaan door te variëren in de mix en in het PCR programma. In de mix is gevarieerd door het toepassen van een MgCl<sub>2</sub> concentratie reeks en het toevoegen van verschillende hoeveelheden cDNA. En in het PCR programma zijn verschillende aantallen cycli en verschillende annealingstemperaturen uitgetoetst.

### **4.3.2 GAPDH PCR**

Deze amplificatie van GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase (GAPDH) is uitgevoerd om te controleren of de cDNA synthese goed gegaan is. Hiervoor werd GAPDH gebruikt, omdat dit een huishoudgen is en dus altijd aanwezig. Een GAPDH PCR controleert de aanwezigheid van cDNA en DNA in een sample. De gebruikte primers, de samenstelling van de mix en het PCR programma welke voor deze PCR gebruikt werden zijn te vinden in bijlage **2.3**. De verwachte grootte van het cDNA PCR product is 368 bp (bijlage **3.2**) omdat de primers binden in exon 8 en 9 van het GAPDH gen<sup>18</sup> en er geen intronen aanwezig zijn in het cDNA. De verwachte grootte van een DNA PCR product is 472 bp (bijlage **3.2**).

### **4.3.3 PCR met KIR2DL4 specifieke SSP primers**

Een andere controle, namelijk om te kijken of er cDNA van KIR2DL4 aanwezig is in de samples werd uitgevoerd met behulp van een PCR met SSP primers. Dit zijn primers die specifiek zijn voor KIR2DL4 en binden in exon 5. De verwachte grootte van het PCR product is 247 of 248 bp. Dit is afhankelijk van de bindende forward primer. Voor de gebruikte primers, de samenstelling van de mix en het gebruikte PCR programma zie bijlage **2.4**.

### **4.3.4 KIR2DL4 specifieke Expand Long Template PCR**

Er werd ook een KIR2DL4 specifieke PCR met de Expand Long Template PCR System kit van Roche gedaan toen de gewone PCR niet op gang kwam. Deze PCR is geoptimaliseerd door verhoging van de annealingstemperatuur en een MgCl<sub>2</sub> concentratie reeks. De samenstelling van de mix en het programma van de geoptimaliseerde PCR zijn te vinden in bijlage **2.2**.

## **4.4 Kloneren**

Om de allelen te scheiden werden de geamplificeerde samples gekloneerd met behulp van topoïsomerase. Met een miniprep is de vector daarna geïsoleerd. Om de grootte van het insert te bepalen op een gel werd de vector geknipt met een restrictie-enzym.

### **4.4.1 Zuiveren van het PCR product**

Om het storen van kleinere PCR producten bij het kloneren te voorkomen is het PCR product uit de gel gesneden. De incubatie bij 50°C zorgt voor oplossing van de agarose uit de gel. Ter verhoging van de opbrengst van het DNA werd er isopropanol toegevoegd. Door het sample op een kolom te brengen en te centrifugeren bindt het DNA aan de kolom. Daarna is er Buffer QG toegevoegd en gecentrifugeerd om de achtergebleven sporen agarose te verwijderen. Na wassen van de kolom met Buffer PE werd de doorloop weggegooid. En er is nog een keer gecentrifugeerd om het ethanol uit Buffer PE helemaal te verwijderen. Vervolgens werd er voor de eluatie van het DNA uit de kolom water toegevoegd. Het hiervoor gebruikte protocol is te vinden in bijlage **1.3**.

### **4.4.2 Kloneren met behulp van topoïsomerase**

Bij het kloneren met topoïsomerase werd het PCR product in de vector geligeerd in 5 minuten. De hiervoor gebruikte kit is de TOPO TA Cloning® Kit van Invitrogen. Het PCR product heeft een overhangende A doordat er geamplificeerd is met Taq, en de TOPO vector (bijlage **4**) heeft een overhangende T. Na de ligatie werden chemo competente *E.coli* bacteriën getransformeerd met de vector. De bacteriën zijn uitgeplaat op een plaat met Xgal. Als na een nacht groeien de platen in de koelkast werden geplaatst, kleurden sommige kolonies blauw. Dit zijn de kolonies die een vector bevatten waar geen insert in zit. De wit gebleven kolonies naast de blauwe zijn aangeprikt, omdat er daar zeker voldoende Xgal aanwezig is en de kolonies dus echt wit zijn. De aangeprikte kolonies groeiden verder in een buis met LB medium en Ampiciline. Een aantal stappen van het protocol (bijlage **1.4**) werden uitgevoerd op het laboratorium Veilige Microbiologische Techniek (VMT).

### **4.4.3 Miniprep**

Ook het miniprep protocol, waarbij de vector geïsoleerd wordt, werd voor het grootste gedeelte uitgevoerd op het VMT lab. De bacteriesuspensies van de aangeprikte kolonies werden gecentrifugeerd en de supernatanten verwijderd. Vervolgens zijn de cellen geresuspendeerd in resuspendiebuffer. De lysisbuffer zorgt voor lysis van de bacteriën. De daarna toegevoegde neutralisatiebuffer zorgt voor neutralisatie van de lysisbuffer. Na centrifugatie is het supernatant overgebracht naar een kolom. De kolom werd gewassen met wasbuffer en gedroogd. Na het drogen van de kolom is deze overgebracht naar een nieuw epje. De vector werd geëluëerd door toevoeging van water en centrifugatie. Het gevolgde protocol is te vinden in bijlage **1.5**.

### **4.4.4 Het knippen van de vector**

Om te kijken hoe groot het insert is wat in de vectoren van de aangeprikte kolonies zit werden de vectoren opengeknippt. Hiervoor werd het restrictie-enzym EcoRI gebruikt. En vervolgens is dit op gel gebracht (bijlage **1.6**). Van de klonen met het insert van interesse is de ongeknipte vector gebruikt voor het sequencen.

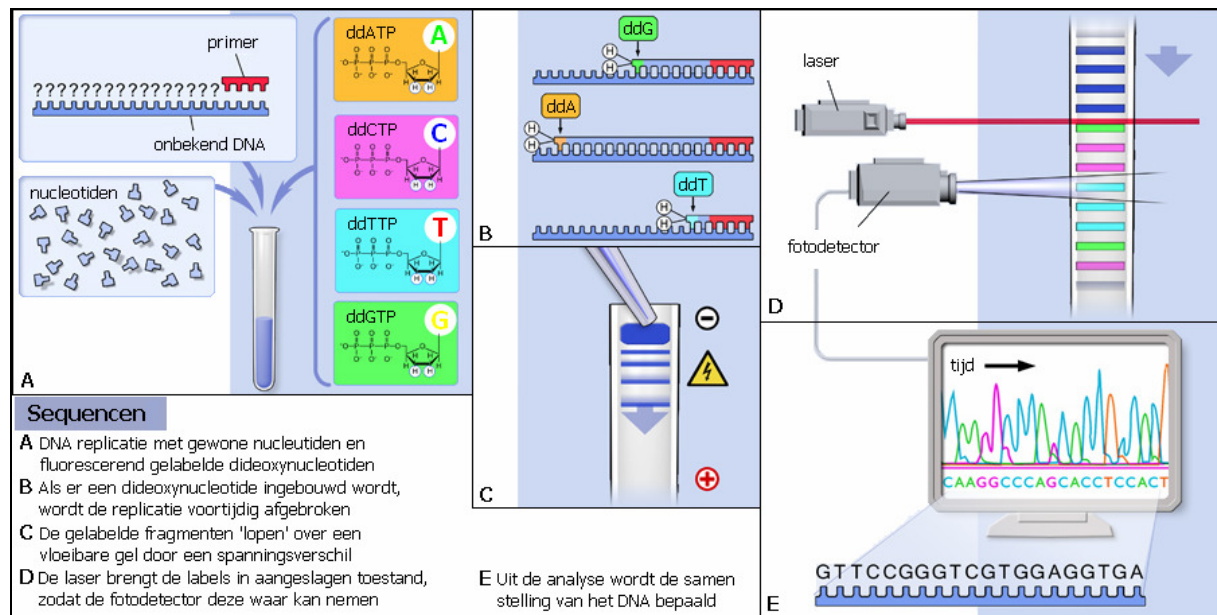
## **4.5 Sequenzen**

Om de sequentie van het insert te weten te komen werd er een sequence reactie ingezet (het protocol staat in bijlage **1.9**). Hiervoor werd de BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit van Applied Biosystems gebruikt. De klonen werden gesequenced met M13 primers (bijlage **3.3**). Deze primers binden in de vector en lezen dan af richting het insert (bijlage **4**). De sequence reactie werd uitgevoerd op de GeneAmp® PCR system 9700 van Applied Biosystems. Voor de mix en het programma zie bijlage **2.5.1**. Ook werd het sequencen gebruikt om te bepalen of het PCR product na een PCR met de Expand Long Template kit KIR2DL4 was. Hiervoor is hetzelfde protocol gebruikt op de samenstelling van de mix en de primers na. Deze gegevens zijn terug te vinden in bijlage **2.5.2**.

### **4.5.1 BigDye Terminator sequenzen**

In de BigDye Terminator (BDT) zitten AmpliTaq DNA Polymerase, dNTP's en dideoxynucleotiden (ddNTP's). Deze ddNTP's zijn fluorescerend gelabeld. Elke base heeft een andere kleur label. Een A is

groen, een T is rood, een C is blauw en een G is geel. Zie voor het principe ook figuur 12. Voor de zuivering van de sequence producten werd Sephadex gebruikt.



**Figuur 12: Het principe van sequenzen**

Bij **A** worden nucleotiden, dideoxynucleotiden en een primer toegevoegd aan het onbekende DNA. Tijdens de sequence reactie vindt er DNA replicatie plaats. (**B**) Dit gebeurt met de 'gewone' nucleotiden. Zodra er in plaats van een dNTP een ddNTP wordt ingebouwd stopt de reactie. Zo ontstaan er fragmenten met verschillende lengten. Bij **C** is te zien dat de fragmenten door een vloeibare gel 'lopen' door een spanningsverschil. (**D**) Ze komen dan langs een laser die de fluorescerende labels aan de ddNTP's in aangeslagen toestand brengt, zodat een fotodetector deze waar kan nemen. (**E**) Dan wordt de sequentie van het product opgebouwd uit de volgorde van de basen die langs de fotodetector komen.

#### 4.5.2 Analyse van de sequentie

De gevonden sequentie werd geanalyseerd. Hiervoor werd de sequentie ingevoerd bij Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).<sup>D</sup> De polymorfe posities werden met de hand opgezocht.

#### 4.6 Tm-multi

Tm-multi is een Microsoft Excel sheet om de smeltemperatures ( $T_m$ ) van oligo's te berekenen (figuur 13). De sheet is gemaakt door Marcel G.J. Tilanus. Er wordt in deze sheet gebruik gemaakt van verschillende methoden om de smeltemperatuur te berekenen en te vergelijken.<sup>19,20,21,22</sup> Hierbij wordt rekening gehouden met de verschillende factoren die invloed kunnen hebben op de  $T_m$  van oligo's. Voorbeelden hiervan zijn de lengte van de oligo en het GC gehalte. Om een smeltemperatuur berekening uit te voeren met deze Excel sheet hoeft alleen het aantal basen (G,C,A en T) van de primer ingevoerd te worden. Daarna zijn de verschillend berekende smeltemperatures af te lezen. Hierbij moet wel gekeken worden naar de lengte van de primer, omdat iedere methode een eigen lengte eis heeft.

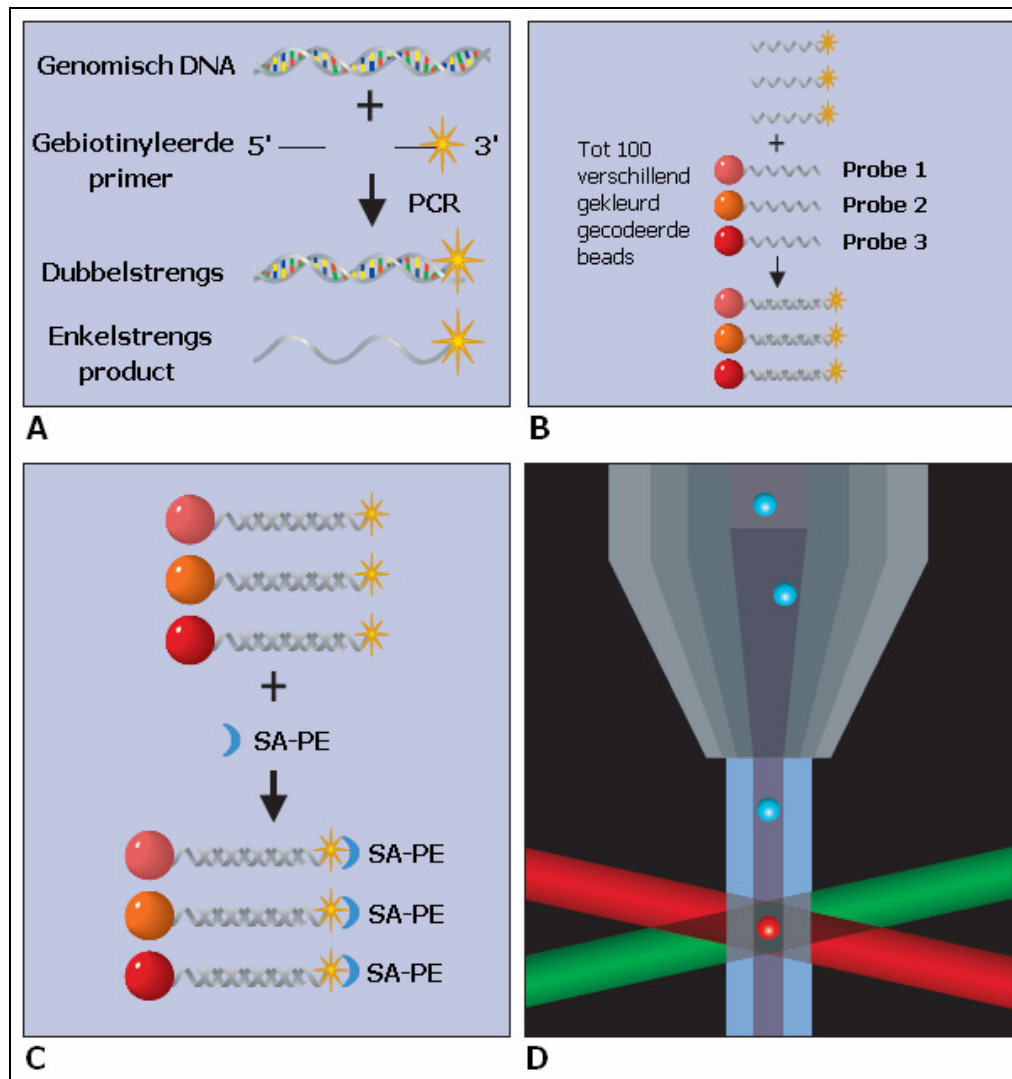
| <b>Tm berekeningen;</b> |      |              |    |    |                                 |
|-------------------------|------|--------------|----|----|---------------------------------|
|                         | Gn   | Cn           | An | Tn | L = aantal nucleotiden          |
| oligo KIR2DL4-EX1P28-F  | 2    | 9            | 4  | 3  | Fa = L afhankelijke correctie   |
| L= aantal nucleotiden   | 18   |              |    |    | Fo = L onafhankelijke correctie |
| Fa=                     | 7,17 |              |    |    | Gn = aantal G                   |
| Fo=                     | 3,98 |              |    |    | Cn = aantal C                   |
|                         |      |              |    |    | An = aantal A                   |
|                         |      |              |    |    | Tn = aantal T                   |
| Tm (GC)=                | 58,0 | oligo's < 20 |    |    | corr 1 = Tm-560/L               |
| Tm corr 1=              | 26,9 | oligo's > 25 |    |    | corr 2 = Tm-600/L               |
| Tm corr2=               | 24,7 | oligo's > 25 |    |    | f1 = corr1 met Fa               |
| Tm f1=                  | 53,7 | oligo's > 15 |    |    | f2 = corr2 met Fa               |
| Tm f2=                  | 53,3 | oligo's > 15 |    |    | F1 = corr1 met Fo               |
| Tm F1=                  | 50,2 | oligo's > 20 |    |    | F2 = corr2 met Fo               |
| Tm F2=                  | 49,6 | oligo's > 20 |    |    |                                 |

**Figuur 13: Voorbeeld van een Tm-multi berekening**

Resultaat van een Tm-multi smelttemperatuur berekening van de primer KIR2DL4-EX1P28-F. De in het groen aangegeven getallen zijn het aantal basen van de oligo die zelf ingevoerd dienen te worden. De rode smelttemperaturen worden niet bekeken, omdat deze niet voldoen aan de lengte eis. Er is hier te zien dat de smelttemperatuur van deze primer tussen de 53,3 en 58,0 °C ligt.

#### **4.7 KIR-SSO typering**

Deze typering werd gedaan om te bepalen of er cDNA van KIR2DL4 aanwezig was. De kit die hiervoor gebruikt werd is de LIFECODES KIR-SSO TYPING KIT for use with Luminex® van Tepnel Lifecodes. Het principe van de KIR-SSO typering is te zien in figuur 14. Eerst is er een PCR gedaan met de twee KIR mixen uit de kit. Bij deze PCR werd er naast dubbelstrengs product ook enkelstrengs PCR product gevormd doordat er van één primer, ten opzichte van de andere primer, een overmaat aanwezig is. Dit enkelstrengs PCR product is gelabeld met biotine, doordat de in overmaat aanwezige primer gebiotinyleerd is. Bij de op de PCR volgende hybridisatie stap bonden de SSO probes uit de bead mix aan het enkelstrengs PCR product. Elke probe is gebonden aan een andere kleur LuminexMicrosphere (bead). Wanneer de Dilutie oplossing met daaraan toegevoegde Streptavidine-PE werd toegevoegd bond de Streptavidine aan het biotine. Daarna is de hoeveelheid fluorescentie gemeten in het Luminex Instrument. Zie bijlage 1.10 voor het gevolgde protocol.



**Figuur 14: Het principe van de KIR-SSO typering**

De vorming van enkelstrengs product in een PCR is te zien bij **A**. Dan bindt er een probe aan het enkelstrengs product (**B**). Als er streptavidine-PE wordt toegevoegd, bindt dit aan het biotine aan het enkelstrengs product (**C**). Het apparaat kan dan zien welke probe gebonden heeft door de kleur van de bead (**D**).



## Hoofdstuk 5: Resultaten

### 5.1 KIR2DL4 amplificatie

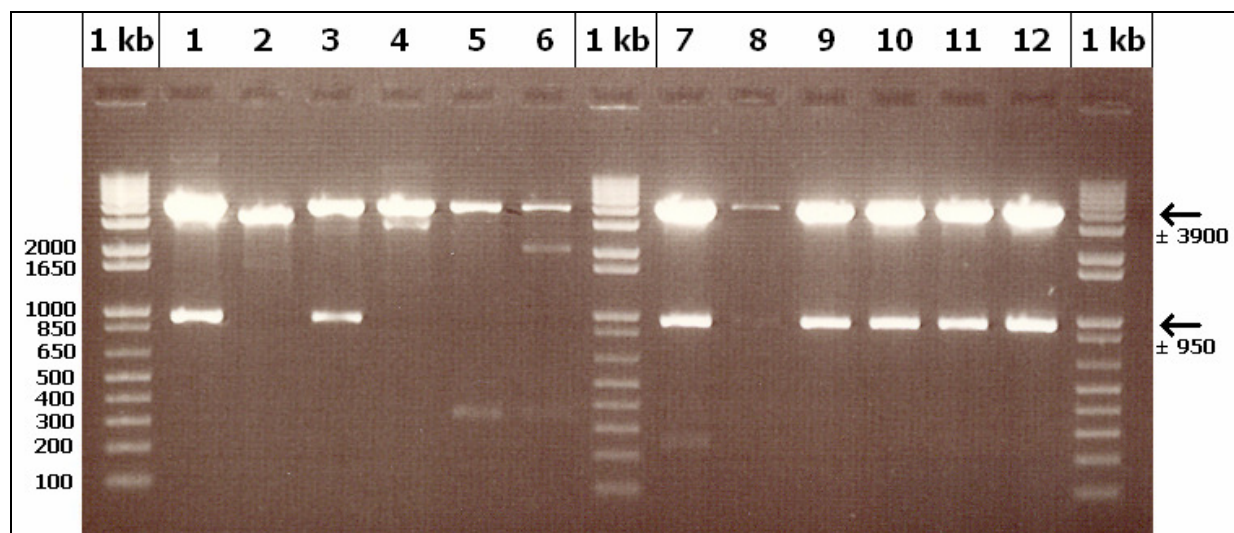
Na een eerste PCR (bijlage 2.1) was er bij elk sample een PCR product van  $\pm 950$  bp te zien. Dit komt niet helemaal overeen met de te verwachten grootte van 1070 bp. Ook was er een smeer te zien.

#### 5.1.1 Optimalisatie van de PCR

Er werd geoptimaliseerd om de achtergrondsmear te verminderen/verwijderen en het bandje specifiek te krijgen. Er is een  $MgCl_2$  concentratie reeks geprobeerd en daaruit bleek dat de gebruikte  $MgCl_2$  concentratie het beste was. De verhoging van de annealingstemperatuur had geen effect op de smear of op de sterkte van het bandje. Het resultaat van minder cycli in combinatie met 1:1 verdund cDNA was een minder sterk bandje. Er moest toen noodgedwongen een overstap gemaakt worden naar een ander PCR apparaat. Dit was van de 9600 naar de 9700, beide van Applied Biosystems. Na deze overstap was er meestal helemaal geen bandje te zien. Ook is er op de 9700 gevarieerd met de annealingstemperatuur en het aantal cycli. Dit had geen effect op het resultaat.

#### 5.1.2 Kloneren

Omdat de verwachte grootte (1070 bp) en de grootte van het aanwezige bandje ( $\pm 950$  bp) verschilden ontstond de vraag of het product wel KIR2DL4 was. Hiervoor is dezelfde PCR nog een keer ingezet en het resultaat hiervan waren meerdere bandjes: één van  $\pm 950$  bp en twee kleinere bandjes van  $\pm 350$  en  $\pm 200$  bp. Omdat de kleinere bandjes zouden kunnen storen bij het kloneren is er besloten het bandje van  $\pm 950$  bp uit de gel te snijden en te zuiveren. Daarnaast is ook het ongezuiverde PCR product gekloneerd. Er zijn 4 klonen van het gezuiverde PCR product aangeprikt en 8 klonen van het ongezuiverde PCR product. In totaal waren er dus 12 klonen. Na een miniprep en knippen met EcoRI zijn de klonen op een agarose gel gezet (figuur 15). Op de foto is te zien dat 7 van de 12 klonen als insert het bandje van  $\pm 950$  bp hadden. Hieruit blijkt dat het zuiveren van het bandje niet nodig is. Er zijn voldoende klonen van het ongezuiverde PCR product die het insert hebben van het bandje van  $\pm 950$  bp.



**Figuur 15:** Foto van de gel van de TOPO vector en het insert na knippen met EcoRI

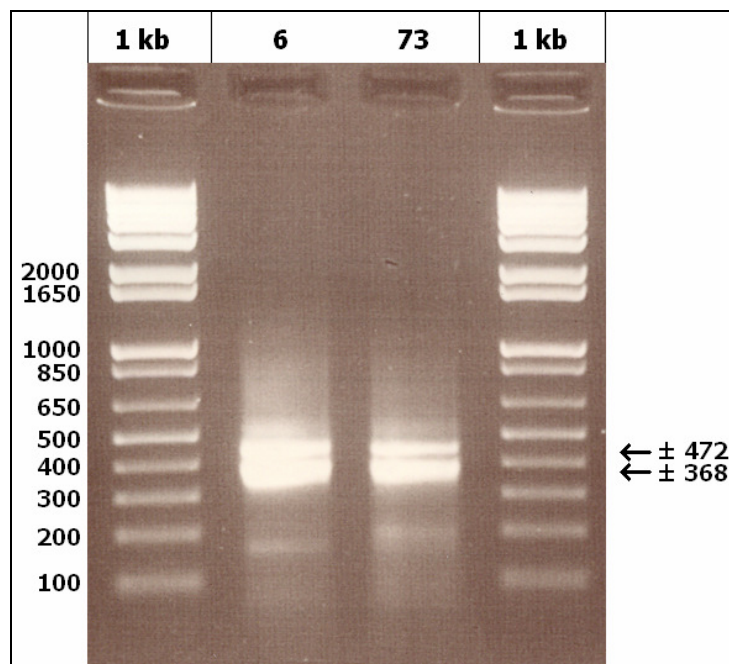
De gel is een 1,5 % agarose gel. De nummers 1 t/m 12 zijn de klonen, waarvan nummer 1 t/m 4 klonen zijn van het gezuiverde PCR product. Nummer 5 t/m 12 zijn de klonen van het ongezuiverde PCR product. 1 kb staat voor de 1 kb plus DNA ladder van Invitrogen. Links staan de groottes van de fragmenten van de ladder aangegeven. Aan de rechterkant wijst de onderste pijl het insert aan en de bovenste pijl wijst de vector aan. Bij kloon 5 en 6 zijn respectievelijk een kleiner ( $\pm 350$  bp) en een groter ( $\pm 2000$  bp) insert dan het bandje van  $\pm 950$  bp te zien.

### 5.1.3 Sequenzen na kloneren

Na het sequencen en analyseren van kloon 12 (een kloon van het ongezuiverde PCR product) bleek het insert geen cDNA van KIR2DL4 te zijn, maar DNA van KIR3DL3. Het ging om een stuk van exon 7 t/m exon 9, inclusief intronen. De specifieke KIR2DL4 primers bleken gedeeltelijk te binden in exon 7 en achter exon 9 van KIR3DL3. Om te kijken of het insert bij andere klonen ook dezelfde sequentie lieten zien, zijn kloon 1 en 3 (klonen van het gezuiverde PCR product) gesequenced en geanalyseerd. Deze twee klonen bleken hetzelfde insert te hebben. Deze bevinding zou kunnen wijzen op DNA in de RNA samples.

### 5.1.4 GAPDH PCR

De aanwijzing dat er DNA in de RNA samples kon zitten werd bevestigd door een GAPDH PCR. Na het op gel zetten van de GAPDH PCR producten waren er per sample twee bandjes te zien (figuur 16). Eén ter grootte van het verwachte cDNA bandje (368 bp, bijlage 3.2). En nog een bandje van  $\pm 470$  bp.



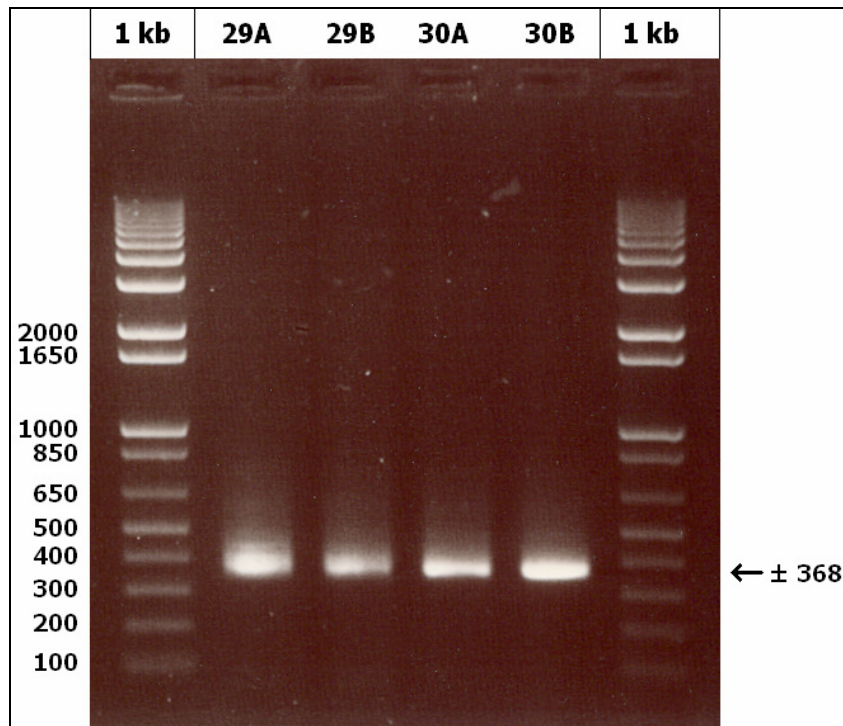
**Figuur 16: Foto van de GAPDH PCR producten**

De gel is een 1,5 % agarose gel. De nummers 6 en 73 zijn de cDNA samples. 1 kb staat voor de 1 kb plus DNA ladder van Invitrogen. Links staan de groottes van de fragmenten van de ladder. Rechts staan twee pijlen. De onderste pijl wijst het cDNA bandje en de bovenste pijl wijst het DNA bandje aan.

Omdat er een DNA sequentie werd gevonden bij het sequencen van de klonen, werd de verwachte grootte van een GAPDH DNA bandje bekeken. De verwachte grootte van een DNA bandje zou 472 bp zijn (bijlage 3.2). Het tweede bandje dat te zien is, is dus DNA.

### 5.1.5 RNA zuiveren

DNA in het RNA is erg storend gebleken, daarom werd er naar een methode gezocht om het in de RNA samples aanwezige DNA te verwijderen. De methode die gebruikt is om de RNA samples te zuiveren zijn magnetische Oligo dT beads. Een GAPDH PCR na een cDNA synthese van deze gezuiverde RNA samples liet nog maar één bandje per sample zien (figuur 17). Dit was alleen het cDNA bandje. Dit wijst erop dat er geen DNA meer aanwezig is in de RNA samples na de zuivering met de beads. Deze methode werkt dus.



**Figuur 17:** Foto van de GAPDH PCR producten na zuiveren met Oligo dT beads

De gel is een 1,5 % agarose gel. De nummers 29A t/m 30B zijn de cDNA samples. 1 kb staat voor de 1 kb plus DNA ladder van Invitrogen. Links staan de groottes van de fragmenten van de ladder. Rechts staat één pijl. Deze pijl wijst het cDNA bandje aan.

Er kon opnieuw geprobeerd worden om een PCR product te verkrijgen met de gezuiverde samples. Hiervoor zijn verschillende primercombinaties uitgetest. Maar er was nog steeds geen PCR product te zien.

### 5.1.6 Primers

Om de PCR op gang te krijgen is er onder andere gekeken naar de gebruikte primers. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de Excel sheet  $T_m$ -multi. Uit een berekening hiermee bleek dat de  $T_m$  van de specifieke KIR2DL4 primers (in exon 1 en 9) en van de primers in het UTR gebied erg van elkaar verschilden. Dit zou een verklaring kunnen zijn voor het feit dat eerdere PCR's geen PCR product opleverden. De ideale  $T_m$  voor de primers is 60 °C en ook een gelijke  $T_m$  van de samen te gebruiken primers is ideaal. Er is bekeken welke primers hiervoor verlengd en welke verkort moesten worden. De  $T_m$  van deze vier specifieke en UTR primers is te vinden in tabel 1. Kijkend naar deze smelttemperaturen is besloten nieuwe primers te bestellen. De primers werden verlengd of verkort aan de 5' kant. Als vervanging van de specifieke KIR2DL4 forward primer in exon 1 is KIR2DL4-EX1P28+2-F besteld. Deze primer is ten opzichte van de originele primer 2 basen verlengd. Ook de nieuw bestelde UTR primer KIRintgen+2-R1 is met 2 basen verlengd. Verder is de specifieke KIR2DL4 reverse primer in exon 9 KIR2DL4-EX9P1363-1-R besteld, welke met 1 base verkort is. Voor de primer KIRintgen-F2 is geen vervangende primer besteld. Zie voor de sequentie van de nieuw bestelde primers bijlage 3.1.1.

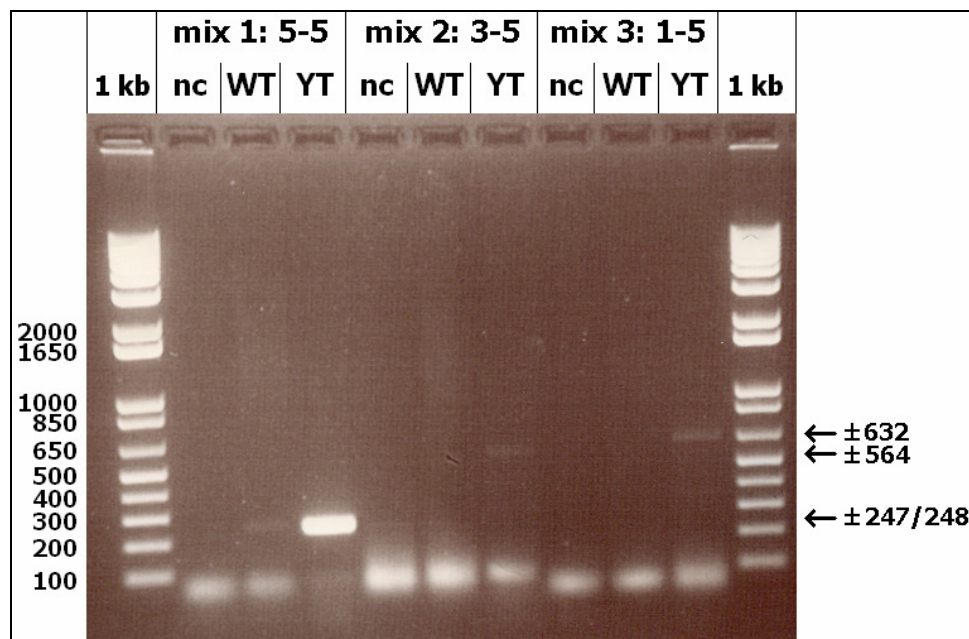
**Tabel 1: Overzicht T<sub>m</sub> primers**

Hier zijn de T<sub>m</sub> van de primers te zien, berekend met T<sub>m</sub>-multi. De T<sub>m</sub> van de primers verschillen van elkaar, zoals in de kolom +/- 0 te zien is. De andere kolommen geven de T<sub>m</sub> aan als de primer 1 of 2 basen verlengd of verkort wordt. De groene T<sub>m</sub> liggen meer bij elkaar in de buurt. Er zijn nieuwe primers besteld met deze T<sub>m</sub>, dus KIR2DL4-EX1P28-F is verlengd met 2 basen besteld, enz.

| Primer             | Smelttemperatuur (T <sub>m</sub> ) (°C) |             |             |             |             |
|--------------------|-----------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                    | +/- 0                                   | +1          | +2          | -1          | -2          |
| KIR2DL4-EX1P28-F   | 53,3 – 58,0                             | 55,9 – 60,0 | 56,5 – 64,0 | -           | -           |
| KIR2DL4-EX9P1363-R | 61,8 – 65,5                             | -           | -           | 59,5 – 63,2 | 55,2 – 59,0 |
| KIRintgen-F2       | 56,5 – 64,0                             | -           | -           | -           | -           |
| KIRintgen-R1       | 51,5 – 56,0                             | 55,9 – 60,0 | 54,7 – 62,0 | -           | -           |

**5.1.7 Cellijnen**

Omdat de PCR nog niet op gang kwam met de nieuw bestelde primers is er ook gekeken naar het cDNA. Er is besloten om mRNA uit celpelleten van cellijnen te isoleren. Ervan uitgaande dat er in de cellijnen meer mRNA van KIR2DL4 aanwezig zou zijn. Dit isoleren van mRNA is net als het zuiveren van de RNA samples gedaan met behulp van oligo dT beads. Na een cDNA synthese is er een GAPDH PCR gedaan, welke hele mooie cDNA bandjes liet zien. En geen DNA bandjes. Om te kijken of er ook cDNA van KIR2DL4 aanwezig was is er een PCR gedaan met SSP primers specifiek voor exon 5 van KIR2DL4. Hieruit bleek dat er bij 2 van de 3 cellijnen (WT47 en YT) cDNA van KIR2DL4 aanwezig is. Het cDNA van deze cellijnen is toen gebruikt voor een PCR met verschillende combinaties van de nieuwe specifieke en UTR primers. Het resultaat hiervan was dat er geen PCR product te zien was op gel. Echter, een rePCR met de PCR producten van de primercombinatie UTR forward met exon 9 reverse liet wel een PCR product zien (figuur 18). Omdat één van de mixen van de rePCR de SSP primers bevatte, werd het SSP programma gebruikt. De bandjes die te zien zijn, zijn allemaal van de grootte die verwacht werd met die primercombinatie.

**Figuur 18: Foto van de PCR producten na een rePCR**

De gel is een 1,5% agarose gel. De samples zijn de PCR producten van de cellijnen WT47 (WT) en YT. Er is ook een negatieve controle (nc) meegenomen. De verschillende mixen zijn de verschillende primercombinaties. Mix 1 zijn de SSP primers. 1kb staat voor de 1kb plus DNA ladder van Invitrogen. De groottes van de fragmenten van de ladder staan links naast de foto vermeld. De bandjes van de samples staan rechts met grootte aangegeven.

Om te proberen de bandjes die te zien zijn na de rePCR (figuur 18) te versterken werd dezelfde rePCR nog een keer ingezet met een lagere annealingstemperatuur en meer cycli. Deze rePCR



producten werden op gel gezet, maar er was behalve het lichte bandje bij WT47 (SSP primers) niets te zien.

### 5.1.8 KIR-SSO typing

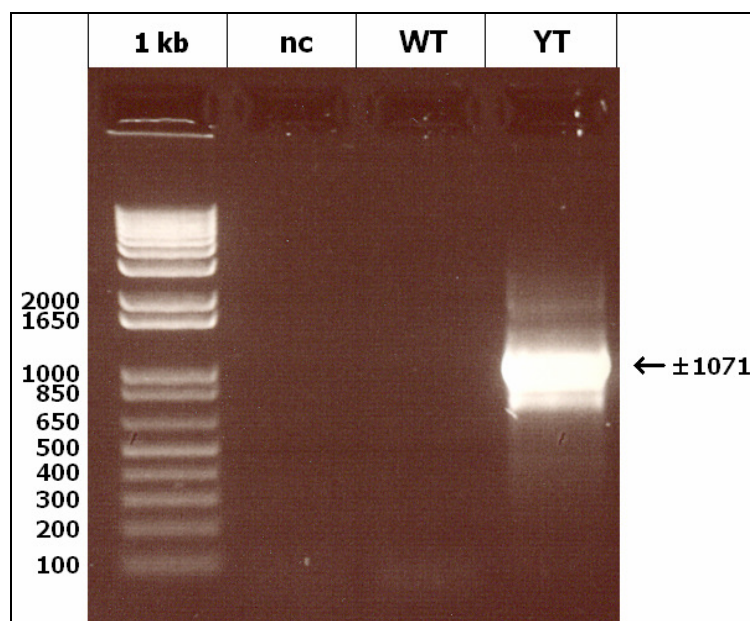
Om te kijken of er cDNA van KIR2DL4 aanwezig was in YT, werd de PCR voor de rePCR herhaald. Op dit PCR product werd een KIR-SSO typing gedaan. Hier kwam uit dat KIR3DL1, KIR2DS4 en KIR2DL4 aanwezig waren in het PCR product van YT. De positieve controles (KIR3DP1 en KIR3DL3) waren negatief, maar dit kan omdat deze KIR genen met de PCR niet geamplificeerd zijn.

### 5.1.9 UTR primers

Er werd toen gekeken naar de verwachte grootte van de PCR producten met het gebruik van de UTR primers. Het bleek dat de UTR forward primer niet vlak voor KIR2DL4 bindt, maar voor andere KIR genen. Hierdoor wordt het PCR product erg groot. De UTR reverse primer bindt wel achter KIR2DL4, maar ook niet heel dichtbij. Ook binden de UTR primers op meerdere plaatsen in het KIR genen gebied. Er is toen besloten om nieuwe UTR primers te selecteren en te bestellen. Hiervoor is Tm-multi weer gebruikt. De nieuw bestelde UTR primers zijn te vinden in bijlage 3.1.3.

### 5.1.10 Expand Long Template PCR System

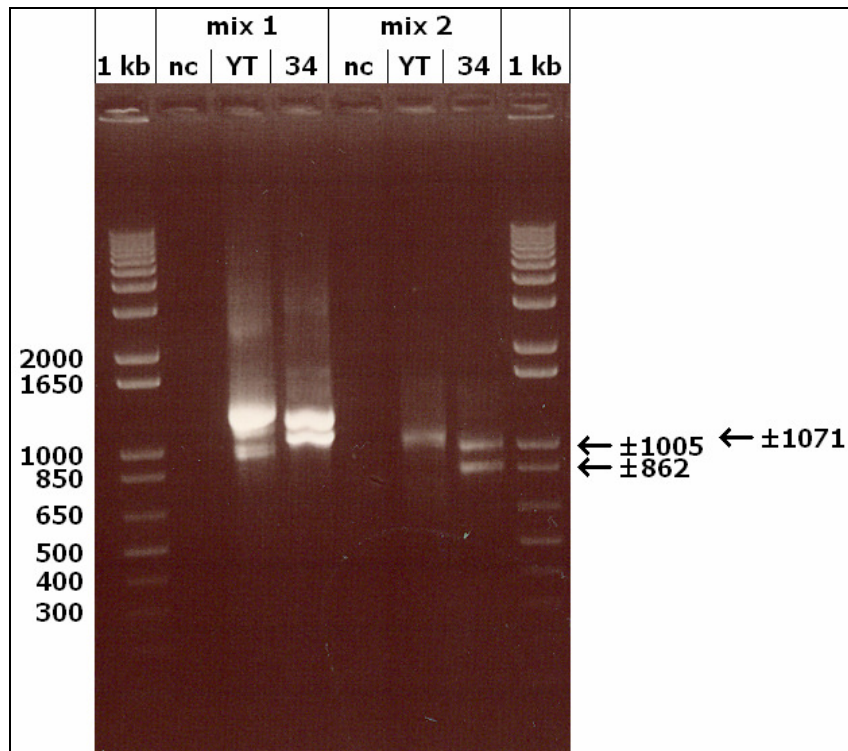
Omdat de grotere PCR producten zwak zijn (figuur 18) werd er een Long Template kit besteld voor het maken van lange PCR producten. De eerste PCR met deze kit werd gedaan met de cellijnen WT47 en YT. Het resultaat is te zien in figuur 19. Het verwachte product is bij YT wel en bij WT47 niet te zien.



**Figuur 19: Foto van het PCR product na een Expand Long Template PCR**

De gel is een 1,5% agarose gel. De gebruikte samples zijn de cellijnen WT47 (WT) en YT. Er is ook een negatieve controle (nc) meegenomen. 1 kb staat voor de 1 kb plus DNA ladder van Invitrogen. De groottes van de fragmenten van deze ladder staan links aangegeven. De gebruikte primers zijn de KIR2DL4 specifieke exon 1 en 9 primers, welke een product geven van 1071 bp. Dit product is bij YT inderdaad te zien, maar bij WT47 niet.

Een zelfde PCR (bijlage 2.1.2) met cellijn YT en sample 34 en verschillende primercombinaties van de nieuwe UTR primers en de specifieke KIR2DL4 primers liet een mooi product zien bij YT. Bij sample 34 was niets te zien. Met het PCR product van de primercombinatie UTR forward (Pre2DL4F-42) met UTR reverse (Post2DL4R+250) is een rePCR (bijlage 2.1.2) ingezet. Dit resulteerde in een mooi product bij sample 34 (figuur 20). Na verhoging van de annealingstemperatuur waren deze producten nog steeds te zien.

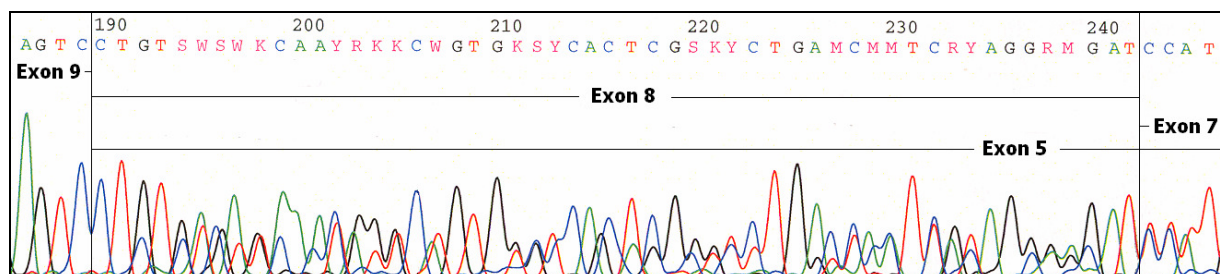


**Figuur 20: Foto van het PCR product na een Expand Long Template rePCR**

De gel is een 1,5% agarose gel. De gebruikte samples zijn de cellijn YT en 34. Er is ook een negatieve controle (nc) meegenomen. 1 kb staat voor de 1 kb plus DNA ladder van Invitrogen. De groottes van de fragmenten van deze ladder staan links aangegeven. Er zijn twee verschillende primermixen. Mix 1 is een combinatie van UTR primers (Pre2DL4F-6 met Post2DL4R+132). De primers in mix 2 zijn de KIR2DL4 specifieke exon 1 en 9 primers. Bij mix 1 en 2 zijn bij YT bandjes van de verwachte grootte te zien (1324 bp voor mix 1 en 1071 bp voor mix 2). De PCR producten bij sample 34 zijn kleiner dan verwacht. Na sequencen blijken het twee splice varianten van 1005 bp en 862 bp te zijn.

### 5.1.11 Sequencen na PCR

De PCR producten zoals beschreven in figuur 20 zijn gesequenced met de primers die voor de PCR gebruikt zijn en ook met interne primers. De gebruikte samenstelling van de mix is anders dan na het kloneren. Zie voor de primers en de samenstelling van de mix bijlage 2.4.2. Uit de sequenties bleek dat het PCR product KIR2DL4 was. Uit de sequenties van sample 34 bleek dat er sprake was van alternative splicing. Er is een PCR product waar de exonen 6,7 en 8 niet aanwezig zijn (figuur 21) en het andere PCR product mist een gedeelte van exon 3. Hierdoor zijn de verwachte groottes van de PCR producten 1005 bp en 862 bp. Dit komt overeen met de grootte van de PCR producten op de foto (figuur 20).



**Figuur 21: Een gedeelte van de sequentie van sample 34**

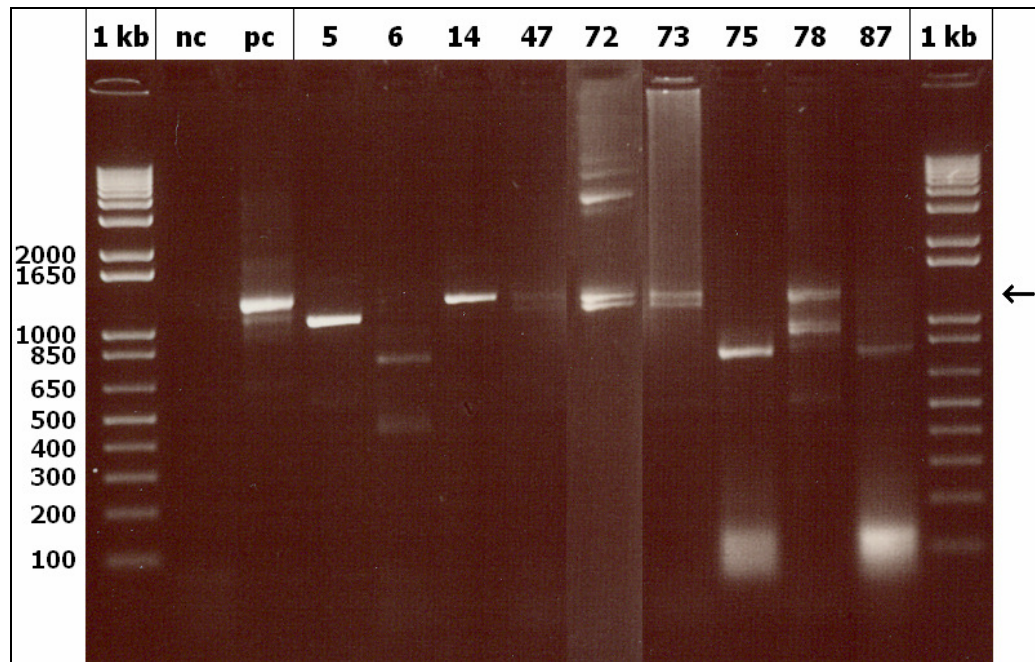
Deze afbeelding is een gedeelte van het resultaat van de sequencereactie met de reverse primer KIR2DL4-EX9P1363-R van sample 34. Links zijn de eerste 4 basen van exon 9 te zien. Tot en met daar is de sequentie homoloog. Vanaf daar is te zien dat exon 8 en exon 5 beiden aansluiten op exon 9. Hieruit blijkt dat er een PCR product is waar de exonen 6,7 en 8 niet aanwezig zijn. Uit een andere sequentie blijkt dat het andere PCR product een gedeelte van exon 3 niet aanwezig is.

## 5.2 Samples

Na de optimalisatie van de KIR2DL4 amplificatie kon gestart worden met de samples waarvan geen allel combinatie bepaald kon worden. Er was van 10 van die 21 samples RNA beschikbaar. Dit zijn de samples 5, 6, 14, 47, 49, 72, 73, 75, 78 en 87.

### 5.2.1 Amplificatie

Na de mRNA isolatie en de cDNA synthese zijn de samples geamplificeerd met het geoptimaliseerde PCR protocol (bijlage 2.1.3). Het resultaat van de rePCR was een gel met producten van verschillende intensiteiten. Deze producten zijn later nog een keer op gel gezet zodat de intensiteit ongeveer overeen kwam en daardoor is de grootte van de producten beter af te lezen. De foto van deze gel is te zien in figuur 22.



**Figuur 22:** Foto van de PCR producten van de samples na een rePCR

De gel is een 1,5% agarose gel. Er is een negatieve controle (nc) en een positieve controle (pc), YT meegenomen. 1 kb staat voor de 1 kb plus DNA ladder van Invitrogen. De groottes van de fragmenten van deze ladder staan links aangegeven. Er is te zien dat de PCR producten van verschillende grootte zijn. Dit komt door verschillende splice varianten. Rechts staat een pijl welke de grootte van een goed gespliced product (1250 bp) aangeeft.

### 5.2.2 Sequencen

Na het kloneren van de samples 5, 6, 14, 47, 49, 72, 73, 75, 78 en 87 is er een miniprep gedaan van de klonen van de samples 5, 14, 73 en 78. Na het knippen van de vectoren met EcoRI zijn de klonen met een insert gesequenced. De sequenties werden geanalyseerd en er werd gekeken naar de bekende polymorfe posities en ook naar eventuele nieuwe polymorfe posities. De resultaten zijn te zien in tabel 2. Op basis van deze polymorfe posities kan bepaald worden welk allel het is (bijlage 5). Ook zijn de rePCR producten die gekloneerd zijn gesequenced. En van een aantal samples is de PCR en rePCR herhaald en deze producten zijn ook gesequenced.

Alle klonen van sample 5 misten exon 6 helemaal en verder ook nog een gedeelte van exon 3 (de laatste 198 bp). Ook was er een gedeelte van intron 7 (67 bp) aanwezig welke aansloot op exon 7. Door deze alternatieve splicing ontstaat een product van 1068 bp. Op basis van de aanwezige bekende polymorfe posities kwamen 7 van de 12 klonen overeen met allel \*00103.

Bij een 9 van de 12 klonen van sample 5 zijn een aantal nieuwe polymorfe posities gevonden, maar deze waren voor elke kloon anders. En uit de sequentie van het rePCR product kan afgeleid worden dat deze nieuwe posities artefacten zijn die opgetreden zijn tijdens het kloneren, omdat deze posities in die sequentie niet terug te vinden zijn. De sequentie van de herhaalde rePCR komt niet helemaal overeen met de sequentie van het rePCR product dat gekloneerd is.



De 5 klonen met een insert van sample 14 bevatten alle exonen en zijn dus 1250 bp groot. Op basis van de bekende polymorfe posities kwamen 3 van de 5 klonen overeen met allel \*00501. Maar twee van deze 3 klonen hebben een nieuwe polymorfe positie welke geen artefact van het kloneren is. Deze nieuwe positie is 140, waar normaal een T en in dit geval een C aanwezig is.

De klonen van sample 73 bevatten alle exonen en nog een gedeelte van intron 1 (96 bp) wat aansluit op exon 1. Door dit extra gedeelte intron ontstaat een product van 1346 bp. De sequenties van dit sample overlappen niet helemaal waardoor een aantal bekende polymorfe posities niet af te lezen was. Op basis van de posities die wel af te lezen waren kwam 1 kloon overeen met allel \*00102. Er is bij beide klonen een nieuwe polymorfe positie gevonden waarvan nog niet bekend is of het een artefact van het kloneren is, omdat de sequentie van het rePCR product geen overlap heeft. Het gaat om positie 1367. Dit is positie 1062 voor de database van alleen KIR2DL4. Normaal is er op deze positie een A aanwezig en deze klonen hebben een G. Bij sample 14 komen de sequenties van de beide rePCR producten overeen.

De 6 klonen met een insert van sample 78 waren allemaal verschillend op basis van de exonen en intronen die ze bevatten. Kortom het waren allemaal verschillende splice varianten. Deze verschillen in grootte van 809 bp tot 1266 bp. Op basis van de aanwezige bekende polymorfe posities kwam 1 van de 6 klonen overeen met allel \*00103. Ook de klonen van dit sample hebben artefacten die opgetreden zijn tijdens het kloneren. En de sequenties van de twee rePCR producten komen niet overeen.

**Tabel 2: Sequenties van de klonen en rePCR producten**

In de tabel staan alle gevonden sequenties van de samples 5, 14, 73 en 78. De bovenste rij posities zijn de posities van alle KIR's van de IPD KIR database. De onderste rij posities zijn de posities van alleen KIR2DL4 van de IPD KIR database. In de kolom product staat of het om het rePCR product gaat of om klonen. En ook hoeveel klonen die sequentie hadden. De h achter rePCR geeft aan dat het om een herhaling van de PCR en rePCR gaat, deze zijn niet gekloneerd. Een ? op een positie geeft aan dat er geen sequentie overlap is. Als er op een positie na staat dan was die positie niet aanwezig door alternatieve splicing. Positie 140 is een nieuwe polymorfe positie gevonden in sample 14.

|        |          | Posities database |     |     |     |     |     |        |     |     |     |     |     |     |     |      |        |      |      |      |        |      |      |      |      |      |
|--------|----------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--------|------|------|------|--------|------|------|------|------|------|
|        |          | Exon 3            |     |     |     |     |     | Exon 5 |     |     |     |     |     |     |     | E 6  | Exon 7 |      |      | E 8  | Exon 9 |      |      |      |      |      |
|        |          | 140               | 158 | 259 | 267 | 283 | 302 | 395    | 412 | 480 | 506 | 550 | 615 | 625 | 987 | 1062 | 1071   | 1111 | 1141 | 1187 | 1318   | 1319 | 1328 | 1337 | 1415 | 1416 |
| Sample | Product  | 140               | 158 | 259 | 267 | 283 | 302 | 395    | 412 | 480 | 506 | 550 | 615 | 625 | 687 | 762  | 771    | 811  | 840  | 886  | 1017   | 1018 | 1023 | 1032 | 1110 | 1111 |
| 5      | kloon 7x | T                 | A   | na  | na  | na  | na  | C      | A   | G   | C   | C   | G   | G   | na  | C    | T      | A    | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
| 5      | kloon 3x | T                 | A   | na  | na  | na  | na  | C      | A   | G   | C   | C   | G   | G   | na  | C    | T      | -    | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
| 5      | kloon 2x | T                 | A   | na  | na  | na  | na  | C      | A   | G   | C   | C   | G   | A   | na  | C    | T      | A    | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
| 5      | rePCR    | T                 | A   | na  | na  | na  | na  | C      | A   | G   | C   | C   | G   | G   | na  | C    | T      | AV   | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
| 5      | rePCR h  | T                 | A   | G   | A   | T   | A   | C      | G   | G   | C   | C   | G   | C   | T   | C    | T      | AV   | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
|        |          |                   |     |     |     |     |     |        |     |     |     |     |     |     |     |      |        |      |      |      |        |      |      |      |      |      |
| 14     | kloon 2x | C                 | G   | G   | A   | T   | A   | C      | G   | G   | C   | C   | G   | C   | T   | C    | T      | A    | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
| 14     | kloon 2x | C                 | G   | G   | A   | T   | A   | C      | G   | G   | C   | C   | G   | C   | T   | C    | T      | -    | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
| 14     | kloon 1x | T                 | G   | G   | A   | T   | A   | C      | G   | G   | C   | C   | G   | C   | T   | C    | T      | A    | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
| 14     | rePCR    | C                 | G   | G   | A   | T   | A   | C      | G   | G   | C   | C   | G   | C   | T   | C    | T      | AV   | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
| 14     | rePCR h  | C                 | G   | G   | A   | T   | A   | C      | G   | G   | C   | C   | G   | C   | T   | C    | T      | AV   | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
|        |          |                   |     |     |     |     |     |        |     |     |     |     |     |     |     |      |        |      |      |      |        |      |      |      |      |      |
| 73     | kloon 1x | T                 | ?   | G   | A   | T   | A   | C      | A   | G   | C   | C   | G   | G   | T   | C    | T      | -    | G    | C    | A      | G    | A    | C    | T    | A    |
| 73     | kloon 1x | ?                 | A   | G   | A   | T   | A   | C      | A   | G   | C   | C   | G   | G   | T   | C    | T      | -    | G    | C    | A      | G    | A    | C    | T    | A    |
| 73     | rePCR    | T                 | ?   | ?   | ?   | ?   | ?   | C      | G   | G   | C   | C   | G   | C/G | T   | ?    | ?      | ?    | ?    | ?    | ?      | ?    | ?    | ?    | ?    | ?    |
|        |          |                   |     |     |     |     |     |        |     |     |     |     |     |     |     |      |        |      |      |      |        |      |      |      |      |      |
| 78     | kloon 1x | T                 | A   | G   | A   | T   | A   | C      | A   | G   | C   | C   | G   | G   | na  | na   | na     | na   | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
| 78     | kloon 1x | T                 | A   | G   | A   | T   | na  | C      | A   | G   | C   | C   | G   | G   | T   | C    | T      | -    | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
| 78     | kloon 1x | na                | na  | na  | na  | na  | na  | C      | A   | G   | C   | C   | G   | G   | T   | C    | T      | -    | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
| 78     | kloon 1x | na                | na  | na  | na  | na  | na  | C      | A   | G   | C   | C   | G   | G   | na  | C    | T      | A    | G    | C    | A      | G    | G    | C    | G    | A    |
| 78     | kloon 1x | na                | na  | na  | na  | na  | na  | C      | A   | G   | C   | C   | G   | G   | na  | C    | T      | -    | G    | na   | na     | na   | na   | na   | T    | A    |
| 78     | kloon 1x | na                | na  | na  | na  | na  | na  | C      | A   | G   | C   | C   | G   | G   | na  | C    | T      | -    | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
| 78     | rePCR    | ?                 | ?   | ?   | ?   | ?   | ?   | C      | A   | G   | C   | C   | G   | G   | ?   | ?    | ?      | ?    | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |
| 78     | rePCR h  | T                 | A   | G   | A   | T   | A   | C      | G   | G   | C   | C   | G   | C   | T   | T    | T      | AV   | G    | C    | A      | G    | G    | C    | T    | A    |



## Hoofdstuk 6: Discussie en conclusie

Om de nieuwe allelen te bevestigen dienden de allelen gescheiden te worden en de hele sequentie van alle exonen moest bepaald worden. In dit onderzoek is ervoor gekozen dit te proberen met RNA, omdat er dan geen intronen aanwezig zijn. Om een amplificatie te kunnen doen met RNA moest eerst een cDNA synthese uitgevoerd worden. Na optimalisatie van de PCR werden de producten gekloneerd en gesequenced. In andere studies zijn ook KIR2DL4 allel polymorfismen bepaald met behulp van sequence based typing. Hiervoor werd DNA gebruikt.<sup>23,24</sup> Bij één van deze studies werden er acht nieuwe allelen gevonden welke opgenomen zijn in de IPD-KIR database.<sup>23</sup> Er werden recentelijk nog drie nieuwe KIR2DL4 allelen gepubliceerd, welke nog niet in versie 1.4.0 van de IPD KIR database verwerkt zijn. Het gaat om de allelen \*00203, \*00502 en \*0080104.<sup>25</sup> Deze allelen staan in bijlage 5.1. Roberts et al (2007) hebben een methode opgezet om de hele KIR genen op DNA niveau te sequencen.<sup>26</sup> Ook hebben ze een methode opgezet om op DNA niveau de KIR2DL4 allelen te karakteriseren met behulp van allel specifieke hybridisatie met oligonucleotiden probes welke gebonden zijn aan magnetische beads.<sup>27</sup>

Een verklaring voor het feit dat er intronen in de sequentie aanwezig waren zou kunnen zijn dat er DNA in de RNA samples zit. Het resultaat van de GAPDH PCR bevestigt dit, omdat er twee producten te zien waren. Dus, uit de resultaten van het sequencen en de GAPDH PCR blijkt dat er DNA aanwezig is in de RNA samples. Een verklaring voor dit feit zou het gebruik van Trizol bij de RNA isolatie kunnen zijn, omdat DNA in het RNA sample vaker wordt gezien bij het gebruik van Trizol. Verder kan er geconcludeerd worden dat de RNA zuivering met magnetische beads effectief was om mRNA te verkrijgen. Maar 10-15% van het RNA is afkomstig van de NK cellen, en het mRNA wat geïsoleerd wordt is maar 2% van het totale RNA, en door de extra stap gaat er nog meer RNA verloren. Hierdoor was het misschien beter geweest om het mRNA uit de lymfocytenfracties gelijk met magnetische beads te isoleren.

Het amplificeren van KIR3DL3 in plaats van KIR2DL4 kan verklaard worden doordat de KIR genen onderling erg homoloog zijn. De meeste KIR genen zijn ongeveer 97% identiek.<sup>10</sup> Hierdoor kunnen de specifieke KIR2DL4 primers gedeeltelijk binden in exon 7 en na exon 9 van KIR3DL3. De gebruikte KIR2DL4 specifieke primers zijn dus niet zo specifiek voor KIR2DL4 als in eerste instantie gedacht werd. Ook later tijdens het onderzoek bleken de primers een cruciaal punt voor het optimaliseren van de PCR te zijn. De smelttemperaturen van de gebruikte primers bleken niet overeen te komen. Voor een ideale combinatie van primers moet de smelttemperatuur van de primers zo dicht mogelijk bij elkaar in de buurt en rond de 60°C liggen. Ook de UTR primers bonden niet heel dicht bij KIR2DL4. Er zijn verschillende nieuwe primers geselecteerd en besteld. Dit was één van de belangrijke stappen die uiteindelijk leidden tot een goed resultaat.

Eén van de andere belangrijke stappen was de rePCR. De kleine hoeveelheid mRNA zou kunnen verklaren dat er geen PCR producten gezien werden. Om dit te controleren werd naar het gebruik van cDNA van cellijnen gekeken. Met behulp van een SSP PCR en een KIR-SSO typering werd er bekeken of er ook cDNA van KIR2DL4 aanwezig was in de cellijnen. Hieruit blijkt dat er cDNA van KIR2DL4 aanwezig is. Een PCR met de cellijnen leverde geen PCR product op, maar een rePCR zorgde wel voor resultaat.

Omdat bij deze rePCR resultaten te zien was dat de grotere producten minder sterk waren is er besloten een kit te bestellen voor lange PCR producten. Een PCR met deze kit liet een heel mooi product zien voor NK-cel lijn YT, welke van de verwachte grootte was. Ook bij een sample was er na een rePCR een mooi resultaat te zien. Uit sequenties van deze PCR producten bleek dat de producten KIR2DL4 waren. Hieruit kan geconcludeerd worden dat het gebruik van de kit voor lange PCR producten ook één van de belangrijke punten bij het optimaliseren van de PCR is.

In de sequentie van het rePCR product van het sample bleken gedeelten van of hele exonen afwezig te zijn doordat er twee sequenties door elkaar gingen lopen. In één product ontbraken exon 6, 7 en 8 en in het andere product ontbrak een gedeelte van exon 3. De afwezigheid van deze exonen leidde tot kleinere PCR producten waarvan de verwachte groottes overeen kwamen met de grootte van de producten die op de foto van de gel te zien waren. Er wordt dus alternatieve splicing gevonden. Exon 6, 7 en 8 coderen voor de linker, het transmembraan gebied en een gedeelte van de cytoplasmatische staart. Als deze exonen missen en het mRNA wordt vertaald naar een eiwit dan missen er hele

stukken van de receptor. Deze receptoren zijn dan waarschijnlijk niet functioneel en worden afgebroken. Als er een gedeelte van exon 3 mist dan mist er een gedeelte van domein D0. Over de splicing van KIR2DL4 is gevonden dat exon 7 weg gespliced kan worden als er een homozygote deletie is van het laatste nucleotide van exon 7. Ook exon 3 kan weg gespliced worden. Over de invloed op de expressie wordt gezegd dat de varianten die exon 7 missen een oplosbare receptor voortbrengen en de varianten die exon 3 missen gewoon tot expressie komen op het celmembraan, maar dan zonder domein D0. De nucleotiden die verantwoordelijk zijn voor het weg splicen van exon 3 zijn niet gevonden. Een mogelijkheid is dat het de polymorfe posities 493 en 568 van intron 3 zijn.<sup>28</sup> Een andere studie beschrijft ook het weg splicen van exon 7 door de deletie wat volgens hun zou kunnen leiden tot een uitgescheiden receptor. Maar ook komt het voor dat exon 7 niet weg gespliced wordt, waardoor bij translatie een receptor zonder cytoplasmatische staart gevormd wordt vanwege het vroegtijdig stopcodon in exon 8.<sup>29</sup>

Na het amplificeren, kloneren en sequencen van de samples waar het om gaat was er ook alternatieve splicing te zien. In deze splice varianten zijn in sommige gevallen één of meerdere hele exonen niet aanwezig. En ook zijn er splice varianten waarin gedeelten van exonen aanwezig zijn en/of er gedeelten van intronen aanwezig zijn. In vier splice varianten zorgt de alternatieve splicing voor een frameshift verschuiving waardoor een vroegtijdig stopcodon ontstaat. Het gaat hierbij om de aanwezigheid van 67 bp van intron 7 (aansluitend aan exon 7) en de afwezigheid van de eerste 244 bp van exon 9. De invloed van al deze verschillende splice varianten op de expressie van de receptor is moeilijk te voorspellen. In sommige gevallen zal de receptor niet tot expressie komen. En in andere gevallen zal er een gedeelte van de receptor missen. In 2000 beschreven Smith et al een model voor splicing waarbij iets meer nucleotiden dan de bekende GT en AG een rol spelen. Dit model zegt dat er in plaats van alleen GT zes nucleotiden de splice site bepalen. En in plaats van alleen AG zijn het drie nucleotiden, een polypyrimidine gebied en een branch point, welke heel belangrijk is.<sup>30</sup> Dit is maar één van de vele verschillende modellen voor splicing. Echter, wat er precies voor de splicing zorgt is nog niet bekend. In de DNA sequenties voor zover aanwezig zijn de splice sites bekeken, maar hierin zijn geen afwijkingen af te lezen die de alternatieve splicing zou kunnen veroorzaken.

Als er gekeken wordt naar de nieuwe posities die eerder gevonden zijn, dan zijn deze in geen enkel geval terug te vinden in de gevonden sequenties. Deze posities zouden in het andere allel wel aanwezig kunnen zijn en anders zijn het misschien artefacten. Wel is er een andere nieuwe polymorfe positie gevonden, positie 140 (exon 3). Hier is een C te zien waar normaal een T aanwezig is. Het is mogelijk dat dit een artefact is welke opgetreden is tijdens de PCR, omdat deze nucleotide verandering niet terug te vinden is in de eerdere sequenties van het DNA. Echter, bij een herhaling van de PCR en rePCR wordt opnieuw dit polymorfisme waargenomen. De kans op twee keer hetzelfde artefact is heel klein. Met de resultaten van de samples worden de eerder gevonden onbekende allelen nog niet gekarakteriseerd.

Het met RNA proberen te verkrijgen van de sequentie van alle exonen van de gescheiden allelen is gelukt. Dit ondanks de kleine hoeveelheid aanwezig mRNA van KIR2DL4. Door de gevonden alternatieve splicing lijkt het erop dat de verschillende allelen invloed hebben op de expressie van de receptor. Er is verder onderzoek nodig om dit aan te tonen.

# Literatuur

- 1** Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 108-22.
- 2** Mickelson EM, Petersdorf E, Anasetti C, Martin P, Woolfrey A, Hansen JA. HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Hum Immunol* 2000; 61: 92-100.
- 3** Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, Urbani E, Perruccio K, Burchielli E, Tosti A, Topini F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Alloreactive natural killer cells in mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 33: 216-21.
- 4** Demanet C, Mulder A, Deneys V, Worsham MJ, Maes P, Claas FH, Ferrone S. Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? *Blood* 2004; 103: 3122-30.
- 5** Brouwer RE, van der Heiden P, Schreuder GMT, Mulder A, Datema G, Anholts JDH, Willemze R, Claas FHJ, Falkenburg JHF. Loss or downregulation of HLA class I expression at the allelic level in acute leukemia is infrequent but functionally relevant, and can be restored by interferon. *Hum Immunol* 2002; 63: 200-10.
- 6** Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Eng J Med* 2000; 343: 702-9.
- 7** Trowsdale J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity* 2001; 15: 363-74.
- 8** Middleton D, Curran M, Maxwell L. Natural killer cells and their receptors. *Transpl Immunol* 2002; 10: 147-64.
- 9** Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Perruccio K, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell recognition of missing self and haploidentical hematopoietic transplantation. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 404-11.
- 10** Kelley J, Walter L, Trowsdale J. Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. *PLoS Genet* 2005; 1: 129-39.
- 11** Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol rev* 2002; 190: 40-52.
- 12** Carrington M, Norman P. The KIR gene cluster. Bethesda, MD: National Library of Medicine (US), NCBI, 2003.
- 13** Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 217-51.
- 14** Marsh SGE, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein LA, Shilling H, Garcia CA, Hsu KC, Wain H. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report. *Tissue Antigens* 2003; 62: 79-86.
- 15** Faure M, Long EO. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol* 2002; 168: 6208-14.

- 16** Carr WH, Pando MJ, Parham P. KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol* 2005; 175: 5222-9.
- 17** Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- 18** Ercolani L, Florence B, Denaro M, Alexander M. Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J Biol Chem* 1988; 263: 15335-41.
- 19** Owczarzy R, Vallone PM, Gallo FJ, Paner TM, Lane MJ, Benight AS. Predicting sequence-dependent melting stability of short duplex DNA oligomers. *Biopolymers* 1997; 44: 217-39.
- 20** Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6409-12.
- 21** Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Qian J, Wallace RB. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol* 1991; 10: 233-8.
- 22** Yap EPH, McGee JO. Short PCR product yields improved by lower denaturation temperatures. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 1713.
- 23** Gedil MA, Steiner NK, Hurley CK. Genomic characterization of KIR2DL4 in families and unrelated individuals reveals extensive diversity in exon and intron sequences including a common frameshift variation occurring in several alleles. *Tissue Antigens* 2005; 65: 402-18.
- 24** Zhu FM, Jiang K, Lv QF, He J, Yan LX. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor KIR2DL4 diversity by sequence-based typing in Chinese population. *Tissue Antigens* 2006; 67: 214-21.
- 25** Shulze C, Steiner NK, Hurley CK. Allelic diversity in KIR2DL4 in a bone marrow transplant population: description of three novel alleles. *Tissue Antigens* 2007; 70: 157-9.
- 26** Roberts CH, Madrigal JA, Marsh SGE. Cloning and sequencing alleles of the KIR2DL4 gene from genomic DNA samples. *Tissue Antigens* 2007; 69: 88-91.
- 27** Roberts CH, Turino C, Madrigal JA Marsh SGE. Enrichment of individual KIR2DL4 sequences from genomic DNA using long-template PCR and allele-specific hybridization to magnetic bead-bound oligonucleotide probes. *Tissue Antigens* 2007; 69: 597-601.
- 28** Goodridge JP, Lathbury LJ, Steiner NK, Shulze CN, Pullikotil P, Seidah NG, Hurley CK, Christiansen FT, Witt CS. Three common alleles of KIR2DL4 (CD158d) encode constitutively expressed, inducible and secreted receptors in NK cells. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 199-211.
- 29** Witt CS, Whiteway JM, Warren HS, Barden A, Rogers M, Martin A, Beilin L, Christiansen FT. Alleles of the KIR2DL4 receptor and their lack of association with pre-eclampsia. *Eur J Immunol* 2002; 32: 18-29.
- 30** Smith CWJ, Valcárcel J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 381-8.

## **Websites**

- A**     <http://www.europdonor.nl>
- B**     <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>
- C**     <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>
- D**     <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

# Bijlagen

|                                              |           |
|----------------------------------------------|-----------|
| <b>Bijlage 1: Protocollen</b>                | <b>39</b> |
| 1.1 RNA isolatie met Trizol                  | 39        |
| 1.2 cDNA synthese                            | 40        |
| 1.3 Bandje uit een gel zuiveren              | 41        |
| 1.4 Kloneren met behulp van topoïsomerase    | 42        |
| 1.5 Miniprep                                 | 43        |
| 1.6 Knippen van de vector                    | 43        |
| 1.7 mRNA zuiveren uit totaal RNA             | 44        |
| 1.8 mRNA isoleren uit celpellets             | 45        |
| 1.9 Sequenzen                                | 46        |
| 1.10 KIR-SSO typering                        | 47        |
| <b>Bijlage 2: PCR programma's en mixen</b>   | <b>48</b> |
| 2.1 PCR cDNA KIR2DL4                         | 48        |
| 2.1.1 Eerste PCR cDNA KIR2DL4                | 48        |
| 2.1.2 Eerste long PCR cDNA KIR2DL4           | 49        |
| 2.1.3 Geoptimaliseerde long PCR cDNA KIR2DL4 | 50        |
| 2.2 GAPDH PCR                                | 51        |
| 2.3 SSP PCR                                  | 52        |
| 2.4 Sequenzen                                | 53        |
| 2.4.1 Sequence reactie na kloneren           | 53        |
| 2.4.2 Sequence reactie na PCR                | 54        |
| 2.5 PCR tijdens KIR-SSO typering             | 55        |
| <b>Bijlage 3: Primers</b>                    | <b>56</b> |
| 3.1 PCR KIR2DL4                              | 56        |
| 3.1.1 Nieuwe primers                         | 57        |
| 3.1.2 SSP primers                            | 57        |
| 3.1.3 Nieuwe UTR primers                     | 58        |
| 3.2 GAPDH PCR                                | 59        |
| 3.3 Sequenzen                                | 59        |
| <b>Bijlage 4: TOPO vector</b>                | <b>60</b> |
| <b>Bijlage 5: KIR2DL4 polymorfismen</b>      | <b>61</b> |
| 5.1 Nieuwe allelen                           | 64        |



# Bijlage 1: Protocollen

## **1.1 RNA isolatie met Trizol**

### Reagentia:

Trizol  
Proteïnase K  
Chloroform  
Isopropanol  
70% ethanol  
MilliQ

### Protocol:

- Celpellets opwarmen tot KT.
- Toevoegen:
  - o 1 ml Trizol
- Plaats 5' bij KT.
- Proteïnase K preïncuberen door 10' bij 37°C te plaatsen.
- Toevoegen aan de celsuspensie:
  - o 10 µl Proteïnase K
- Plaats 30' bij 55°C.
- Toevoegen:
  - o 0,2 ml chloroform
- Schud 15" en incubeer 3' bij KT.
- Centrifugeer 15' met 8000 rpm bij 4°C en zonder rem.
- Waterfase (bovenste laag) afpipetteren en verzamelen in een nieuw epje.
- Toevoegen:
  - o 0,5 ml isopropanol
- Meng en plaats 10' bij KT.
- Centrifugeer 10' met 10000 rpm bij 4°C.
- Verwijder het supernatant.
- Was het pellet met 1 ml 70% ethanol.
- Vortex en centrifugeer 5' met 6000 rpm bij 4°C.
- Verwijder het supernatant.
- Droog de pellets met een tissue en 45' aan de lucht.
- Toevoegen:
  - o 25 µl MilliQ
- Plaats 3' bij 42°C en plaats op ijs.
- Meet de RNA concentratie.

## **1.2 cDNA synthese**

Kit: SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)

|                         |                                      |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Oligo(dT) <sub>20</sub> | 50 µM                                |
| 10x RT buffer           | 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl |
| MgCl <sub>2</sub>       | 25 mM                                |
| DTT                     | 0,1 M                                |
| dNTP mix                | 10 mM                                |
| SuperScript™ III RT     | 200 U/µl                             |
| RNase OUT™              | 40 U/µl                              |
| <i>E.coli</i> RNase H   | 2 U/µl                               |

Overige reagentia:

Gedestilleerd water (Braun)

Protocol:

- Voeg bij elkaar:
  - o 1 µl Oligo(dT)
  - o 1 µl dNTP
  - o 1 pg – 5µg totaal RNA of 1 pg – 500 ng mRNA
  - o gedestilleerd water (aanvullen tot 10 µl)
- Vortex en plaats 5' bij 65°C.
- Plaats daarna 1' op ijs.
- Toevoegen per sample:
  - o 2 µl 10x RT buffer
  - o 4 µl MgCl<sub>2</sub>
  - o 2 µl DTT
  - o 1 µl RNase OUT
  - o 1 µl SuperScript III Reverse Transcriptase
- Vortex, centrifugeer kort en plaats 50' bij 50°C.
- Plaats daarna 5' bij 85°C.
- Plaats direct op ijs.
- Toevoegen per sample:
  - o 1 µl RNase H
- Plaats 20' bij 37°C.

### **1.3 Bandje uit een gel zuiveren**

Kit: QIAquick Gel Extraction Kit (QiaGen)

Buffer QG

Buffer PE

Isopropanol

Overige reagentia:

Gedestilleerd water (Braun)

Protocol:

- PCR product op een 0,9% gel brengen en runnen.
- Bandje waar het om gaat uitsnijden.
- Toevoegen:
  - o 800 µl buffer QG
- Plaats 10' bij 50 °C.
- Toevoegen:
  - o 80 µl isopropanol
- Breng op kolom.
- Centrifugeer 1'.
- Gooi de doorloop weg.
- Toevoegen:
  - o 500 µl buffer QG
- Centrifugeer 1'.
- Toevoegen:
  - o 750 µl buffer PE
- Centrifugeer 1'.
- Gooi de doorloop weg.
- Centrifugeer 1'.
- Breng de kolom over naar een nieuw epje.
- Toevoegen:
  - o 50 µl water
- Zet kort warm.
- Centrifugeer 2' met maximale snelheid.

## **1.4 Kloneren met behulp van topoïsomerase**

Kit: TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen)  
pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> vector  
Zoutoplossing  
S.O.C. medium  
One Shot<sup>®</sup> TOP10 Chemically Competent E.coli

Overige reagentia:

Ampiciline  
LB medium  
Xgal

Protocol:

- Voeg bij elkaar:
  - o 4 µl PCR product
  - o 1 µl zoutoplossing
  - o 1 µl TOPO vector
- Plaats 10' bij KT (minimaal 5').
- Voeg 3 µl hiervan toe aan 50 µl Top 10 chemocompetente bacteriën.
- Plaats 20' op ijs.
- Plaats 30" bij 42°C. (heat shock, transformatie)
- Plaats 2' op ijs.
- Toevoegen:
  - o 250 µl voorverwarmde (KT) SOC (flamberen).
- (VMT lab) Schud 60' horizontaal. (**NIET LANGER!!**)
- Verwarm de platen voor bij 37°C.
- Spatel 40 µl Xgal (50 mg/ml) uit per plaat. (**PAS OP: Xgal = carcinogeen!!**)
- (VMT lab) Breng de glaskristallen en het hele epje bacteriën op de plaat.
- (VMT lab) Doe de deksel erop en schud.
- (VMT lab) Plaats de plaat overnacht bij 37°C.
- (VMT lab) Plaats de plaat in koelkast om de kolonies blauw te laten kleuren.
- Pipetteer in 12 buizen per buis 3 ml LB medium met Ampiciline (flamberen).
- (VMT lab) Prik de witte kolonies naast de blauwe aan met een satéprikker en stop deze in de buis met LB medium (flamberen).
- (VMT lab) Laat de bacteriën in de buizen overnacht groeien in de schudder.

## **1.5 Miniprep**

Kit: GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)

Resuspensie oplossing met RNase A

Lysis oplossing

Neutralisatie/Binding oplossing

Was oplossing

GenElute Miniprep Binding Kolommen

Overige reagentia:

Glycerol

Protocol:

- (VMT lab) Centrifugeer 2 ml bacteriesuspensie 1'.
  - o (glycerolstock maken: 300 µl glycerol toevoegen aan de 1 ml bacteriesuspensie die overblijft en bij -80°C bewaren)
- (VMT lab) Gooi het supernatant weg.
- (VMT lab) Resuspendeer de cellen in 200 µl resuspensiebuffer.
- (VMT lab) Toevoegen:
  - o 200 µl lysisbuffer
- (VMT lab) Meng voorzichtig. (**NIET VORTEXEN!!**)
- (VMT lab) Toevoegen:
  - o 350 µl neutralisatiebuffer
- (VMT lab) Meng voorzichtig.
- (VMT lab) Centrifugeer 10' met maximale snelheid.
- (VMT lab) Breng supernatant over naar een kolom.
- (VMT lab) Centrifugeer 30" – 1'.
- (VMT lab) Gooi de doorloop weg.
- (VMT lab) Toevoegen:
  - o 750 µl wasbuffer
- (VMT lab) Centrifugeer 30" – 1'.
- (VMT lab) Gooi de doorloop weg.
- Centrifugeer 1' om de kolom te drogen.
- Breng de kolom over naar een nieuw epje.
- Toevoegen:
  - o 50 µl water
- Centrifugeer 1'.
- Gooi de kolom weg.

## **1.6 Knippen van de vector**

Reagentia:

|                                           |                  |         |
|-------------------------------------------|------------------|---------|
| SuRe/Cut Buffer H for Restriction Enzymes | 10x conc. buffer | (Roche) |
| EcoRI                                     | 10 U/µl          | (Roche) |

Protocol:

- Maak een mastermix:
  - o 2 µl Buffer H
  - o 1 µl EcoRI (3 pmol/µl)
  - o 12 µl water
- Voeg 15 µl mastermix toe aan 5 µl vector.
- Plaats 60' bij 37°C.
- Breng op gel.

## **1.7 mRNA zuiveren uit totaal RNA**

### Reagentia:

|                                    |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| Dynabeads® Oligo(dT) <sub>25</sub> | (Dyna)          |
| Tris                               | (Roche)         |
| LiCl                               | (Riedel-deHaën) |
| EDTA                               | (Riedel-deHaën) |
| Gedestilleerd water                | (Braun)         |

### Gemaakte buffers:

|                  |                                                    |
|------------------|----------------------------------------------------|
| Binding Buffer   | 20 mM Tris-HCl, pH 7,5<br>1,0 M LiCl<br>2 mM EDTA  |
| Washing Buffer B | 10 mM Tris-HCl, pH 7,5<br>0,15 M LiCl<br>1 mM EDTA |
| 10 mM Tris-HCl   | 10 mM Tris-HCl, pH 7,5                             |

### Protocol:

- Vul het RNA sample aan tot 50 µl met gedestilleerd water.
- Plaats 2' bij 65 °C.
- Plaats op ijs.
- Verplaats ondertussen 100 µl geresuspendeerde Dynabeads uit de stock suspensie naar een 1,5 ml epje.
- Plaats op de magneet.
- Verwijder het supernatant na 30".
- Was de Dynabeads één keer door het epje van de magneet te halen, de Dynabeads te resuspenderen in 100 µl Binding Buffer en daarna het epje terug te plaatsen op de magneet.
- Verwijder het supernatant na 30" en haal het epje van de magneet.
- Toevoegen aan de Dynabeads:
  - o 50 µl Binding Buffer
- Voeg het RNA sample toe aan de Dynabeads in Binding Buffer.
- Mix grondig en plaats 3' – 5' op een rollerbank of meng met de hand bij KT.
- Plaats het epje op de magneet voor minstens 30" of tot de oplossing helder is.
- Verwijder het supernatant.
- Haal het epje van de magneet.
- Was twee keer met 200 µl Washing Buffer B. Gebruik hiervoor de magneet. Zorg ervoor dat al het supernatant verwijderd wordt tussen de wasstappen. *Complete verwijdering van het supernatant is uitermate belangrijk wanneer met kleine volumes gewerkt wordt.*
- Toevoegen:
  - o 10 µl Tris-HCl
- Plaats 2' bij 85 °C.
- Plaats het epje meteen op de magneet.
- Verplaats het geëluëerde mRNA snel naar een nieuw RNase-vrij epje.

## **1.8 mRNA isoleren uit celpellets**

### Reagentia:

|                                    |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| Dynabeads® Oligo(dT) <sub>25</sub> | (Dyna)          |
| Tris                               | (Roche)         |
| LiCl                               | (Riedel-deHaën) |
| EDTA                               | (Riedel-deHaën) |
| SDS                                | (Fluka)         |
| DTT                                | (Fluka)         |
| Proteïnase K                       | 10 mg/ml        |
| Gedestilleerd water                | (Braun)         |

### Gemaakte buffers:

|                      |                                                                             |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Lysis/Binding Buffer | 100 mM Tris-HCl, pH 7,5<br>500 mM LiCl<br>10 mM EDTA<br>1 % SDS<br>5 mM DTT |
| Washing Buffer A     | 10 mM Tris-HCl, pH 7,5<br>0,15 M LiCl<br>1 mM EDTA<br>0,1 % SDS             |
| Washing Buffer B     | 10 mM Tris-HCl, pH 7,5<br>0,15 M LiCl<br>1 mM EDTA                          |

### Protocol:

- Verplaats 100 µl geresuspendeerde Dynabeads uit de stock suspensie naar een RNase-vrij 1,5 ml epje.
- Plaats het epje met de Dynabeads op de magneet.
- Pipetteer het supernatant af na 60"
- Was de Dynabeads één keer. Dit doe je door het epje van de magneet te verwijderen en de Dynabeads te resuspenderen in 100 µl Lysis/Binding Buffer en verder te gaan als het lysaat klaar is.
- Voeg 0,7 ml Lysis/Binding Buffer toe aan het celpellet ( $1-4 \times 10^6$ ). Zorg voor een herhaalde passage van de oplossing door de pipetpunt om complete lysis te verkrijgen.
- Voeg 10 µl Proteïnase K toe.
- Plaats 15' – 60' bij 56°C.
- Het lysaat is nu klaar om toegevoegd te worden aan de Dynabeads. Het lysaat mag ingevroren (-80°C) worden voor later gebruik.
- Voeg het lysaat toe aan de Dynabeads.
- Meng en roteer 10' op een rollerbank bij KT.
- Plaats het epje op de magneet voor 5' en verwijder het supernatant.
- Haal het epje van de magneet.
- Was twee keer met 0,5 ml Washing Buffer A en één keer met 0,5 ml Washing Buffer B. Gebruik hiervoor de magneet.
- Verplaatsen naar een nieuw epje.
- Was nog één keer met 0,5 ml Washing Buffer B.
- Toevoegen:
  - o 18 µl water
- Plaats 2' bij 80 °C.
- Plaats het epje meteen op de magneet.
- Verplaats het geëluëerde mRNA snel naar een nieuw RNase-vrij epje.



## **1.9 Sequenzen**

Kit: BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

BigDye® Terminator v1.1

BigDye® Terminator v1.1/v3.1 Sequencing Buffer (5x)

Overige reagentia:

|                     |           |                 |                                         |
|---------------------|-----------|-----------------|-----------------------------------------|
| Sephadex™ G-50      | Superfine | (GE Healthcare) |                                         |
| Primers             | M13f      | Batch N° 578125 | (OliGold) zie verder bijlage <b>3.3</b> |
|                     | M13r      | Batch N° 578126 | (OliGold) zie verder bijlage <b>3.3</b> |
| Gedestilleerd water | (Braun)   |                 |                                         |

Apparaat:

3130x/ Genetic Analyzer van Applied Biosystems

Protocol:

- Zet de sequence reacties in (voor elke primer een aparte reactie):
  - o 2 µl BDT verdunningsbuffer
  - o 1 µl primer
  - o 1 µl product
  - o 5 µl water
  - o 1 µl BigDye Terminator
- Centrifugeer de plaat.
- Plaats de plaat in het PCR apparaat. (zie bijlage **2.5** voor programma)
- Vul ondertussen een plaat (filter) met sephadex.
- Toevoegen per well:
  - o 300 µl water
- Laat de plaat minimaal 3 uur staan.
- Centrifugeer de sephadex plaat 5' met 1800 rpm.
- Toevoegen aan de sequence producten:
  - o 15 µl water
- Plaats de sephadex plaat op een harde 3130 plaat en pipetteer de 25 µl sequence producten hier in het midden op.
- Centrifugeer 5' met 1800 rpm.
- Plaats een matje op de harde 3130 plaat.
- Kook 2' op bij 95°C in het PCR apparaat.
- Plaats direct op ijs.
- Maak een samplesheet in Excel.
- Klik op:
  - o Foundation data collection
  - o Plate manager
  - o Import (importeer de samplesheet)
  - o Plate view
  - o Samplesheet (zoek de samplesheet)
- Zet de plaat in het apparaat.
- Klik op:
  - o Samplesheet
  - o Plaat
  - o Start
- Als de run klaar is klik dan op:
  - o Sequencing analysis (voer password in)
  - o File
  - o Add sample (zoek run)
  - o Groene pijl
  - o Save

## **1.10 KIR-SSO typering**

Kit: LIFECODES KIR-SSO TYPING KIT for use with Luminex<sup>®</sup> van Tepnel Lifecodes

LIFECODES KIR-1 Mastermix  
LIFECODES KIR-2 Mastermix  
LIFECODES KIR Probe mix  
Dilutie oplossing

Overige reagentia:

|                     |                      |
|---------------------|----------------------|
| Streptavidine-PE    | (Tepnel Lifecodes)   |
| AmpliTaq            | (Applied Biosystems) |
| Gedestilleerd water | (Braun)              |

Apparaat:

LABScan 100 van Luminex xMAP Technology

Protocol:

- Mastermix voor de PCR maken (hoeveelheden per reactie):
  - o 6 µl KIR-1 of KIR-2 Mastermix
  - o 0,2 µl AmpliTaq
  - o 12,8 µl water
- Toevoegen per well:
  - o 19 µl Mastermix
  - o 1 µl sample
- Plaat in het PCR apparaat (9600 research) plaatsen. (voor programma zie bijlage **2.6**)
- PCR producten op gel brengen, runnen en bekijken.
- Verwarm de Probe mix 5' bij 56°C.
- Sonicate 15" en vortex 15".
- Toevoegen aan de wells in een Costar plaat:
  - o 5 µl PCR product
  - o 15 µl Probe mix
- Seal de plaat
- Plaats de plaat in een PCR apparaat (9700), 20' bij 56°C.
- Maak de Dilutie oplossing klaar voor gebruik (hoeveelheden per sample):
  - o 170 µl Dilutie oplossing
  - o 0,85 µl Streptavidine-PE
- Dilutie oplossing toevoegen aan samples bij 56°C.
- Plaats de plaat in het opgewarmde Luminex apparaat.

## Bijlage 2: PCR programma's en mixen

### **2.1 PCR cDNA KIR2DL4**

#### **2.1.1 Eerste PCR cDNA KIR2DL4**

Primers:

KIR2DL4-EX1P28-F     5'-CACCCACGGTCATCATCC-3'  
KIR2DL4-EX9P1363-R     5'-TGTTGTCTCCCTAGAAGATCCCA-3'

Zie verder bijlage **3.1**

PCR mix:

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> /PCR buffer | 2,5 µl  |
| 10 mM dNTP                          | 4,0 µl  |
| Forward primer (20 pmol/µl)         | 0,5 µl  |
| Reverse primer (20 pmol/µl)         | 0,5 µl  |
| AmpliTaq DNA polymerase             | 0,3 µl  |
| mQ                                  | 16,2 µl |
| cDNA                                | 1,0 µl  |

PCR apparaat:

GeneAmp® PCR system 9600 van Applied Biosystems

PCR programma:

|      |     |            |
|------|-----|------------|
| 95°C | 5'  |            |
| 97°C | 20" | } 7 cycli  |
| 60°C | 45" |            |
| 72°C | 90" |            |
| 95°C | 20" | } 28 cycli |
| 55°C | 45" |            |
| 72°C | 90" |            |
| 72°C | 10' |            |
| 10°C | ∞   |            |

### 2.1.2 Eerste long PCR cDNA KIR2DL4

#### Primers 1<sup>e</sup> PCR:

|                      |                              |                  |
|----------------------|------------------------------|------------------|
| KIR2DL4-EX1P28+2-F   | 5'-GTCACCCACGGTCATCATCC-3'   | (Exon 1 forward) |
| KIR2DL4-EX9P1363-1-R | 5'-GTTGTCTCCCTAGAAGATCCCA-3' | (Exon 9 reverse) |
| Pre2DL4F-42          | 5'-CCACATCCTCTGCACCGGTCA-3'  | (UTR forward)    |
| Post2DL4R+250        | 5'-CGTGTCTAAGTGCCGTGTTAAG-3' | (UTR reverse)    |

#### Primers rePCR:

|                      |                               |                  |
|----------------------|-------------------------------|------------------|
| KIR2DL4-EX1P28+2-F   | 5'-GTCACCCACGGTCATCATCC-3'    | (Exon 1 forward) |
| KIR2DL4-EX9P1363-1-R | 5'-GTTGTCTCCCTAGAAGATCCCA-3'  | (Exon 9 reverse) |
| Pre2DL4F-6           | 5'-TGCCTCCTGGCAGCAGAAGCT-3'   | (UTR forward)    |
| Post2DL4R+69         | 5'-AGTGGGGACCTTAGACATTGGT-3'  | (UTR reverse)    |
| Post2DL4R+132        | 5'-CAGGGGTCAAGTGAAATAGAGAA-3' | (UTR reverse)    |

Zie verder bijlage:

Exon 1 forward en exon 9 reverse -> **3.1.1**

UTR forward en reverse -> **3.1.3**

#### Kit:

Expand Long Template PCR System van Roche

#### PCR mix:

|                                                 |         |
|-------------------------------------------------|---------|
| Buffer 1 (kit)                                  | 5,0 µl  |
| 10 mM dNTP                                      | 7,0 µl  |
| Forward primer (20 pmol/µl)                     | 0,75 µl |
| Reverse primer (20 pmol/µl)                     | 0,75 µl |
| Enzymmix (kit)                                  | 0,5 µl  |
| Gedestilleerd water                             | 34 µl   |
| cDNA (1 <sup>e</sup> PCR) / PCR product (rePCR) | 2,0 µl  |

PCR product is van PCR met UTR forward en reverse primer.

#### PCR apparaat:

GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9700 van Applied Biosystems

#### PCR programma:

|      |      |            |
|------|------|------------|
| 95°C | 5'   |            |
| 97°C | 20"  | } 7 cycli  |
| 60°C | 45"  |            |
| 72°C | 120" |            |
| 95°C | 20"  | } 28 cycli |
| 55°C | 45"  |            |
| 72°C | 120" |            |
| 72°C | 10'  |            |
| 10°C | ∞    |            |

### 2.1.3 Geoptimaliseerde long PCR cDNA KIR2DL4

#### Primers 1<sup>e</sup> PCR:

|               |                              |               |
|---------------|------------------------------|---------------|
| Pre2DL4F-42   | 5'-CCACATCCTCTGCACCGGTCA-3'  | (UTR forward) |
| Post2DL4R+250 | 5'-CGTGTCTAAGTGCCGTGTTAAG-3' | (UTR reverse) |

#### Primers rePCR:

|              |                              |               |
|--------------|------------------------------|---------------|
| Pre2DL4F-6   | 5'-TGCCTCCTGGCAGCAGAAGCT-3'  | (UTR forward) |
| Post2DL4R+69 | 5'-AGTGGGGACCTTAGACATTGGT-3' | (UTR reverse) |

Zie verder bijlage **3.1.3**

#### Kit:

Expand Long Template PCR System van Roche

#### PCR mix:

|                                                 |         |
|-------------------------------------------------|---------|
| Buffer 1 (kit)                                  | 5,0 µl  |
| 10 mM dNTP                                      | 7,0 µl  |
| Forward primer (20 pmol/µl)                     | 0,75 µl |
| Reverse primer (20 pmol/µl)                     | 0,75 µl |
| Enzymmix (kit)                                  | 0,5 µl  |
| Gedestilleerd water                             | 34 µl   |
| cDNA (1 <sup>e</sup> PCR) / PCR product (rePCR) | 2,0 µl  |

#### PCR apparaat:

GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9700 van Applied Biosystems

#### PCR programma (1<sup>e</sup> PCR):

|      |     |            |
|------|-----|------------|
| 95°C | 5'  |            |
| 97°C | 20" | } 7 cycli  |
| 60°C | 45" |            |
| 72°C | 90" |            |
| 95°C | 20" | } 28 cycli |
| 55°C | 45" |            |
| 72°C | 90" |            |
| 72°C | 10' |            |
| 10°C | ∞   |            |

#### PCR programma (rePCR):

|      |     |            |
|------|-----|------------|
| 95°C | 5'  |            |
| 97°C | 20" | } 7 cycli  |
| 64°C | 45" |            |
| 72°C | 90" |            |
| 95°C | 20" | } 28 cycli |
| 62°C | 45" |            |
| 72°C | 90" |            |
| 72°C | 10' |            |
| 10°C | ∞   |            |

## **2.2 GAPDH PCR**

### Primers:

GAPDH 5' amp                    5'-GCATCCTGGGCTACACTGAGC-3'

GAPDH 3' amp                    5'-GGTACATGACAAGGTGCGGC-3'

Zie verder bijlage **3.2**

### PCR mix (9600):

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| PCR buffer II               | 2,5 µl  |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>     | 1,5 µl  |
| 10 mM dNTP                  | 2,0 µl  |
| forward primer (25 pmol/µl) | 1,0 µl  |
| reverse primer (25 pmol/µl) | 1,0 µl  |
| AmpliTaq DNA polymerase     | 0,15 µl |
| mQ                          | 16 µl   |
| cDNA                        | 1,0 µl  |

### PCR mix (9700):

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| PCR buffer II              | 2,5 µl  |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>    | 1,5 µl  |
| 10 mM dNTP                 | 2,0 µl  |
| forward primer (5 pmol/µl) | 1,0 µl  |
| reverse primer (5 pmol/µl) | 1,0 µl  |
| AmpliTaq DNA polymerase    | 0,15 µl |
| gedestilleerd water        | 16 µl   |
| cDNA                       | 1,0 µl  |

### PCR apparaat:

GeneAmp® PCR system 9600  
van Applied Biosystems

### PCR apparaat:

GeneAmp® PCR system 9600  
van Applied Biosystems

### PCR programma (9600 en 9700):

|      |    |            |
|------|----|------------|
| 94°C | 3' |            |
| 94°C | 1' | } 35 cycli |
| 60°C | 1' |            |
| 72°C | 2' |            |
| 72°C | 5' |            |
| 10°C | ∞  |            |

## **2.3 SSP PCR**

### Primers:

|         |                          |
|---------|--------------------------|
| 2DL4-5A | 5'-CGGGCCCCACGGTTCGCA-3' |
| 2DL4-5G | 5'-GGGCCCCACGGTTCGCG-3'  |
| 2DL4-3  | 5'-AGGCAGTGGGTCACTCGS-3' |

Zie verder bijlage **3.1.2**

### PCR mix:

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> /PCR buffer | 2,5 µl  |
| 10 mM dNTP                          | 4,0 µl  |
| Forward primer (20 pmol/µl)         | 0,25 µl |
| Forward primer (20 pmol/µl)         | 0,25 µl |
| Reverse primer (20 pmol/µl)         | 0,5 µl  |
| AmpliTaq DNA polymerase             | 0,3 µl  |
| Gedestilleerd water                 | 16,2 µl |
| cDNA                                | 1,0 µl  |

### PCR apparaat:

GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9700 van Applied Biosystems

### PCR programma:

|      |     |            |
|------|-----|------------|
| 95°C | 5'  |            |
| 97°C | 20" | } 5 cycli  |
| 64°C | 45" |            |
| 72°C | 90" |            |
| 95°C | 20" | } 25 cycli |
| 60°C | 45" |            |
| 72°C | 90" |            |
| 72°C | 10' |            |
| 10°C | ∞   |            |

## **2.4 Sequenzen**

### **2.4.1 Sequence reactie na kloneren**

Primers:

M13-F            5'-GACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'  
M13-R            5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGA-3'

Zie verder bijlage **3.3**

Sequence reactie mix:

|                       |      |
|-----------------------|------|
| BDT verdunningsbuffer | 2 µl |
| Primer (3 pmol/µl)    | 1 µl |
| Vector                | 1 µl |
| Gedestilleerd water   | 5 µl |
| BigDye Terminator     | 1 µl |

PCR apparaat:

GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9700 van Applied Biosystems

Sequence reactie programma:

|      |      |            |
|------|------|------------|
| 96°C | 10"  |            |
| 96°C | 10"  | } 25 cycli |
| 50°C | 10"  |            |
| 60°C | 120" |            |
| 15°C | ∞    |            |



## 2.4.2 Sequence reactie na PCR

### Primers:

|                           |                                |                  |
|---------------------------|--------------------------------|------------------|
| Pre2DL4F-6                | 5'-TGCCTCCTGGCAGCAGAAGCT-3'    | (UTR forward)    |
| Post2DL4R+69              | 5'-AGTGGGGACCTTAGACATTGGT-3'   | (UTR reverse)    |
| KIR2DL4-EX1P28+2-F        | 5'-GTCACCCACGGTCATCATCC-3'     | (Exon 1 forward) |
| KIR2DL4-EX9P1363-1-R      | 5'-GTTGTCTCCCTAGAAGATCCCA-3'   | (Exon 9 reverse) |
| PCR NEWSBT DNA KIR2DL4-5' | 5'-CTATATGAGAAACCTTCGCTTACA-3' | (Exon 5 forward) |
| 2DL4-3 (SSP)              | 5'-AGGCAGTGGGTCACTCGS-3'       | (Exon 5 reverse) |

Zie verder bijlage:

Exon 5 forward en reverse -> **3.1**

Exon 1 forward en exon 9 reverse -> **3.1.1**

UTR forward en reverse -> **3.1.3**

### Sequence reactie mix:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| BDT verdunningsbuffer | 1,5 µl |
| Primer (8 pmol/µl)    | 1 µl   |
| PCR product           | 1 µl   |
| Gedestilleerd water   | 5,5 µl |
| BigDye Terminator     | 1 µl   |

### PCR apparaat:

GeneAmp® PCR system 9700 van Applied Biosystems

### Sequence reactie programma:

|      |      |            |
|------|------|------------|
| 96°C | 10"  |            |
| 96°C | 10"  | } 25 cycli |
| 50°C | 10"  |            |
| 60°C | 120" |            |
| 15°C | ∞    |            |

## **2.5 PCR tijdens KIR-SSO typing**

Kit:

LIFECODES KIR-SSO TYPING KIT for use with Luminex<sup>®</sup> van Tepnel Lifecodes

PCR mix:

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| KIR-1 of KIR-2 Mastermix | 6 µl    |
| AmpliTaq DNA polymerase  | 0,2 µl  |
| Gedestilleerd water      | 12,8 µl |
| Sample                   | 1,0 µl  |

PCR apparaat:

GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9600 van Applied Biosystems

PCR programma:

|      |     |            |
|------|-----|------------|
| 95°C | 2'  |            |
| 94°C | 30" | } 40 cycli |
| 59°C | 90" |            |
| 72°C | 30" |            |
| 72°C | 15' |            |
| 4°C  | ∞   |            |

## Bijlage 3: Primers

### 3.1 PCR KIR2DL4

| Primer                    | Sequentie (5'-3')         | Lengte | Exon | Positie | Richting |
|---------------------------|---------------------------|--------|------|---------|----------|
| KIRintgen-F2              | CTCTTGAGCGAGCACCCACT      | 20     | -    | UTR 5'  | forward  |
| KIR2DL4-EX1P28-F          | CACCCACGGTCATCATCC        | 18     | 1    | 28      | forward  |
| KIR2DL4 RNA-5' newSBT     | GGTCAGGACAAGCCCTTCTGCT    | 22     | 3    | 100     | forward  |
| PCR NEWSBT DNA KIR2DL4-5' | CTATATGAGAAACCTTCGCTTAC A | 24     | 5    | 687     | forward  |
| 2DL4-3 (SSP)              | AGGCAGTGGGTCACTCGS        | 18     | 5    | 925     | reverse  |
| KIR2DL4-EX9P1363-R        | TGTTGTCTCCCTAGAAGATCCCA   | 23     | 9    | 1363    | reverse  |
| KIRintgen-R1              | TCTGCCAGCTTTCCAGGT        | 18     | -    | UTR 3'  | reverse  |

#### Exon 1 KIR2DL4

ATGTCCATGT CACCCACGGTCATCATCC TGGCATGTCTTG

#### Exon 2 KIR2DL4

GGTTCTTCTTGACCAGAGTGTGTGGGCACACGTGG

#### Exon 3 KIR2DL4

GT GGTCAGGACAAGCCCTTCTGCT CTGCCTGGCCCAGCGCTGTGGTGCCTCAAGGAGGACACGTGACTCTTCG  
GTGTCACTATCGTCGTGGGTTTAACATCTTCACGCTGTACAAGAAAGATGGGGTCCCTGTCCCTGAGCTCTACA  
ACAGAATATTCTGGAACAGTTTCTCATTAGCCCTGTGACCCAGCACACGCAGGGACCTACAGATGTCGAGGT  
TTTACCCGCACTCCCCACTGAGTGGTCGGCACCCAGCAACCCCTGGTGATCATGGTCACAG

#### Exon 5 KIR2DL4

GT CTATATGAGAAACCTTCGCTTACA GCCCGGCCGGGCCCCACGGTTCGCACAGGAGAGAACGTGACCTTGTC  
CTGCAGCTCCCAGAGCTCCTTTGACATCTACCATCTATCCAGGGAAGGGGAAGCCCATGAACCTTAGGCTCCCTG  
CAGTGCCACAGCATCAATGGAACATTCCAGGCCGACTTCCCTCTGGGTCTGCCACCCACGGAGAGACCTACAG  
ATGCTTCGGCTCTTTCCATGGATCTCCCTACGAATGGTCAGAC GCGAGTGACCCACTGCCT GTTTCTGTCACAG

#### Exon 6 KIR2DL4

GAAACCCTTCTAGTAGTTGGCCTTCACCCACTGAACCAAGCTTCAAACTG

#### Exon 7 KIR2DL4

GTATCGCCAGACACCTGCATGCTGTGATTAGGTACTCAGTGGCCATCATCCTCTTTACCATCCTTCCCTTCTTT  
CTCCTTCATCGCTGGTGCTCCAAAAA

#### Exon 8 KIR2DL4

ATGCTGCTGTAATGAACCAAGAGCCTGCGGGACACAGAACAGTGAACAGGGAG

#### Exon 9 KIR2DL4

GACTCTGATGAACAAGACCCTCAGGAGGTGACATACGCACAGTTGGATCACTGCATTTTCACACAGAGAAAAAT  
CACTGGCCCTTCTCAGAGGAGCAAGAGACCCTCAACAGATACCAGCGTGTGTATAGAATTCCAAATGCTGAGC  
CCAGAGCGTTGTCTCCTGCCATGAGCACCACAGTCAGGCCTTGAT GGGATCTTCTAGGGAGACAACA GCCCT  
GTCTCAAACCCAGCTTGCCAGCTCTAATGTACCAGCAGCTGGAATCTGA

Verwachte grootte PCR product:

| Primercombinaties               | cDNA    | DNA      |
|---------------------------------|---------|----------|
| Forward exon 1 – Reverse exon 9 | 1070 bp | 10405 bp |
| Forward exon 1 – Reverse exon 5 | 632 bp  | 2576 bp  |
| Forward exon 3 – Reverse exon 5 | 564 bp  | 1443 bp  |
| Forward exon 3 – Reverse exon 9 | 1002 bp | 9272 bp  |
| Forward exon 5 – Reverse exon 9 | 717 bp  | 8108 bp  |

### 3.1.1 Nieuwe primers

| Primer               | Sequentie (5'-3')      | Lengte | Exon | Positie | Richting |
|----------------------|------------------------|--------|------|---------|----------|
| KIR2DL4-EX1P28+2-F   | GTCACCCACGGTCATCATCC   | 20     | 1    | 28      | forward  |
| KIR2DL4-EX9P1363-1-R | GTTGTCTCCCTAGAAGATCCCA | 22     | 9    | 1363    | reverse  |
| KIRintgen+2-R1       | ACTCTGCCAGCTTTCCAGGT   | 20     | -    | UTR 3'  | reverse  |

Exon 1 KIR2DL4

ATGTCCATGTCACCCACGGTCATCATCC TGGCATGTCTTG

Exon 9 KIR2DL4

GACTCTGATGAACAAGACCCCTCAGGAGGTGACATACGCACAGTTGGATCACTGCATTTTCACACAGAGAAAAAT  
CACTGGCCCTTCTCAGAGGAGCAAGAGACCCTCAACAGATACCAGCGTGTGTATAGAAGTTCCAAATGCTGAGC  
CCAGAGCGTTGTCTCCTGCCATGAGCACCACAGTCAGGCCTTGA TGGGATCTTCTAGGGAGACAACAGCCCT  
GTCTCAAACCCAGCTTGCCAGCTCTAATGTACCAGCAGCTGGAATCTGA

Verwachte grootte PCR product:

| Primercombinaties               | cDNA    |
|---------------------------------|---------|
| Forward exon 1 – Reverse exon 9 | 1071 bp |

### 3.1.2 SSP primers

| Primer  | Sequentie (5'-3')  | Lengte | Exon | Positie | Richting |
|---------|--------------------|--------|------|---------|----------|
| 2DL4-5A | CGGGCCCCACGGTTCGCA | 18     | 5    | 712     | forward  |
| 2DL4-5G | GGGCCCCACGGTTCGCG  | 17     | 5    | 712     | forward  |
| 2DL4-3  | AGGCAGTGGGTCACTCGS | 18     | 5    | 925     | reverse  |

Exon 5 KIR2DL4

GTCTATATGAGAAACCTTCGCTTACAGCCCGGC CGGGCCCCACGGTTCGCA CAGGAGAGAACGTGACCTTGTC  
CTGCAGCTCCCAGAGCTCCTTTGACATCTACCATCTATCCAGGGAAGGGGAAGCCCATGAACTTAGGCTCCCTG  
CAGTGCCCAGCATCAATGGAACATTCAGGCCGACTTCCCTCTGGGTCTGCCACCCACGGAGAGACCTACAG  
ATGCTTCGGCTCTTTCCATGGATCTCCCTACGAATGGTCAGAC GCGAGTGACCCACTGCCT GTTTCTGTCACAG

Verwachte grootte PCR product:

| Primercombinaties                | cDNA   |
|----------------------------------|--------|
| Forward 2DL4-5A – Reverse 2DL4-3 | 248 bp |
| Forward 2DL4-5G – Reverse 2DL4-3 | 247 bp |

### 3.1.3 Nieuwe UTR primers

| Primer        | Sequentie (5'-3')           | Lengte | UTR | Positie        | Richting |
|---------------|-----------------------------|--------|-----|----------------|----------|
| Pre2DL4F-42   | CCACATCCTCTGCACCGGTCA       | 21     | 5'  | 42 voor exon 1 | forward  |
| Pre2DL4F-38   | ATCCTCTGCACCGGTCAGTCG       | 21     | 5'  | 38 voor exon 1 | forward  |
| Pre2DL4F-37   | TCCTCTGCACCGGTCAGTCGA       | 21     | 5'  | 37 voor exon 1 | forward  |
| Pre2DL4F-6    | TGCGTCCTGGCAGCAGAAGCT       | 21     | 5'  | 6 voor exon 1  | forward  |
| Post2DL4R+250 | CGTGTCTAAGTGCCGTGTTAAG      | 22     | 3'  | 250 na exon 9  | reverse  |
| Post2DL4R+132 | CAGGGGTCAAGTGAAATAGAGA<br>A | 23     | 3'  | 132 na exon 9  | reverse  |
| Post2DL4R+69  | AGTGGGGACCTTAGACATTGGT      | 22     | 3'  | 69 na exon 9   | reverse  |

#### UTR 5' KIR2DL4

AACCTCATATGACGTAGAAGAAGCCTACCTATGTCCCCTTACATGTTGTGGTCAATGTGTCAACTGCACGATC  
CGGGCCCTCA **CCACATCCTCTGCACCGGTCA** **GTCTG**AGCCGAGTCAC**TGCGTCCTGGCAGCAGAAGCT**GCACC  
**Exon1 KIR2DL4**

#### UTR 3' KIR2DL4

##### Exon 9 KIR2DL4

AGGCGTGAGTCTCCATCTTAGAGCATCACTCTTCCTCACACCACAAATCTGGTGCCTGTCTCTTGCTT**ACCAAT**  
**GTCTAAGGTCCCCACT**GCCTGCTGCAGAGAAAACACACTCCTTTGCTTAGCCACAA**TTCTCTATTTCACCTTGA**  
**CCCCTG**CCCACCTCTCCAACCTAACTGGCTTACTTCCTAGTCTACTTGAGGCTGCAATCACACTGAGGAACTCA  
CAATTCCAAACATACAAGAGGCTCTCT**CTTAACACGGCACTTAGACACG**TGCTGTTCCACCTTCCCTCGTGCTG

Verwachte grootte PCR product:

| Primercombinaties                          | cDNA    |
|--------------------------------------------|---------|
| Forward UTR 5' (42) – Reverse UTR 3' (250) | 1467 bp |
| Forward UTR 5' (6) – Reverse UTR 3' (132)  | 1324 bp |
| Forward UTR 5' (6) – Reverse UTR 3' (69)   | 1250 bp |
| Forward UTR 5' (6) – Reverse exon 9        | 1105 bp |
| Forward exon 1 – Reverse UTR 3' (132)      | 1290 bp |

### 3.2 GAPDH PCR

| Primer       | Sequentie (5'-3')     | Lengte | Exon | Richting |
|--------------|-----------------------|--------|------|----------|
| GAPDH 5' amp | GCATCCTGGGCTACACTGAGC | 21     | 8    | forward  |
| GAPDH 3' amp | GGTACATGACAAGGTGCGGC  | 20     | 9    | reverse  |

#### Exon 8 GAPDH

ACCACAGTCCATGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCC  
GCGGGGCTCTCCAGAACATCATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCT  
GAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAAGTGGTGGACCTGACCTGCCGT  
CTAGAAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGG**GCA**  
**TCCTGGGCTACACTGAGC**ACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCT  
GGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCTG

#### Intron GAPDH

GTATGTGGCTGGGGCCAGAGACTGGCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAA  
AAAGGGCCCTGACAACTCTTTTCATCTTCTAG

#### Exon 9 GAPDH

GTATGACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCACATGGCCTCCAAGGAGTAAGAC  
CCCTGGACCACAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGACCCCTCACTGCTGGGGAGTCCCTGCCACA  
CTCAGTCCCCCACCACACTGAATCTCCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAGACCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTA  
GGGA**CCCGCACCTTGTCATGTACC**ATCAATAAAGTACCCTGTGCTCAACC

Verwachte grootte PCR product:

| Primercombinatie                | cDNA   | DNA    |
|---------------------------------|--------|--------|
| Forward exon 8 – Reverse exon 9 | 368 bp | 472 bp |

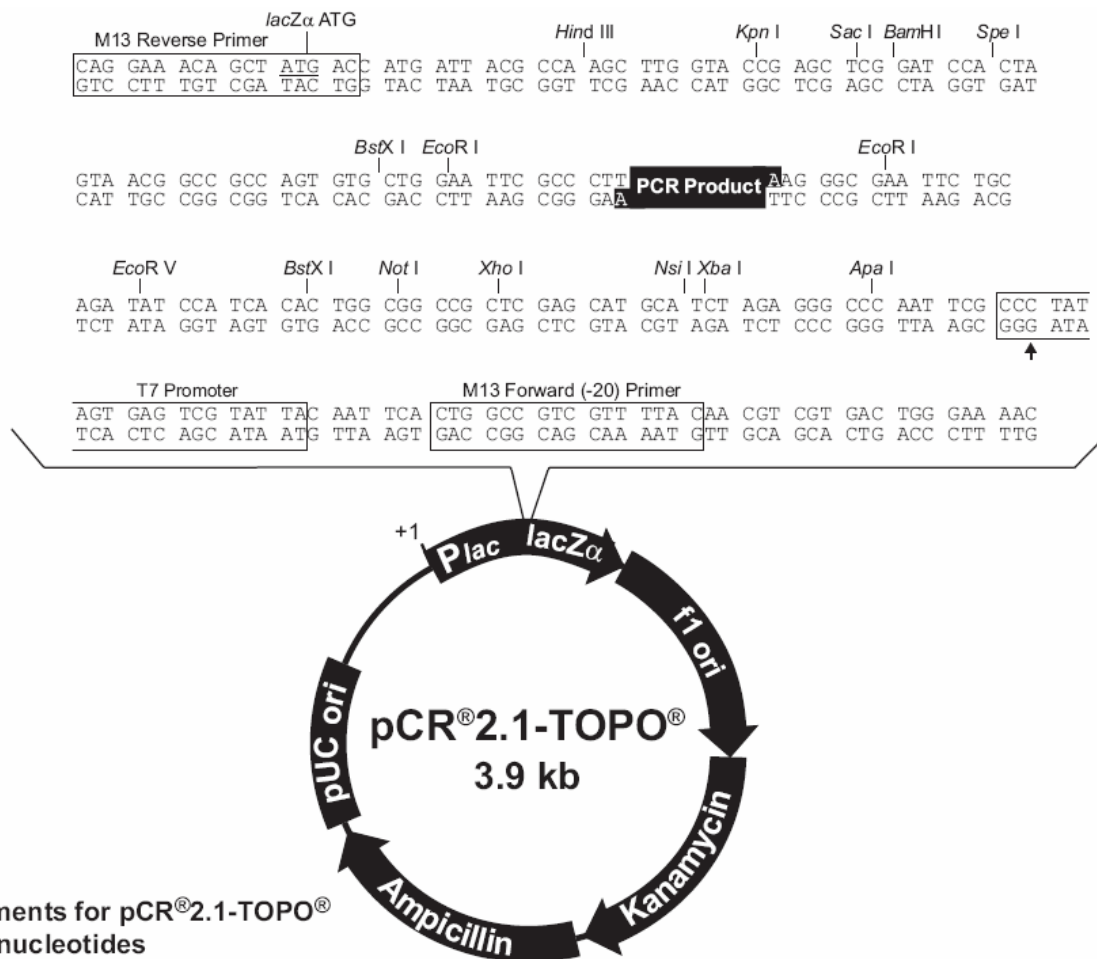
### 3.3 Sequencen

| Primer | Sequentie (5'-3')      | Lengte | Richting | T <sub>m</sub> | E <sub>260nm</sub>                       |
|--------|------------------------|--------|----------|----------------|------------------------------------------|
| M13-F  | GACGTTGTAAACGACGGCCAGT | 23     | forward  | 70°C           | 229500 M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> |
| M13-R  | CAGGAAACAGCTATGACCATGA | 22     | reverse  | 64°C           | 226000 M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> |

#### TOPO vector

CACA**CAGGAAACAGCTATGACCATGA**TTACGCCAAGCTCAGAATTAACCCTCACTAAAGGGACTAGTCCTGCAG  
GTTTAAACGAATTCGCCCTT **INSERT** AAGGGCGAATTCGCGGCCGCTAAATTCAATTCGCCCTATAGTGAGT  
CGTATTACAATTC**ACTGGCCGTCGTTTACAACGTC**

## Bijlage 4: TOPO vector



*LacZα* fragment: bases 1-547

M13 reverse priming site: bases 205-221

Multiple cloning site: bases 234-357

T7 promoter/priming site: bases 364-383

M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406

f1 origin: bases 548-985

Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113

Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991

pUC origin: bases 3136-3809

## Bijlage 5: KIR2DL4 polymorfismen

| Database IPD-KIR (versie 1.4.0) |            |         |        |        |          |          |        |
|---------------------------------|------------|---------|--------|--------|----------|----------|--------|
| Positie:                        |            |         | Allel: |        |          |          |        |
| Exon                            | Alle KIR's | KIR2DL4 | *00101 | *00102 | *0010301 | *0010302 | *00104 |
| 3                               | 158        | 158     | A      | A      | A        | A        | A      |
|                                 | 259        | 259     | G      | G      | G        | G        | G      |
|                                 | 267        | 267     | A      | A      | A        | A        | A      |
|                                 | 283        | 283     | T      | T      | T        | T        | T      |
|                                 | 302        | 302     | A      | A      | A        | A        | A      |
| 5                               | 695        | 395     | C      | C      | C        | C        | C      |
|                                 | 712        | 412     | A      | A      | A        | A        | A      |
|                                 | 780        | 480     | A      | G      | G        | G        | A      |
|                                 | 806        | 506     | C      | C      | C        | C        | C      |
|                                 | 850        | 550     | C      | C      | C        | C        | C      |
|                                 | 915        | 615     | A      | G      | G        | G        | G      |
|                                 | 925        | 625     | G      | G      | G        | G        | G      |
| 6                               | 987        | 687     | T      | T      | T        | T        | T      |
| 7                               | 1062       | 762     | T      | C      | C        | C        | C      |
|                                 | 1071       | 771     | T      | T      | T        | T        | T      |
|                                 | 1111       | 811     | A      | A      | A        | A        | A      |
| 8                               | 1141       | 840     | G      | G      | G        | G        | G      |
| 9                               | 1187       | 886     | C      | C      | C        | C        | C      |
|                                 | 1318       | 1017    | A      | A      | A        | A        | A      |
|                                 | 1319       | 1018    | G      | G      | G        | G        | G      |
|                                 | 1328       | 1023    | G      | A      | G        | G        | G      |
|                                 | 1337       | 1032    | C      | C      | C        | C        | C      |
|                                 | 1415       | 1110    | T      | T      | T        | T        | T      |
|                                 | 1416       | 1111    | A      | A      | A        | A        | A      |

| Database IPD-KIR (versie 1.4.0) |            |         |        |        |        |      |      |  |  |
|---------------------------------|------------|---------|--------|--------|--------|------|------|--|--|
| Positie:                        |            |         | Allel: |        |        |      |      |  |  |
| Exon                            | Alle KIR's | KIR2DL4 | *00105 | *00201 | *00202 | *003 | *004 |  |  |
| 3                               | 158        | 158     | A      | A      | A      | A    | A    |  |  |
|                                 | 259        | 259     | G      | G      | G      | C    | C    |  |  |
|                                 | 267        | 267     | A      | A      | A      | T    | A    |  |  |
|                                 | 283        | 283     | T      | T      | T      | T    | T    |  |  |
|                                 | 302        | 302     | A      | A      | A      | A    | A    |  |  |
| 5                               | 695        | 395     | C      | C      | C      | C    | C    |  |  |
|                                 | 712        | 412     | A      | G      | G      | A    | G    |  |  |
|                                 | 780        | 480     | G      | A      | G      | G    | G    |  |  |
|                                 | 806        | 506     | C      | C      | C      | C    | C    |  |  |
|                                 | 850        | 550     | C      | C      | C      | C    | C    |  |  |
|                                 | 915        | 615     | G      | G      | G      | G    | G    |  |  |
|                                 | 925        | 625     | G      | C      | C      | G    | C    |  |  |
| 6                               | 987        | 687     | T      | T      | T      | A    | A    |  |  |
| 7                               | 1062       | 762     | C      | T      | T      | C    | C    |  |  |
|                                 | 1071       | 771     | T      | T      | T      | C    | T    |  |  |
|                                 | 1111       | 811     | A      | A      | A      | G    | A    |  |  |
| 8                               | 1141       | 840     | A      | G      | G      | G    | G    |  |  |
| 9                               | 1187       | 886     | C      | C      | C      | C    | C    |  |  |
|                                 | 1318       | 1017    | A      | A      | A      | A    | A    |  |  |
|                                 | 1319       | 1018    | G      | G      | G      | G    | G    |  |  |
|                                 | 1328       | 1023    | A      | G      | G      | A    | G    |  |  |
|                                 | 1337       | 1032    | C      | C      | C      | G    | G    |  |  |
|                                 | 1415       | 1110    | T      | T      | T      | C    | C    |  |  |
|                                 | 1416       | 1111    | A      | A      | A      | C    | C    |  |  |



| Database IPD-KIR (versie 1.4.0) |            |         |        |        |        |      |          |  |  |
|---------------------------------|------------|---------|--------|--------|--------|------|----------|--|--|
| Positie:                        |            |         | Allel: |        |        |      |          |  |  |
| Exon                            | Alle KIR's | KIR2DL4 | *00501 | *00601 | *00602 | *007 | *0080101 |  |  |
| 3                               | 158        | 158     | G      | A      | A      | A    | A        |  |  |
|                                 | 259        | 259     | G      | G      | G      | G    | G        |  |  |
|                                 | 267        | 267     | A      | A      | A      | A    | A        |  |  |
|                                 | 283        | 283     | T      | T      | T      | A    | T        |  |  |
|                                 | 302        | 302     | A      | A      | A      | G    | A        |  |  |
| 5                               | 695        | 395     | C      | T      | T      | C    | C        |  |  |
|                                 | 712        | 412     | G      | G      | G      | G    | G        |  |  |
|                                 | 780        | 480     | G      | G      | G      | G    | G        |  |  |
|                                 | 806        | 506     | C      | C      | C      | C    | C        |  |  |
|                                 | 850        | 550     | C      | C      | C      | C    | C        |  |  |
|                                 | 915        | 615     | G      | G      | G      | G    | G        |  |  |
| 6                               | 925        | 625     | C      | C      | C      | C    | C        |  |  |
|                                 | 987        | 687     | T      | A      | T      | T    | T        |  |  |
| 7                               | 1062       | 762     | C      | C      | C      | T    | T        |  |  |
|                                 | 1071       | 771     | T      | T      | T      | T    | T        |  |  |
|                                 | 1111       | 811     | A      | A      | A      | -    | -        |  |  |
| 8                               | 1141       | 840     | G      | G      | G      | G    | G        |  |  |
| 9                               | 1187       | 886     | C      | C      | C      | C    | C        |  |  |
|                                 | 1318       | 1017    | A      | A      | A      | T    | A        |  |  |
|                                 | 1319       | 1018    | G      | G      | G      | G    | G        |  |  |
|                                 | 1328       | 1023    | G      | G      | G      | G    | G        |  |  |
|                                 | 1337       | 1032    | C      | C      | C      | C    | C        |  |  |
|                                 | 1415       | 1110    | T      | T      | T      | ?    | T        |  |  |
|                                 | 1416       | 1111    | A      | A      | A      | ?    | A        |  |  |

| Database IPD-KIR (versie 1.4.0) |            |         |          |          |          |          |      |  |  |
|---------------------------------|------------|---------|----------|----------|----------|----------|------|--|--|
| Positie:                        |            |         | Allel:   |          |          |          |      |  |  |
| Exon                            | Alle KIR's | KIR2DL4 | *0080102 | *0080103 | *0080201 | *0080202 | *009 |  |  |
| 3                               | 158        | 158     | A        | A        | A        | A        | A    |  |  |
|                                 | 259        | 259     | G        | G        | G        | G        | G    |  |  |
|                                 | 267        | 267     | A        | A        | A        | A        | A    |  |  |
|                                 | 283        | 283     | T        | T        | T        | T        | T    |  |  |
|                                 | 302        | 302     | A        | A        | A        | A        | A    |  |  |
| 5                               | 695        | 395     | C        | C        | C        | C        | C    |  |  |
|                                 | 712        | 412     | G        | G        | G        | G        | G    |  |  |
|                                 | 780        | 480     | G        | G        | A        | A        | G    |  |  |
|                                 | 806        | 506     | C        | C        | C        | C        | C    |  |  |
|                                 | 850        | 550     | C        | C        | C        | C        | G    |  |  |
|                                 | 915        | 615     | G        | G        | G        | G        | G    |  |  |
| 6                               | 925        | 625     | C        | C        | C        | C        | C    |  |  |
|                                 | 987        | 687     | T        | T        | T        | T        | T    |  |  |
| 7                               | 1062       | 762     | T        | T        | T        | T        | T    |  |  |
|                                 | 1071       | 771     | T        | T        | T        | T        | T    |  |  |
|                                 | 1111       | 811     | -        | -        | -        | -        | -    |  |  |
| 8                               | 1141       | 840     | G        | G        | G        | G        | G    |  |  |
| 9                               | 1187       | 886     | C        | C        | C        | C        | C    |  |  |
|                                 | 1318       | 1017    | A        | A        | A        | A        | A    |  |  |
|                                 | 1319       | 1018    | C        | G        | G        | G        | G    |  |  |
|                                 | 1328       | 1023    | G        | G        | G        | G        | G    |  |  |
|                                 | 1337       | 1032    | C        | C        | C        | C        | C    |  |  |
|                                 | 1415       | 1110    | T        | T        | T        | T        | T    |  |  |
|                                 | 1416       | 1111    | A        | A        | A        | A        | A    |  |  |

### Database IPD-KIR (versie 1.4.0)

Positie:

| Exon | Alle KIR's | KIR2DL4 |
|------|------------|---------|
|------|------------|---------|

|   |      |      |
|---|------|------|
| 3 | 158  | 158  |
|   | 259  | 259  |
|   | 267  | 267  |
|   | 283  | 283  |
|   | 302  | 302  |
| 5 | 695  | 395  |
|   | 712  | 412  |
|   | 780  | 480  |
|   | 806  | 506  |
|   | 850  | 550  |
|   | 915  | 615  |
|   | 925  | 625  |
| 6 | 987  | 687  |
| 7 | 1062 | 762  |
|   | 1071 | 771  |
|   | 1111 | 811  |
| 8 | 1141 | 840  |
| 9 | 1187 | 886  |
|   | 1318 | 1017 |
|   | 1319 | 1018 |
|   | 1328 | 1023 |
|   | 1337 | 1032 |
|   | 1415 | 1110 |
|   | 1416 | 1111 |

Allel:

| *010 | *011 | *012 |
|------|------|------|
|------|------|------|

|   |   |   |
|---|---|---|
| A | G | G |
| G | G | G |
| A | A | A |
| T | T | T |
| A | A | A |
| T | C | C |
| G | G | G |
| G | G | G |
| A | C | C |
| C | C | C |
| G | G | G |
| C | C | C |
| T | T | T |
| C | T | C |
| T | T | T |
| A | - | A |
| G | G | G |
| C | C | G |
| A | A | A |
| G | G | G |
| G | G | G |
| C | C | C |
| T | T | T |
| A | A | A |

## 5.1 Nieuwe allelen

| Nieuwe KIR2DL4 allelen <sup>28</sup> |             |             |          |          |          |
|--------------------------------------|-------------|-------------|----------|----------|----------|
| Positie:                             |             |             | Allel:   |          |          |
| Exon                                 | Alle KIR's  | KIR2DL4     | *00203   | *00503   | *0080104 |
| 3                                    | 158         | 158         | A        | G        | A        |
|                                      | 259         | 259         | G        | G        | G        |
|                                      | 267         | 267         | A        | A        | A        |
|                                      | 283         | 283         | T        | T        | T        |
|                                      | 302         | 302         | A        | A        | A        |
| 5                                    | 695         | 395         | C        | C        | C        |
|                                      | 712         | 412         | G        | G        | G        |
|                                      | 780         | 480         | A        | G        | G        |
|                                      | 806         | 506         | C        | C        | C        |
|                                      | 850         | 550         | C        | C        | C        |
|                                      | 915         | 615         | G        | G        | G        |
| 6                                    | 925         | 625         | C        | C        | C        |
|                                      | 987         | 687         | T        | T        | T        |
| 7                                    | 1062        | 762         | C        | C        | T        |
|                                      | 1071        | 771         | T        | T        | T        |
|                                      | 1111        | 811         | A        | A        | -        |
| 8                                    | 1141        | 840         | G        | G        | G        |
| 9                                    | 1187        | 886         | C        | C        | C        |
|                                      | 1318        | 1017        | A        | A        | A        |
|                                      | 1319        | 1018        | G        | G        | G        |
|                                      | 1328        | 1023        | G        | A        | G        |
|                                      | 1337        | 1032        | C        | C        | C        |
|                                      | <b>1404</b> | <b>1099</b> | <b>C</b> | <b>C</b> | <b>T</b> |
|                                      | 1415        | 1110        | T        | T        | T        |
|                                      | 1416        | 1111        | A        | A        | A        |

Positie **1404** is een nieuwe polymorfe positie.