

**Einfluß der HLA-DM-vermittelten Katalyse auf die Peptid-  
beladung von MHC Klasse II-Molekülen in verschiedenen  
Subkompartimenten humaner B-Zellen**

**Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover**

**zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.**

**genehmigte Dissertation  
von**

**Dipl.-Biochem. Sven Oliver Arndt  
geboren am 14.6. 1970 in Remscheid**

**1999**

Referent: Priv. Doz. Dr. W. Müller (Medizinische Hochschule Hannover)  
Koreferent: Prof. Dr. G. J. Hämmerling (DKFZ, Heidelberg)

Tag der Promotion: 15.7. 1999

Tag der Veröffentlichung: 6.8. 1999

***für Kerstin***

# VORWORT

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum Februar 1996 bis März 1999 am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg.

Sie wurde unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Günter J. Hämmerling (Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung Molekulare Immunologie) erstellt und im Labor von Herrn Dr. Harald Kropshofer und Frau Dr. Anne B. Vogt durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in Kropshofer et al., 1997a; Arndt et al., 1997 oder sind als Manuskript eingereicht (Vogt et al., 1999 sowie Arndt et al., 1999).

## DANKSAGUNGEN

Herrn Prof. Dr. G. J. Hämmerling danke ich herzlich für die Überlassung dieses interessanten und anspruchsvollen Themas, die gute Betreuung auf wissenschaftlicher und organisatorischer Ebene und die freundliche Übernahme der Berichterstattung der Arbeit. Bei Herrn PD Dr. W. Müller möchte ich mich für die entgegenkommende Betreuung seitens der Medizinischen Hochschule Hannover bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Kropshofer und Frau Dr. A. B. Vogt für ihre gute Betreuung und kompetente Anleitung auf wissenschaftlicher wie organisatorischer Ebene, ihre ständige Unterstützung und ihre ansteckende Begeisterungsfähigkeit. Insbesondere Frau Dr. Vogt möchte ich für die rasche Kontaktaufnahme zu dem Labor von Prof. Dr. R. Martin meinen Dank aussprechen.

Zu großem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. R. Martin und Frau Dr. S. Markovic-Plese für die Durchführung der Proliferationsassays verpflichtet.

In ähnlichem Maße sei Herrn Dr. G. Moldenhauer für die Generierung des monoklonalen Antikörpers DM.K8, die Überlassung diverser anderer Antikörper sowie die Versorgung mit Zweitantikörper-Enzymkonjugaten gedankt.

Bei Herrn Dr. W. Faigle möchte ich für die freundliche Überlassung der rab-5 und rab-7 Antiseren danken, ebenso danke ich Herrn Dr. D. Zaller für das DM-Antiserum und Herrn Dr. Wölpl für den monoklonalen Antikörper 5A1.

Für die Gelfiltrationsassays und die Aufnahme der Massenspektren möchte ich an dieser Stelle noch einmal Herrn Dr. H. Kropshofer danken.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Dr. F. Verreck für die Isolierung und Charakterisierung der Dendritischen Zellen.

Bei Frau P. Brocke bedanke ich mich für ihr sorgfältiges Korrekturlesen und ihre hervorragenden Änderungsvorschläge.

Für diverse FACS-Analysen möchte Frau B.-C. Li sowie Frau A. Schäfer danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn K. Seng und bei Frau K. Pozies bedanken, die mich bei den zahllosen *in vivo*-Beladungsassays unterstützten.

Danken möchte ich an dieser Stelle auch meinen Praktikanten: Herrn C. Faul für die Zusammenarbeit bei der subzellulären Fraktionierung sowie Frau K. Kahlina und Frau N. Anders für ihre Unterstützung bei den *in vivo*-Beladungsassays.

Für die Synthese und die Aufreinigung der Peptide danke ich Dr. R. Pipkorn (DKFZ).

Den Mitarbeitern der gesamten Abteilung möchte ich sowohl für ihre Diskussionsbereitschaft als auch ihr Engagement danken, das sich nicht nur im Labor zeigte und wesentlich zu dem angenehmen Betriebsklima beitrug.

Am Schluß möchte ich den allerherzlichsten Dank meinen Eltern aussprechen, die mir durch ihre wohlwollende Unterstützung ein sorgenfreies Studium ermöglicht und dadurch nicht unerheblich zu dieser Arbeit beigetragen haben, sowie meiner Verlobten Dr. Kerstin Schierle für ihren ausgleichenden Einfluß, ihr Verständnis und ihr Interesse an dieser Arbeit.

Heidelberg, im Juni 1999

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. EINLEITUNG</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1 DAS IMMUNSYSTEM</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1.1 DIE UNSPEZIFISCHE IMMUNANTWORT   | 1         |
| 1.1.2 DIE SPEZIFISCHE IMMUNANTWORT   | 1         |
| 1.1.2.1 Die humorale Immunantwort  | 2         |
| 1.1.2.2 Die zellvermittelte Immunantwort   | 2         |
| <b>1.2 DER HUMANE HAUPTHISTOKOMPATIBILITÄTSKOMPLEX</b>   | <b>3</b>  |
| 1.2.1 GENOMISCHE ORGANISATION DES MHC KLASSE II  | 4         |
| 1.2.2 DER HLA-D POLYMORPHISMUS   | 6         |
| <b>1.3 MHC KLASSE II-ANTIGENE</b>  | <b>6</b>  |
| 1.3.1 STRUKTUR DER KLASSISCHEN MHC KLASSE II-ANTIGENE  | 6         |
| 1.3.2 INTERAKTION VON PEPTIDEN MIT MHC KLASSE II-ANTIGENEN   | 7         |
| 1.3.3 SDS-STABILITÄT DER HLA KLASSE II-ANTIGENE  | 8         |
| 1.3.4 STRUKTUR VON HLA-DM  | 8         |
| <b>1.4 ANTIGENPROZESSIERUNG UND -PRÄSENTATION</b>  | <b>9</b>  |
| 1.4.1 DER KLASSISCHE ANTIGENPRÄSENTATIONSWEG   | 9         |
| 1.4.1.1 Biosynthese und intrazellulärer Transport von MHC Klasse II-Molekülen                            | 9         |
| 1.4.1.2 Die Antigenaufnahme und -prozessierung   | 12        |
| 1.4.1.3 Die Antigenbeladung  | 15        |
| 1.4.1.4 Bedeutung der nicht-klassischen MHC Klasse II-Moleküle HLA-DM und HLA-DO für die Antigenbeladung | 16        |
| 1.4.1.5 Die Antigenpräsentation  | 19        |
| 1.4.2 DER ALTERNATIVE ANTIGENPRÄSENTATIONSWEG  | 20        |
| <b>1.5 ZIELSETZUNGEN DER PROMOTIONSARBEIT</b>  | <b>22</b> |
| <b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>  | <b>23</b> |
| <b>2.1 MATERIAL</b>  | <b>23</b> |
| 2.1.1 CHEMIKALIEN  | 23        |
| 2.1.2 PEPTIDE  | 24        |
| 2.1.3 ZELLINIEN  | 24        |
| 2.1.3.1 Hybridomzelllinien   | 24        |
| 2.1.3.2 EBV-transformierte B-Zelllinien & Hybridzelllinien   | 25        |
| 2.1.4 KULTURMEDIUM FÜR DIE ZELLKULTUR  | 25        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.1.5 ANTIKÖRPER   | 26        |
| 2.1.5.1 Erstantikörper   | 26        |
| 2.1.5.2 Zweitantikörper  | 27        |
| 2.1.6 GERÄTE   | 27        |
| 2.1.6.1 Zentrifugen  | 27        |
| 2.1.6.2 Massenspektrometrie  | 27        |
| 2.1.6.3 Spektroskopie  | 27        |
| 2.1.6.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)                                | 28        |
| 2.1.6.5 Flußzytometrie   | 28        |
| <b>2.2 ZELLBIOLOGISCHE TECHNIKEN</b>   | <b>29</b> |
| 2.2.1 KULTIVIERUNG VON B-LYMPHOZYTEN   | 29        |
| 2.2.2 KULTIVIERUNG VON HYBRIDOMZELLINIEN IN MINIPERM-MODULEN                       | 29        |
| 2.2.3 LAGERUNG VON B-LYMPHOZYTEN   | 29        |
| 2.2.4 KRYOKONSERVIERUNG VON B-LYMPHOZYTEN UND HYBRIDOMZELLEN                       | 29        |
| 2.2.5 REKULTIVIERUNG VON B-LYMPHOZYTEN UND HYBRIDOMZELLEN                          | 30        |
| <b>2.3 BIOCHEMISCHE METHODEN</b>   | <b>31</b> |
| 2.3.1 ISOLIERUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER (mAK)                                     | 31        |
| 2.3.1.1 Affinätschromatographische Reinigung von mAk mittels Protein A             | 31        |
| 2.3.1.2 Immobilisierung von mAk an Cyanobromid-aktivierte Sepharose                | 31        |
| 2.3.2 PRÄPARATIVE ISOLIERUNG SUBZELLULÄRER KOMPARTIMENTE                           | 32        |
| 2.3.2.1 Differentielle Percoll-Dichtegradientenzentrifugation                      | 32        |
| 2.3.2.2 Isolierung von intrazellulären Proteinen mittels Oberflächenbiotinylierung | 33        |
| 2.3.2.3 Isolierung von Plasmamembranproteinen mittels Immunpräzipitation           | 33        |
| 2.3.3 MIKRO-ISOLIERUNG VON HLA-DR-MOLEKÜLEN AUS LYSATEN                            | 34        |
| 2.3.4 SAURE FREISETZUNG VON PEPTIDEN AUS MIKRO-ISOLIERTEN HLA-MOLEKÜLEN            | 34        |
| 2.3.5 IMMUNPRÄZIPITATION VON PLASMAMEMBRANPROTEINEN                                | 34        |
| 2.3.6 QUANTIFIZIERUNG DER PLASMAMEMBRAN- UND DER INTRAZELLULÄREN ANTEILE           | 35        |
| 2.3.7 <i>IN VIVO</i> -BELADUNGSASSAY   | 36        |
| 2.3.7.1 Standardassay  | 36        |
| 2.3.7.2 Inhibition von Oberflächen-DM  | 36        |
| 2.3.7.3 Inhibition der Endozytose bzw. Proteinbiosynthese                          | 37        |
| 2.3.7.4 Kompetitionsassay  | 37        |
| <b>2.4 BIOCHEMISCH-ANALYTISCHE METHODEN</b>  | <b>38</b> |
| 2.4.1 PROTEINBESTIMMUNG  | 38        |
| 2.4.1.1 BCA-Proteinbestimmung  | 38        |
| 2.4.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford  | 38        |
| 2.4.2 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON $\beta$ -HEXOSAMINIDASE                             | 39        |
| 2.4.3 GELELEKTROPHORESEN   | 39        |
| 2.4.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese   | 39        |
| 2.4.3.2 Coomassie-Färbung  | 40        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.4.4 WESTERN BLOTTING UND IMMUNFÄRBUNG  | 40        |
| 2.4.4.1 Western Blotting   | 40        |
| 2.4.4.2 Immunfärbung   | 41        |
| 2.4.4.3 Detektion mittels ECL  | 42        |
| 2.4.4.4 Quantitatives Western Blotting   | 42        |
| 2.4.5 GELFILTRATIONS-ASSAYS  | 42        |
| 2.4.5.1 HPSEC-Bindungsassay  | 42        |
| 2.4.6 MASSENSPEKTROMETRIE (MALDI-MS)   | 43        |
| 2.4.7 DELFIA (DISSOCIATION ENHANCED LANTHANIDE FLUORESCENCE IMMUNOASSAY)   | 43        |
| 2.4.7.1 Beschichten von Mikrotiterplatten  | 43        |
| 2.4.7.2 Sandwich-Immunoassay   | 43        |
| <br>   |           |
| <b>3. ERGEBNISSE</b>   | <b>45</b> |
| <br>   |           |
| <b>3.1 SUBZELLULÄRE CHARAKTERISIERUNG VON MHC KLASSE II-MOLEKÜLEN</b>  | <b>45</b> |
| 3.1.1 CHARAKTERISIERUNG VON MHC KLASSE II-MOLEKÜLEN IN ENDOSO-MALEN UND<br>LYSOSOMALEN KOMPARTIMENTEN                      | 45        |
| 3.1.1.1 Markeranalyse des Dichtegradienten   | 45        |
| 3.1.1.2 Verteilung und Quantifizierung von MHC-Molekülen   | 47        |
| 3.1.1.3 Nachweis von CLIP im DR-assozierten Peptidrepertoire   | 50        |
| 3.1.1.4 Stabilität des DR-assozierten Peptidrepertoires  | 53        |
| 3.1.2 CHARAKTERISIERUNG VON MHC KLASSE II-MOLEKÜLEN AUF DER ZELLOBERFLÄCHE   | 54        |
| 3.1.2.1 Verteilung und Quantifizierung von MHC-Molekülen: Plasmamembran<br>vs. intrazelluläre Kompartimente                | 54        |
| 3.1.2.2 Vergleich DR-assoziierter Peptidrepertoire: Plasmamembran vs.<br>intrazelluläre Kompartimente                      | 56        |
| 3.1.2.3 Vergleich der Stabilität des DR-assozierten Peptidrepertoires: Plasma-<br>membran vs. intrazelluläre Kompartimente | 58        |
| <br>   |           |
| <b>3.2 VORKOMMEN UND FUNKTION VON HLA-DM AUF DER ZELLOBERFLÄCHE</b>  | <b>60</b> |
| 3.2.1 NACHWEIS VON HLA-DM AUF DER ZELLOBERFLÄCHE   | 60        |
| 3.2.1.1 FACS-Analyse   | 60        |
| 3.2.1.2 Immunpräzipitation von Oberflächen-MHC Klasse II-Molekülen   | 60        |
| 3.2.2 ETABLIERUNG EINES NACHWEISES VON DR:PEPTID-KOMPLEXEN   | 62        |
| 3.2.3 EINFLUß VON DM AUF DIE SUBZELLULÄRE VERTEILUNG VON MHC KLASSE II   | 64        |
| 3.2.4 DM BESCHLEUNIGT DIE BELADUNG VON EXOGENEN PEPTIDEN   | 66        |
| 3.2.5 SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER DM-VERMITTELTEN KATALYSE   | 68        |
| 3.2.5.1 Identifizierung von Beladungskompartimenten der DM-vermittelten<br>Katalyse  | 68        |
| 3.2.5.2 Selektive Inhibition von Oberflächen-DM  | 70        |
| 3.2.5.3 Einfluß von Endozytose und Proteinbiosynthese  | 72        |
| 3.2.6 DM-VERMITTELTE KATALYSE IM KONTEXT VERSCHIEDENER KLASSE II-ALLELE  | 73        |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.7 DM ERLEICHTERT DEN AUSTAUSCH VON PEPTIDEN  | 76 |
| 3.2.7.1 Kinetik des Peptidaustauschs   | 76 |
| 3.2.7.2 Einfluß der Art des Kompetitors auf den Peptidaustausch                                    | 77 |
| 3.2.8 EINFLUß VON DM AUF DIE BELADUNG UND PRÄSENTATION VON MBP UND SEINEN IMMUNDOMINANTEN EPITOPEN | 79 |
| 3.2.8.1 Beladung von MBP und seinen immundominanten Epitopen                                       | 79 |
| 3.2.8.2 Präsentation von MBP und seinen immundominanten Epitopen                                   | 80 |

## **4. DISKUSSION** **83**

### **4.1 SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER BELADUNG VON MHC KLASSE II-MOLEKÜLEN** **83**

### **4.2 PEPTID-SELEKTION DURCH PEPTIDAUSTAUSCH** **88**

### **4.3 HLA-DM IM ALTERNATIVEN BELADUNGSWEG** **91**

    4.3.1 NACHWEIS VON DM IM ALTERNATIVEN BELADUNGSWEG 91

    4.3.2 EINFLUß VON HLA-DM AUF DIE ANTIGENPRÄSENTATION IM ALTERNATIVEN BELADUNGSWEG 95

## **5. ZUSAMMENFASSUNG** **99**

## **6. LITERATURVERZEICHNIS** **101**

## Verzeichnis der Abkürzungen

|        |  |
|--------|--|
| Abb.   | Abbildung  |
| Abk.   | Abkürzung(en)  |
| AMCA   | 7-Amino-4-methylcumarin-3-essigsäure                                   |
| APC    | Antigen-präsentierende Zelle (engl. antigen presenting cell)           |
| APS    | Ammoniumperoxosulfat   |
| AS     | Aminosäure(n)  |
| BCR    | B-Zell-Rezeptor  |
| B-LCL  | B Lymphoblastoid-Zelllinie   |
| BSA    | Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)                        |
| CLIP   | engl. MHC class II - associated invariant chain peptides               |
| DaG-PO | engl. donkey-anti goat antibody conjugated with horseradish peroxidase |
| DMSO   | Dimethylsulfoxid   |
| DTT    | Dithiothreitol   |
| EAE    | experimentelle allergische Enzephalomyelitis                           |
| ECL    | engl. enhanced chemiluminescence                                       |
| EDTA   | Ethylendiamintetraacetat   |
| EE     | frühes Endosom (engl. early endosome)                                  |
| engl.  | englisch   |
| ER     | endoplasmatisches Retikulum  |
| EtOH   | Ethanol  |
| FCS    | fötales Kälberserum  |
| g      | Gravitationskonstante  |
| GaM-PO | engl. Goat-anti mouse antibody conjugated with horseradish peroxidase  |
| GaR-PO | engl. Goat-anti rabbit antibody conjugated with horseradish peroxidase |
| gek.   | gekocht  |
| HA     | Hämagglutinin  |
| HAc    | Eisessig (konz. Essigsäure)  |
| HLA    | MHC-Komplex des Menschen (engl. human leucocyte antigen)               |
| HPLC   | engl. high performance liquid chromatography                           |
| HPSEC  | engl. high performance size exclusion chromatography                   |
| IEM    | Immunelektronenmikroskopie   |
| IgG    | Immunglobulin G  |
| li     | Invariante Kette (engl. invariant chain)                               |
| IP     | Immunpräzipitation   |
| kD     | Kilodalton   |
| LE     | spätes Endosom (engl. late endosome)                                   |
| LYS    | Lysosom  |

---

|                        |   |
|------------------------|---|
| mAk                    | monoklonaler Antikörper   |
| MALDI                  | engl. matrix-assisted laser desorption and ionization                     |
| MBP                    | basisches Myelinprotein   |
| MeOH                   | Methanol  |
| MHC                    | Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex) |
| MS                     | Massenspektrometrie oder Multiple Sklerose                                |
| m/z <sup>+</sup>       | Masse-Ladungsverhältnis   |
| PAGE                   | Polyacrylamidgelelektrophorese  |
| PMSF                   | Phenylmethylsulfonylfluorid   |
| red.                   | unter reduzierenden Bedingungen   |
| rpm                    | Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)                          |
| RT                     | Raumtemperatur  |
| SDS                    | Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecylsulfate)                        |
| T <sub>C</sub> -Zellen | zytotoxische T-Zellen   |
| T <sub>H</sub> -Zellen | T-Helferzellen  |
| TCR                    | T-Zell-Rezeptor   |
| TFA                    | Trifluoressigsäure (engl. trifluor acetic acid)                           |
| TGN                    | engl. trans Golgi network   |
| TRIS                   | Tris(hydroxymethyl)aminomethan  |
| ungek.                 | ungekocht   |
| vgl.                   | vergleiche  |
| WB                     | Western Blotting  |
| % (v/v)                | Volumenprozent  |
| % (w/v)                | Gewichtsprozent   |

## Abstract (English)

The presentation of exogenous antigens by major histocompatibility complex (MHC) class II-proteins is an essential part of the adaptive immune system and turned out to be a complicated multi-step process: Newly synthesized class II associate with invariant chain (Ii) in the ER of antigen presenting cells (APCs) and these complexes are then targeted to endosomal/lysosomal compartments. At the same time, exogenous antigens are internalized to the same compartments. The proteolytic activity in these organelles is responsible for the degradation of Ii as well as the endocytosed antigens giving rise to residual class II-associated Ii peptides (CLIPs) and antigenic peptides, respectively. Loading with an antigenic peptide requires the removal of CLIP. Although this peptide can dissociate via self-release, the removal is remarkably accelerated in the presence of the nonclassic MHC class II molecule HLA-DM. Cell biological and biochemical characterization of this newly discovered protein provided deeper insight into the molecular mechanism underlying the loading process: HLA-DM accumulates in acidic compartments where it catalyses the removal of low-stability peptides, such as CLIP. Finally, the loaded complexes are presented on the cell surface of APCs.

The question in which compartment the loading of MHC class II molecules takes place has been a great matter of debate in this decade. Taking the recent knowledge about the loading catalyst DM into account loading compartments were defined in this thesis as organelles which contain HLA-DM, its bona fide substrate, MHC II:CLIP and loaded MHC II molecules. Analysis of subcellular fractions and the respective MHC II complexes revealed that late endosomes and lysosomes of different densities qualify as loading compartments.

The fact that DM releases not only CLIP but also other low-stability peptides leads to a selection for high-stability ligands as shown by *in vitro* experiments. This process is termed „editing“ which is assumed to result in the accumulation of stable class II:peptide complexes at the cell surface. As this thesis demonstrates, intracellular and plasma membrane MHC II molecules differ indeed in their associated peptides: The repertoire from the cell surface contains new peptide species and the peptides are, on the average, longer and more stable. This difference can be ascribed, at least in part, to the editing activity of DM: In a competition assay only the DM-positive transfectant was able to exchange an already bound reporter peptide for a competitor peptide, whereas the DM-deficient transfectant was not.

DM has been described as an intracellular protein not being expressed on the cell surface. Therefore nobody has examined in depth, whether DM plays a role in the alternative pathway where class II molecules recycling from the cell surface are charged with antigen. In this thesis it is shown that a subset of DM molecules resides on the cell surface associated to classic MHC II molecules. Surface DM communicates with early endocytic organelles and modulates exogenous peptide loading. Strikingly, loading and presentation of the immunodominant epitope of myelin basic protein, a candidate autoantigen in multiple sclerosis, is counteracted by the editing activity of DM in the recycling pathway. Thus, DM appears to control presentation of autoepitopes implicated in autoimmunity.

**Antigen presentation - HLA-DM - recycling pathway**

## Abstract (Deutsch)

Die Präsentation exogener Antigene durch MHC Klasse II-Proteine ist ein wichtiger Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Dabei handelt es sich um einen komplexen, mehrstufigen Vorgang: Neusynthetisierte Klasse II-Proteine assoziieren mit Invarianter Kette (Ii) im ER antigenpräsentierender Zellen (APCs) und werden als Komplex in endosomal/lysosomale Kompartimente transportiert. Via Endozytose gelangen dorthin auch exogene Antigene. In der proteolytischen Umgebung dieser Organellen wird die Ii zu CLIPs (Klasse II-assoziierte Ii Peptide) und die exogenen Antigene zu Peptiden abgebaut. Das noch gebundene CLIP muß im nächsten Schritt entfernt werden; dies funktioniert zwar auch mittels „self-release“, aber in Anwesenheit des nicht-klassischen MHC II-Proteins HLA-DM verläuft die Dissoziation von CLIP erheblich schneller. Zellbiologische und biochemische Untersuchungen dieses neuentdeckten Proteins haben das Verständnis über die molekularen Mechanismen des Beladungsprozesses vertieft: HLA-DM akkumuliert in sauren Kompartimenten, wo es die Dissoziation von Peptiden geringer Stabilität, wie CLIP, katalysiert. Abschließend kann das MHC II-Molekül mit einem antigenischen Peptid beladen und zur Zelloberfläche transportiert werden.

Die Frage, in welchem Kompartiment die Beladung von MHC Klasse II-Molekülen stattfindet, wurde in der Vergangenheit sehr kontrovers diskutiert. Ausgehend von den neuen Erkenntnissen über den Katalysator HLA-DM wurden in dieser Arbeit Beladungskompartimente als solche definiert, die sowohl DM als auch sein bona fide Substrat MHC II:CLIP und beladene MHC II-Moleküle enthalten. Die Analyse subzellulärer Fraktionen und den entsprechenden MHC II-Komplexen zeigte, daß sich Beladung in späten Endosomen und in Lysosomen unterschiedlicher Dichte ablaufen kann.

Da DM nicht nur CLIP, sondern auch andere Peptide geringer Stabilität entfernen kann, werden unter *in vitro*-Bedingungen Liganden hoher Stabilität selektiert. Dieser Vorgang wurde „Editing“ genannt und sollte zu einem Akkumulieren stabiler Klasse II:Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche führen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß sich intrazelluläre und Oberflächen-MHC-Moleküle in ihrem Peptidrepertoire voneinander unterscheiden: Das Oberflächenrepertoire enthält andere Peptide und seine Peptide sind im Durchschnitt länger und stabiler. Dieser Unterschied kann, zumindest teilweise, der Wirkung von DM zugeschrieben werden: In einem zellulären Beladungsassay war nur die DM-positive Transfektante in der Lage bereits gebundenes Peptid gegen einen Kompetitor auszutauschen.

Bislang wurde das Vorkommen von DM auf der Zelloberfläche ausgeschlossen. Daher hat bisher niemand genau untersucht, ob DM in den „Recycling“-Weg involviert ist, bei dem Oberflächen-Klasse II-Moleküle während des Recyclings mit Antigenen beladen werden. Diese Arbeit zeigt, daß DM sehr wohl auf der Plasmamembran vorkommt, mit frühen Endosomen kommuniziert und die Beladung exogener Peptide moduliert. Auffälligerweise wird die Beladung und die Präsentation immundominanter Epitope von basischem Myelinprotein, das ein potentielles Autoantigen der Multiplen Sklerose ist, durch die Aktivität von DM im Recyclingweg verhindert. Folglich scheint DM die Präsentation von Autoepitopen zu beeinflussen.

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen hat sich im Laufe der Evolution mit ungefähr 3-4 kg Zellmasse zum größten Organsystem des Körpers entwickelt. Es dient dem Schutz gegen eindringende Pathogene sowie gegen Krebs. Fehlfunktionen des Immunsystems, z.B. Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis oder Myasthenie, aber auch allergischen Reaktionen kommen eine immer bedeutendere Rolle zu. Viele Erkrankungen, deren Ursache bisher unbekannt waren, lassen sich vermutlich auf Defekte des Immunsystems zurückführen. Trotz verbesserter Hygiene und medizinischer Versorgung ist das Immunsystem heute mannigfaltigen Angriffen ausgesetzt, die nicht zuletzt auf die schnelle, globale Verteilung hochvirulenter neuer Krankheitserreger zurückzuführen sind. Es ist daher erstaunlich, in welchem Maße das Immunsystem in der Lage ist, auf solche, zum Teil völlig neuartigen Herausforderungen zu reagieren. Die molekularen Grundlagen der Antigenerkennung sind daher für das Verständnis der Immunität und für die Entwicklung therapeutischer Ansätze von außerordentlicher Bedeutung.

### 1.1.1 Die unspezifische Immunantwort

Wirbellose besitzen als Schutz gegen Pathogene ausschließlich das unspezifische Immunsystem. Dazu gehören sowohl anatomische Barrieren (z.B. die Haut) und physiologische Barrieren (z.B. extreme pH-Werte), lösliche Faktoren (z.B. antibakterielle Enzyme) als auch phagozytische Zellen.

Beim Menschen beruht diese ursprüngliche Abwehrstrategie hauptsächlich auf dem Zusammenwirken des sogenannten Komplementsystems mit phagozytisch hochaktiven Makrophagen. Proteine des Komplementsystems lagern sich an Antigene eingedrungener Mikroorganismen an. Dies führt zum einen zur Aktivierung von Makrophagen, die die Mikroben phagozytieren, zum anderen kann es zur direkten Zerstörung der entsprechenden Organismen durch Membran-Perforation führen. Eine weitere Möglichkeit der unspezifischen Abwehr liegt in der Erkennung bestimmter Polysaccharide in Bakterienkapseln und anschließender Phagozytose durch Freßzellen.

### 1.1.2 Die spezifische Immunantwort

Weiter entwickelte Wirbeltiere besitzen zusätzlich zum unspezifischen noch ein spezifisches Immunsystem, welches die Möglichkeit besitzt, unbekannte Pathogene zu erkennen und zu eliminieren. Diese Flexibilität der Immunantwort liegt im antizipatorischen Prinzip des Vertebraten-Immunsystems begründet: Jedes Individuum besitzt eine immense Vielzahl verschie-

dener Rezeptormoleküle, die es ermöglichen, nahezu jede antigene Determinante, sogenannte Epitope, eines Makromoleküls zu erkennen. Beruhend auf dem Prinzip der klonalen Selektion (Burnet, 1959) werden jeweils diejenigen bei der Immunantwort verwendet, die das entsprechende Antigen effizient binden können. Dabei spielen spezialisierte Abwehrzellen wie Makrophagen, Gliazellen und vor allem Lymphozyten eine zentrale Rolle. Mit Hilfe von sogenannten Gedächtniszellen ist dem Säuger-Immunsystem sogar eine gewisse Lernfähigkeit zuzusprechen.

### **1.1.2.1 Die humorale Immunantwort**

Hauptfunktion der humoralen Immunantwort ist es, extrazelluläre Mikroorganismen zu zerstören und damit eine Verbreitung intrazellulärer Infektionen zu verhindern. Dies wird durch spezifische Antikörper erreicht, die auf drei Wegen zur Immunität beitragen: Antikörper können von außen an Mikroorganismen binden und verhindern so ihre Adhäsion und ihr Eindringen in das Epithel (Neutralisierung), sie können die Phagozytose der Mikroorganismen unterstützen (Opsonisierung) und sie können das Komplementsystem aktivieren, was zur Lyse der Mikroorganismen führt. Die spezifischen Antikörper werden zunächst als B-Zell-Rezeptoren (BCR) auf der Zelloberfläche von B-Lymphozyten exprimiert (von Bursa fabricii, dem B-Zell-Produktionsorgan der Vögel, oder von engl. „bone marrow-derived“). Durch somatische Rekombination während der Reifung entstehen etwa  $10^{11}$  verschiedene BCR-Spezifitäten (Tonegawa et al., 1983). Der BCR erkennt z.T. komplexe Determinanten, sogenannte B-Zell-Epitope, auf zellgebundenen oder nativ gefalteten Antigenen. Nach der Internalisierung des BCR:Antigen-Komplexes werden die Antigene proteolytisch bearbeitet (prozessiert) und kleine Bruchstücke in Assoziation mit einem Molekül des Haupthistokompatibilitätskomplexes, MHC (engl. major histocompatibility complex), auf der Zelloberfläche präsentiert. Nach erfolgreicher Erkennung und Aktivierung durch eine T-Zelle proliferieren die spezifischen B-Zellen und werden auf diese Weise klonal selektiert. Die B-Zellen differenzieren zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen und schließlich zu persistierenden Gedächtniszellen, wodurch das Immunsystem sein „Erinnerungsvermögen“ erlangt.

### **1.1.2.2 Die zellvermittelte Immunantwort**

Die Erkennung von intrazellulären Pathogenen und die Zerstörung der infizierten Zellen sind das Hauptziel der zellulären Immunantwort. Diese bedient sich dabei der T-Lymphozyten, kurz T-Zellen (von Thymus-abhängig), die antigenische Epitope in Form von prozessierten Antigen-Fragmenten erkennen. Dabei werden diese Peptide von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes präsentiert und von dem heterodimeren T-Zell-Rezeptor (TCR) der T-Zellen erkannt. Diese eingeschränkte Erkennung von Fremdan antigenen nur in Assoziation mit eigenen MHC-Molekülen wird als „MHC-Restriktion“ bezeichnet (Zinkernagel & Doherty, 1974). In Analogie zu den BCR können durch somatische Rekombination bis zu  $10^{15}$  verschiedene Spezifitäten entstehen (Davis & Bjorkman, 1988).

Reife T-Zellen werden in zwei Klassen unterteilt. Die zytotoxischen T-Zellen ( $T_C$ -Zellen) exprimieren das Oberflächenmolekül CD8 und interagieren über den TCR und CD8 mit MHC Klasse I-Molekülen. Diese Zellen spielen vor allem bei der Eliminierung von virusinfizierten oder entarteten körpereigenen Zellen eine wichtige Rolle. T-Helferzellen ( $T_H$ -Zellen) dagegen tragen den Marker CD4, der als akzessorisches Protein den trimeren MHC:Peptidantigen:TCR-Komplex stabilisiert. Diese Zellen werden u.a. bei der Aktivierung von B-Zellen eingesetzt. Reife  $T_H$ -Zellen werden an Hand ihres Lymphokinmusters weiter in  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen unterschieden (Mosmann et al., 1986).  $T_H1$ -Zellen sezernieren in erster Linie IL-2, TNF $\beta$  und INF $\gamma$  und sind im wesentlichen bei der Aktivierung von Makrophagen und der Bildung von stark opsonisierender Antikörper beteiligt.  $T_H2$ -Zellen regen die B-Zelldifferenzierung und Bildung neutralisierender Antikörper an, spielen also eher bei der humoralen Immunantwort eine wichtige Rolle. Sie produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL10 und IL-13, während die Lymphokine IL-3, TNF $\alpha$  und GM-CSF von beiden Unterklassen sezerniert werden.

## 1.2 Der humane Haupthistokompatibilitätskomplex

Infolge des Auftretens von Abstoßungsreaktionen bei Gewebetransplantationen, die in der Regel zur Zerstörung des Transplantats führen, wurde eine Gruppe von Proteinen näher charakterisiert. Diese Proteine wirken als Antigene und stimulieren so die Lymphozyten des Empfängers. Im Gegensatz zu den meisten Antigenen führen sie jedoch eine schnelle Zerstörung herbei - dies hat einen starken (major) Effekt auf die Gewebeverträglichkeit. Auf Grund dieser Entdeckung werden diese Antigene als Haupthistokompatibilitätsantigene bezeichnet, die von einem Gencluster, dem sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex; MHC), codiert werden.

Dieser Gencluster existiert in vielen Wirbeltieren und wurde u.a. im Menschen, Schimpansen, Gorilla, in der Maus, Ratte, syrischen Hamster, in Blindmäusen, im Kaninchen, Hund, in der Katze, im Rind, Schwein, Schaf, Pferd, Geflügel, Zebrafisch, und im Ochsenfrosch nachgewiesen. Er konnte auch indirekt in mehreren anderen Vertebraten gezeigt werden, während bis heute wurde noch kein zufriedenstellender Beweis für die Existenz des MHC in irgendeinem wirbellosen Tier erbracht worden ist. In jeder Spezies hat der MHC einen zusätzlichen Namen, der in den meisten Fällen aus dem Namen der Spezies und den Worten Lymphozyten(Leukozyten)-Antigen zusammengesetzt ist. So ist der humane MHC das humane Leukozyten-Antigen oder HLA. In einigen Spezies werden jedoch aus historischen Gründen andere Namen gebraucht. Der Maus-MHC wird zum Beispiel Histokompatibilität-2 oder H-2 genannt.

Zwei Klassen von MHC-Molekülen werden unterschieden: Moleküle der Klasse I kommen auf fast allen somatischen Zellen vor; in hoher Konzentration bei einigen Zellen wie Lymphozyten und in geringer Konzentration bei anderen Zellen wie Fibroblasten oder Neuronen.

Moleküle der Klasse II des MHC werden dagegen nur von einigen ausgewählten Zelltypen exprimiert: In erster Linie von professionell antigenpräsentierenden Zellen (B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen), daneben auch von Melanomzellen, aktivierten T-Lymphozyten, einigen epithelialen Zellen und verschiedenen parenchymalen Zellen. Dabei gibt es große Unterschiede in der MHC Klasse II-Expression, die nicht nur vom jeweiligen Zelltyp, sondern auch vom Differenzierungszustand und vom Aktivierungszustand der betreffenden Zellen abhängt.

### 1.2.1 Genomische Organisation des MHC Klasse II

Die Gene des humanen MHC-Klasse II liegen relativ zu den HLA Klasse I-Genen auf der zentromerischen Seite des kurzen Armes von Chromosom 6. Die Restriktionskarte der Klasse II-Region umfaßt rund 1000 Kilobasenpaare. Der gesamte Chromosomenabschnitt läßt sich evolutionstheoretisch und funktionell in mehrere Genblöcke, sogenannte „Subregionen“ gliedern: DM, DO, DP, DQ und DR. Im Normalfall bilden jeweils die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Genprodukte innerhalb einer Subregion funktionelle Klasse II-Heterodimere. Allerdings konnte in einzelnen Fällen eine cis-Komplementation (z.B. DR $\alpha$  mit DQ $\beta$ ) zwischen Subregionen gezeigt werden (Lotteau et al., 1987).

Die **HLA-DR-Subregion** besteht aus einem Gen für die monomorphe  $\alpha$ -Kette (DRA) und neun  $\beta$ -Ketten-Genen (DRB1 - DRB9), wobei es sich bei den Genen DRB2, DRB6 - DRB9 um Pseudogene handelt (Larhammer et al., 1985). Wie in der Abb. 1.1 dargestellt, hängt die Organisation der DRB-Genen vom jeweiligen Haplotyp ab. Während es bei DR1 und DR8 nur ein funktionelles Gen für die  $\beta$ -Kette auf dem B1-Locus gibt, besitzt beispielsweise DR2 (=DR15 und DR16) ein zweites  $\beta$ -Ketten-Gen auf dem B5-Lokus (Kawai et al., 1989).

Die **HLA-DQ-Subregion** enthält je zwei funktionelle Gene für die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Ketten, wobei meist nur die DQA1- und DQB1-Genprodukte die DQ-Antigene bilden (Jonsson et al., 1987). In der **HLA-DP-Subregion** finden sich die beiden für DP kodierenden Gene DPA1 und DPB1 sowie die Pseudogene DPA2 und DPB2 (Gustafsson et al., 1987).

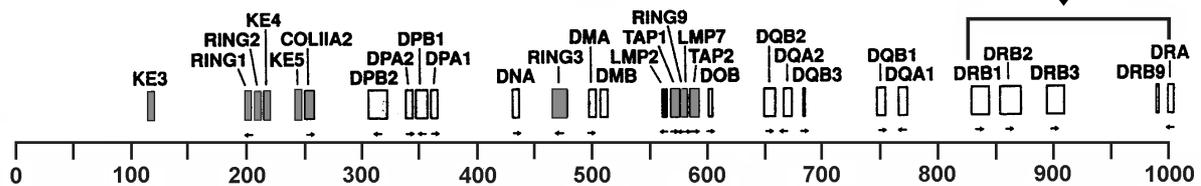
Zusätzlich wurden Gene identifiziert, die die sogenannten nicht-klassischen MHC Klasse II-Moleküle kodieren. Im Gegensatz zu den klassischen MHC Klasse II-Molekülen HLA-DR, -DP und -DQ zeichnen sie sich durch einen limitierten Polymorphismus (siehe 1.2.2) aus.

Dazu hören die Gene HLA-DNA und -DOB, die für das Protein **HLA-DO** kodieren, das neben dem limitierten Polymorphismus (Jonsson & Rask, 1989) eine weitere Besonderheit aufweist: im Gegensatz zu den klassischen MHC II-Molekülen ist die Expression von DO nicht von dem Klasse II Transaktivator (CIITA) abhängig (Chang et al., 1996).

Zwischen DNA und DOB liegen die Gene für **HLA-DM**, HLA-DMA und -DMB (Kelly et al., 1991). Das DM-Molekül gehört zwar eindeutig zur Immunglobulin-Superfamilie, aber es unterscheidet sich deutlich von anderen Klasse I- und Klasse II-Antigenen. So sind beispielsweise beide Gene hochkonserviert, zeigen nur geringen Polymorphismus (Sanderson et al., 1994) und weisen bezüglich MHC I und MHC II Genen gleichermaßen ca. 20 bis 25% Sequenzhomologie auf.

### Gene für Nicht-MHC Klasse II Moleküle

| Gene         | codieren für            |
|--------------|-------------------------|
| LMP2, LMP7:  | Proteine des Proteasoms |
| TAP1, TAP2:  | ABC Transporter         |
| COLIA2:      | Kollagen                |
| RING1,2,3,9: | [unbekannte Funktion]   |
| KE3,4,5:     | [unbekannte Funktion]   |



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Genorganisation der Klasse II-Region des humanen MHC**

Die Gene für die MHC Klasse II Moleküle DR, DQ, DP, DM und DO sind durch weiße Kästchen symbolisiert; die Gene für Nicht-MHC Klasse II Moleküle sind markiert und ihre entsprechenden Genprodukte aufgeführt. Oben rechts ist die Genorganisation der DRB-Gene in Abhängigkeit vom jeweiligen Haplotyp dargestellt (aus Campbell & Trowsdale, 1993).

In der MHC Klasse II-Region werden auch Proteine kodiert, die für die MHC Klasse I-vermittelte Antigenpräsentation verantwortlich sind:

- LMP2 und LMP7 kodieren für Untereinheiten des Proteasoms, welches für die Prozessierung zahlreicher endogener Antigene verantwortlich ist (Brown et al., 1991; Glynne et al., 1991; Ortiz-Navarette et al, 1991, Martinez & Monaco, 1991; Kelly et al, 1991b).
- Die Genprodukte TAP1 und TAP2 konstituieren einen Transporter für Peptide in der ER-Membran, der homolog zu der ABC-Transporter-Superfamilie ist (ABC = ATP binding cassette) (Trowsdale et al, 1990; Monaco et al., 1990; Spies & DeMars, 1991). TAP-Heterodimere transportieren zytosolisch generierte Peptide ins ER, wo die Beladung der MHC Klasse I-Moleküle erfolgt.

Weitere Gene, die in der Klasse II-Region identifiziert wurden, kodieren für Kollagen (Typ 11A2) und für Proteine mit bislang unbekannter Funktion (RING 1, RING 2, RING 3, RING 9, KE3, KE4 und KE5).

## 1.2.2 Der HLA-D Polymorphismus

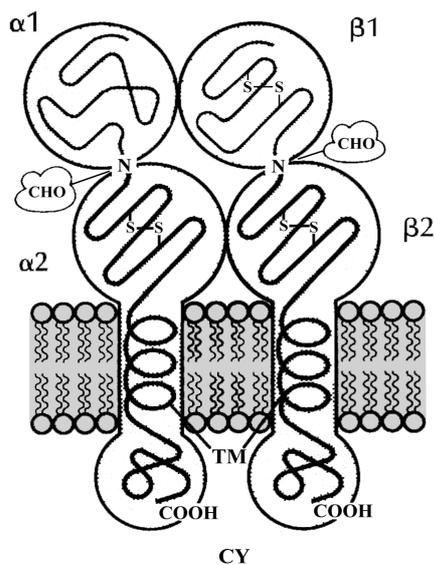
Eine der auffallendsten Eigenschaften des MHC ist die große Zahl an Allelen, die in natürlichen Populationen an einigen Loci und in einigen Spezies vorkommen. Zunächst wurde der HLA Klasse II-Polymorphismus serologisch, dann zellulär, mittels allel-spezifischen restringierter T-Lymphozyten, analysiert. In jüngster Zeit wurden die Untersuchungen der individuellen Vielfalt der HLA-Gene mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und DNA-Sequenzierung entscheidend vorangetrieben. Letztere ermöglicht es derzeit 239 Allele für den DR $\beta$ -Locus, 80 Allele für DP $\beta$  und 35 Allele für DP $\beta$  zu unterscheiden. Einen mittleren Grad des Polymorphismus zeigen die Loci DQ $\alpha$  (20 Allele) sowie DP $\alpha$  (12 Allele). Hingegen ist der DR $\alpha$  Locus monomorph (Janeway & Travers, 1998). Die Allelunterschiede eines Isotyps konzentrieren sich bemerkenswerterweise auf die sogenannten „diversity regions“, die fast ausschließlich in der  $\alpha_1$ - und der  $\beta_1$ -Domäne der Genprodukte liegen.

Ein besonderer Dimorphismus ist für die Position 86 der DR $\beta$ -Kette gegeben: Während etwa die Hälfte aller DR-Allele die Aminosäure Glycin an dieser Position tragen, findet sich bei den anderen Allelen die Aminosäure Valin. Die Seitenkette der Aminosäure an Position 86 beeinflusst die lokale Konformation der Bindungsgrube, und der Gly/Val-Dimorphismus wirkt sich unmittelbar auf die Peptidbindung, d.h. auf das bindende Peptidrepertoire aus (Ong et al., 1991; Busch et al., 1991).

## 1.3 MHC Klasse II-Antigene

### 1.3.1 Struktur der klassischen MHC Klasse II-Antigene

MHC Klasse II-Moleküle sind Heterodimere, deren Untereinheiten im MHC codiert sind. Die  $\alpha$ -Untereinheit hat ein ungefähres Molekulargewicht von 33-35 kD, die  $\beta$ -Untereinheit von 25-30 kD (Kaufman et al., 1984). Beides sind integrale Transmembran-Glykoproteine und bestehen aus je einer N-terminalen, extrazytoplasmatischen Region, die sich in 2 Domänen ( $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  bzw.  $\beta_1$  und  $\beta_2$ , je 90-100 Aminosäuren) gliedert, je einer Transmembran-Domäne (20-25 Aminosäuren) und je einer kurzen, zytosolischen Domäne (12-15 Aminosäuren). Die membranproximale Domänen ( $\alpha_2$  und  $\beta_2$ ) enthalten eine interne Disulfidbrücke und weisen sämtliche Charakteristika einer  $\beta$ -Faltblatt-Immunglobulin-Supersekundärstruktur auf. Die membrandistalen Domänen ( $\alpha_1$  und  $\beta_1$ ) assoziieren und bilden dabei die Peptid-Bindungsfurche. Diese Struktur ähnelt der Peptid-Bindungsfurche der MHC Klasse I-Moleküle: Auf Grund von Sequenzvergleichen mit der Röntgenstruktur der  $\alpha_1\beta_1$ -Domäne von MHC Klasse I-Molekülen wurde zunächst eine Struktur vorhergesagt, die dann weitestgehend durch die Röntgenstrukturanalyse von HLA-DR1 bestätigt werden konnte (Brown et al., 1993; Stern et al., 1994). Die Peptidbindungsfurche der klassischen MHC Klasse II-Moleküle bildet dabei



**Abb. 1.2: Domänengliederung des MHC Klasse II-Moleküls**

CHO = Kohlenhydratseitenketten; CY = zytoplasmatische Region; TM = Transmembranregion; griechische Buchstaben entsprechen den Domänen der extrazellulären Region

aus J. Klein, 1991. Immunologie.

eine Wannenform aus, der Boden besteht aus 8 Strängen antiparalleler  $\beta$ -Faltblätter und wird seitlich durch 2 antiparallele,  $\alpha$ -helikale Regionen begrenzt (Abb. 1.3 A). Auffällig ist die Tatsache, daß der Polymorphismus sich in der Regel auf 3 Regionen konzentriert, die alle am Aufbau der Peptid-Bindungsfurche beteiligt sind.

### 1.3.2 Interaktion von Peptiden mit MHC Klasse II-Antigenen

Peptide, die an MHC Klasse II-Moleküle binden, sind normalerweise 13 bis 24 Aminosäuren lang (Rudensky et al., 1991; Kropshofer et al., 1992; Chicz et al., 1992; Chicz et al., 1993) und damit erheblich länger als diejenigen, die an MHC Klasse I binden. Dies ist möglich, da der Abstand der seitlichen  $\alpha$ -Helices groß genug ist, so daß sie eine „offene“ Bindungsfurche schaffen. Daher können MHC Klasse II-gebundene Peptide über die Enden der Bindungsfurche hinausragen, wie die Röntgenstruktur des MHC Klasse II-Moleküls (Stern et al., 1994) bestätigte. Die Bindung des Peptids an das MHC Klasse II-Molekül wird dabei durch zwei verschiedene Arten von Wechselwirkungen vermittelt:

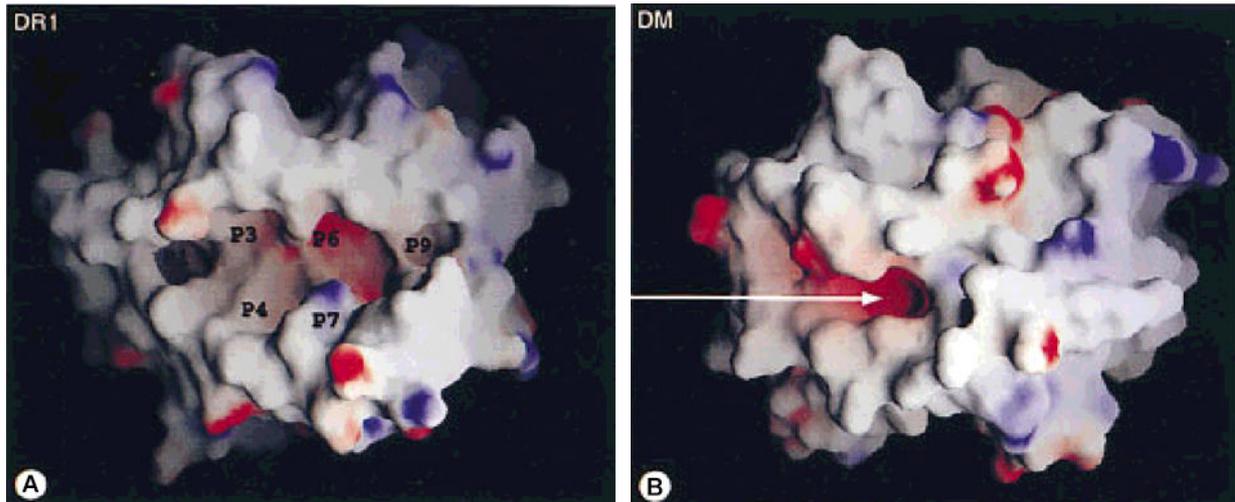
- Zwischen den Seitenkette der Bindungsfurche und dem Rückgrat des Peptids sind Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet, die das Peptid über die gesamte Länge fixieren. Dadurch bleibt es in gestreckter Konformation, ähnlich der Typ II Polyprolin-Helix, und in gleichmäßigem Abstand zum  $\beta$ -Faltblatt der Peptidbindungsfurche (Stern et al., 1994). Ein Großteil der Wasserstoffbrückenbindungen sind bei allen DR-Allelen konserviert und daher wahrscheinlich Bestandteil aller DR-Peptid-Interaktionen.
- Die Peptidseitenketten interagieren über (hydrophobe) Wechselwirkungen mit allelspezifischen Taschen in der Bindungsfurche, die aus zahlreichen polymorphen Positionen bestehen (Abb. 1.3).

### 1.3.3 SDS-Stabilität der HLA Klasse II-Antigene

$\alpha\beta$ -Heterodimere, welche ein antigenisches oder ein Selbstpeptid gebunden haben, können eine außergewöhnlich hohe SDS-Stabilität erlangen, die mittels SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann (Germain & Hendrix, 1991). Selbst unter reduzierenden Bedingungen zerfallen diese Komplexe nicht in ihre Monomere, sondern laufen als sogenannte „compact“-Form mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kD; andere  $\alpha\beta$ :Peptid-Komplexe sind hingegen SDS-instabil (Nelson & Unanue, 1993; Hedley et al., 1994). Von dieser Tatsache wird in vielen Veröffentlichungen Gebrauch gemacht: die SDS-Stabilität dient gewissermaßen als Indikator für Beladung. Allerdings ist weder der Mechanismus bekannt, wie SDS unbeladene  $\alpha\beta$ -Dimere instabilisiert, noch existieren systematische Untersuchungen, welche Antigene mit HLA-DR beispielsweise SDS-stabile Dimere bildet. Aus kinetischen Untersuchungen ist weiterhin bekannt, daß es sich bei der Bindung von Peptid an das  $\alpha\beta$ -Dimer um keine einstufige Reaktion handelt (Sadegh-Nasseri & Germain, 1994; Kropshofer et al., 1995), folglich existieren mindestens zwei Bindungsstadien. Bisher gibt es keine Untersuchungen, die Hinweise liefern, ab welchem Stadium die SDS-Stabilität erreicht wird. Gesichert ist dagegen der Befund, daß keine Korrelation zwischen der SDS-Stabilität und der Affinität eines Peptids zu dem MHC Klasse II-Molekül besteht (Verreck et al., 1996). Diese Hintergründe sollte man bei der Verwendung des Kriteriums „SDS-Stabilität“ berücksichtigen.

### 1.3.4 Struktur von HLA-DM

Die Struktur des nicht-klassischen MHC Klasse II-Moleküls HLA-DM entspricht weitgehend derjenigen der klassischen MHC II-Moleküle, wie dies auf Grund der Sequenzhomologie erwartet wird. Sowohl die Domänenanordnung als auch die generelle Faltung von DM sind den klassischen sehr ähnlich (Busch et al., 1998). Das Modell der Röntgenstrukturanalyse (Mosyak et al., 1998) zeigt jedoch einige interessante Unterschiede: DM enthält zwei neue Disulfidbrücken ( $\alpha$ 24-79 und  $\beta$ 25-35), die sich in der Region befinden, die der Peptid-Bindungsfurche von DR homolog ist. Auch sind keine der konservierten Aminosäuren, die sonst mit dem Peptidrückgrat interagieren, bei DM konserviert. Im Gegensatz zu DR konnte nur eine Tasche in der Furche identifiziert werden, in die die Seitenkette einer Aminosäure theoretisch binden könnte (Abb. 1.2 B). Schließlich berühren sich die  $\alpha$ -Helices im ersten und im letzten Drittel, anstatt eine Bindungsfurche zu bilden. Somit bestätigen diese Unterschiede die Unfähigkeit von DM, Peptide zu binden (Kropshofer et al., 1997).



**Abb. 1.3: Oberflächenmodelle von HLA-DR1 und HLA-DM**

- (A) Blick von oben auf die Peptidbindungsfurche von HLA-DR1 ohne Peptid. Die Taschen zwischen den  $\alpha$ -Helices, die die Peptidseitenketten binden, sind numeriert.
- (B) Blick von oben auf HLA-DM unter dem gleichen Sichtwinkel wie (A). Der Pfeil weist auf die zentrale Tasche hin. (aus Mosyak et al., 1998).

## 1.4 Antigenprozessierung und -präsentation

### 1.4.1 Der klassische Antigenpräsentationsweg

#### 1.4.1.1 Biosynthese und intrazellulärer Transport von MHC Klasse II-Molekülen

MHC Klasse II-Moleküle werden als  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette in das raue ER insertiert und assoziieren dort mit einem weiteren Protein, der invarianten Kette (Ii). Bei der humanen Ii handelt es sich um ein hochkonserviertes, monomorphes, 33 kD bzw. 35 kD schweres Glykoprotein, das zu den Typ II-Membranproteinen zählt (Claesson-Welsh et al., 1985). Die Differenz von 2 kD resultiert aus einer alternativen Initiationsstelle: die 35 kD Form besitzt 16 zusätzliche Aminosäuren am Aminoterminus. Daneben existieren beim Menschen noch zusätzliche „Splicing“-Varianten mit 41 bzw. 43 kD (Strubin et al., 1986). Sämtliche Ii-Isoformen enthalten in ihrer luminalen Region eine Trimerisierungsdomäne und kommen daher im ER als nichtkovalentes Homotrimer vor (Marks et al., 1990). Unter Vermittlung des Chaperons Calnexin (Anderson & Cresswell, 1994) bildet das Ii-Trimer (Ii<sub>3</sub>) mit den neusynthetisierten Klasse II  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten einem nonameren Komplex ( $\alpha\beta Ii$ )<sub>3</sub> (Roche et al., 1991). Da die Ii zudem eine zytoplasmatische Signalsequenz trägt, wird der nonamere Komplex über den Golgi-Apparat in endosomal-lysosomale Kompartimente dirigiert (Lotteau et al., 1990, Bakke & Dobberstein, 1990, Pieters et al., 1993).

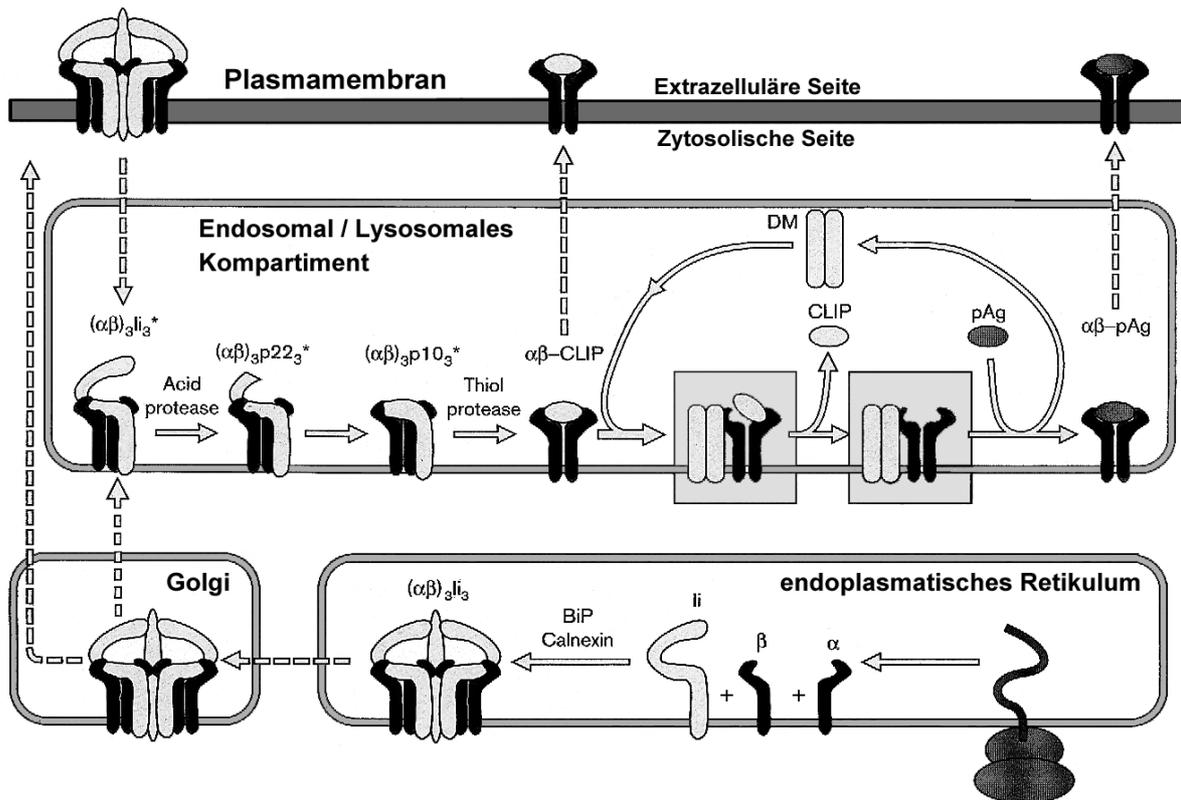
In Abwesenheit der Ii dimerisieren die Klasse II  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten nur partiell, vielmehr bilden sie Homoaggregate im ER und assoziieren mit dem IgG-schwere Kette-bindenden Protein (BiP) (Sant et al., 1991) sowie mit den Hitzeschockproteinen grp94 und p72 (Schaiff et al., 1992). Untersuchungen an B-Zellen von Ii-negativen Mäusen (Viville et al., 1993, Bikoff et al., 1993) zeigten, daß in Abwesenheit von Ii die MHC Klasse II-abhängige Antigenpräsentation erheblich eingeschränkt ist:  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten dimerisieren nur noch partiell, die  $\alpha\beta$ -Dimere werden nur sehr ineffizient transportiert und die wenigen  $\alpha\beta$ -Dimere, die die Zelloberfläche erreichen, besitzen zudem auch nur eine verminderte Stabilität.

Neben der Sortierfunktion besteht eine wichtige Aufgabe der Ii darin, eine Beladung der MHC Klasse II-Moleküle im ER oder im Golgi-Apparat zu verhindern, aber sie in endosomal-lysosomalen Kompartimenten zu gestatten. Dieser temporäre Schutz resultiert aus dem Zusammenspiel der Invarianten Kette und den unterschiedlichen proteolytischen Aktivitäten in verschiedenen Kompartimenten: Im ER und im Golgi-Komplex wird die Beladung von  $\alpha\beta$ -Dimeren mit Peptiden (Roche & Cresswell, 1990; Teyton et al., 1990) oder Polypeptiden (Busch et al., 1996) zunächst durch die Ii verhindert. In den post-Golgi-Kompartimenten wird dann die luminale Domäne der Ii durch endosomale Proteasen schrittweise abgebaut (Blum & Cresswell, 1988), wodurch die Beladung der MHC Klasse II-Moleküle möglich wird (Roche & Cresswell, 1991).

Die Art und Weise, mit der die Ii an MHC Klasse II-Moleküle bindet, ist sehr komplex. Zunächst ist angenommen worden, daß die Bindung nur über die Peptidbindungsfurche erfolgt. Mehrere Arbeiten hatten gezeigt, daß ein Teilsegment der Ii, CLIP (class II associated invariant chain peptides), die Hauptkontaktregion mit MHC Klasse II darstellt (Freisewinkel et al., 1993; Romagnoli et al., 1994; Bijlmakers et al., 1994). CLIP wurde zudem als rudimentäres Ii-Fragment gefunden, das nach dem proteolytischen Abbau mit MHC Klasse II-Molekülen assoziiert bleibt (Xu et al., 1994; Avva & Cresswell, 1994). In Übereinstimmung konnten CLIP-Peptide aus der Selbstpeptid-Fraktion von murinen (Rudensky et al., 1991; Hunt et al., 1992) sowie humanen MHC Klasse II-Allelen (Chicz et al., 1992; Chicz et al., 1993; Avva & Cresswell, 1994; Vogt et al., 1994) identifiziert werden. Weitere Evidenzen kamen von der Röntgenstrukturanalyse des DR3:CLIP-Kristalls. Diese bestätigte, daß das CLIP-Peptid mit dem Segment 87 bis 101 in die Peptidbindungsfurche von MHC Klasse II-Molekülen, ähnlich einem antigenischen Peptid, bindet, wobei die Seitenketten von Met<sup>91</sup> und Met<sup>99</sup> als P1- bzw. P9-Anker dienen. Außerdem erwies sich CLIP bei den bislang untersuchten Allelen als effizienter Inhibitor der Bindung nominaler Antigene (Riberdy et al., 1992; Sette et al., 1992; Chicz et al., 1992). Zusammen legen diese Ergebnisse nahe, daß CLIP wie ein antigenisches Peptid in der Bindungsfurche zu liegen kommt.

Erste Hinweise, daß die Bindungsweise von CLIP mit der von antigenischen Peptiden nicht absolut identisch ist, lieferten Untersuchungen von Urban et al. (1994): Bei endosomalem pH-Wert dissoziiert CLIP (Ii81-104) selektiv von HLA-DR Molekülen, während Selbstpeptide stabil gebunden bleiben. Erklärt werden konnte dieses Bindungsverhalten schließlich mit der funktionelle Dichotomie des CLIP-Peptids (Kropshofer et al., 1995a): Während der C-termi-

nale Teil (li 91-105) des CLIP-Peptids ein ähnliches Bindungsverhalten wie antigenisches Peptid aufweist, verhindert der N-terminale Teil (li 81-90) den Übergang vom instabilen Prä-Komplex zum stabilen Endkomplex. In einer zweiten Arbeit (Kropshofer et al., 1995b) wurde gezeigt, daß die N-terminale Region von CLIP transient an eine Domäne des MHC-Moleküls in der Nähe, aber außerhalb der Bindungsfurche binden kann. Dadurch scheint eine Konformationsänderung induziert zu werden, die die Dissoziation von CLIP begünstigt. Das Konzept der Dichotomie sowie deren Lokalisierung steht in Einklang mit den Daten der Röntgenstrukturanalyse des DR3:CLIP-Cokristalls (Ghosh et al., 1995): Aus der Elektronendichteverteilung ist ersichtlich, daß die Reste 87 bis 101 von CLIP in der Bindungsfurche liegen. Folglich müssen die Reste 81 bis 86 außerhalb der Bindungsfurche liegen. Daß die Struktur des Aminoterminus nicht aufgelöst werden konnte, weist stark auf eine flexible Struktur dieser Effektor-Region hin, insbesondere bei pH 4,5, dem pH-Wert der Kristallisation. Diese Untersuchungen waren auf CLIP beschränkt und bezogen sich nicht auf die ganze li: Tatsächlich zeigten weitere Arbeiten, daß auch die CLIP-flankierenden Sequenzen mit dem HLA-DR-Molekül interagieren (Vogt et al., 1995; Jensen et al., 1999). Sowohl die C- als auch



© 1996 Current Opinion in Immunology

**Abb. 1.4: Intrazellulärer Transport und Beladung von MHC Klasse II-Molekülen**

Im endoplasmatisches Retikulum assoziieren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Monomere mit der Invarianten Kette (li) und gelangen in den Golgi-Komplex. Von dort aus werden sie entweder direkt oder über die Plasmamembran in endosomal / lysosomale Kompartimente transportiert. Dort ist die li Angriffspunkt verschiedener Proteasen, die die li in mehreren Schritten zu CLIP abbauen. Dieses wird im Zuge der DM-vermittelten Beladung gegen ein antigenisches Fragment ausgetauscht. Nach der Beladung der MHC Klasse II-Moleküle erfolgt der Transport zur Plasmamembran. (aus: Busch & Mellins, 1996)

die N-terminale Region dieses Segments binden an die  $\alpha$ 1-Domäne. Dies könnte möglicherweise für die allel-abhängige, zum Teil sehr niedrige Affinität von CLIP kompensieren.

MHC Klasse II:li-Komplexe gelangen schließlich in endosomal-lysosomale Kompartimente, wo die li der Aktivität saurer Proteasen ausgesetzt ist. Diese greifen zunächst die luminale Domäne der li an und bauen sie stufenweise vom Carboxyterminus her ab. Eine Arbeit, die sich spezifischer Proteaseinhibitoren bediente, schlug die Beteiligung von Aspartatproteasen bei der anfänglichen Proteolyse der li vor (Maric et al., 1994). Als Zwischenprodukt entstehen zwei verschiedene Abbaustufen, dabei handelt es sich um das Leupeptin-induzierte Peptid (LIP oder p21) und das kleine Leupeptin-induzierte Peptid (SLIP oder p12). Weitere Degradation führt schließlich zu den bereits erwähnten CLIP-Fragmenten, die das Endprodukt des proteolytischen Abbaus darstellen. Bei der Generierung von CLIP aus dem SLIP-Polypeptid spielt die Cystein-Protease Cathepsin S eine essentielle Rolle: Wird die Aktivität dieser Protease in B-Zellen durch einen spezifischen Inhibitor blockiert, kann die li nicht mehr ganz abgebaut werden und führt zu einer Akkumulierung von SLIP (Riese et al., 1996). Dieser Befund wird von Cathepsin S-negativen Mäusen gestützt, die einen vergleichbaren Phänotyp zeigen (Shi et al., 1999; Nakagawa et al., 1999).

#### 1.4.1.2 Die Antigenaufnahme und -prozessierung

Peptide, die von MHC Klasse II präsentiert werden, stammen meist von Antigenen aus endozytischen Vesikeln. Diese können auf zwei Wegen in diese Kompartimente gelangt sein: Einige Bakterien (z.B. *Mycobacterium tuberculosis* oder *Mycobacterium leprae*) dringen in Makrophagen ein, wachsen in intrazellulären Vesikeln und sind daher von vornherein in den besagten Kompartimenten präsent. Andere Bakterien (z.B. *Clostridium tetani* oder *Staphylococcus aureus*), die sich normalerweise außerhalb von Zellen vermehren, sezernieren Toxine und andere Proteine. Zellen können diese und bakterielle Abbauprodukte durch Endozytose aufnehmen, und so gelangen Antigene in die endozytischen Kompartimente. Bei dem Endozytosevorgang benutzen antigenpräsentierende Zellen verschiedene Mechanismen: Rezeptor-vermittelte Endozytose, Phagozytose und Makropinozytose tragen alle zur Antigenaufnahme bei.

Der Rezeptor-vermittelten Endozytose bedienen sich sowohl B-Zellen, dendritische Zellen als auch Makrophagen, indem sie spezielle Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimieren (Lanzavecchia, 1990; Watts, 1997). Bei B-Zellen handelt es sich dabei um den B-Zell-Rezeptor (BCR), er erlaubt eine effiziente Präsentation auch bei sehr niedrigen Antigenkonzentrationen: Antigen-spezifische B-Zellen benötigen zur Aktivierung von T-Zellen eine 1000 bis 10000-fach niedrigere Antigenkonzentration als unspezifische B-Zellen, die das entsprechende Antigen mittels Mikropinozytose aufgenommen haben (Rock et al., 1984; Lanzavecchia, 1985). Allerdings scheint die Rezeptor-vermittelte Aufnahme alleine für eine effiziente Antigenpräsentation nicht auszureichen, da die Generierung von T-Zellepitopen auch von einem spezifischen Transportprozeß nach der Internalisierung abhängt (Mitchel et al., 1995).

Makrophagen und dendritische Zellen bedienen sich dagegen mehrerer Arten von Fc-Rezeptoren (Manca et al., 1991) und verschiedener Mannoserezeptoren (Sallusto et al., 1995; Jiang et al., 1995), die die Aufnahme von Immunkomplexen bzw. von mannosylierten Antigenen erleichtern. Im Gegensatz zum BCR ist die Wechselwirkung des Mannoserezeptors mit seinem Liganden schon bei schwach saurem pH labil. Diese Tatsache ermöglicht einen Kreislauf des Mannoserezeptors, bei dem Antigen über den Rezeptor aufgenommen wird und zu Endosomen transportiert wird, wo sich das Antigen vom Rezeptor löst. Schließlich wird der leere Rezeptor zur Plasmamembran zurückgebracht (Goldstein et al., 1985).

Neben der Rezeptor-vermittelten Endozytose bedienen sich vor allem Makrophagen und dendritische Zellen auch unspezifischer Aufnahmemechanismen. So können Makrophagen Antigene auch über Phagozytose aufnehmen. Bislang war man der Ansicht, daß das Phagosom bei diesem Vorgang mit bereits existierenden Lysosomen fusioniert und sich dabei ein Phagolysosom bildet. Neuere Arbeiten haben das Bild präzisiert und schlagen ein zweischrittiges Modell vor (Beron et al., 1995): Demnach unterliegen die neuen Phagosomen zunächst fortschreitenden Veränderungen, wobei sie endosomale Leitproteine, wie rab-5 oder Mannosephosphatrezeptor, erst erhalten und dann wieder verlieren, um schließlich mit Lysosomen zu fusionieren (Desjardins et al., 1994). In einem zweiten Schritt wird den reifen Phagolysosomen der Inhalt von weiteren Lysosomen zugeführt, so daß immer genügend Enzyme für den vollständigen Abbau des phagozytierten Materials vorhanden sind (Oh et al., 1996). Ob die prozessierten Proteine dann in Klasse II-positive Kompartimente transportiert werden, oder ob MHC Klasse II den Phagolysosomen zugeführt werden, ist noch nicht geklärt (Harding, 1995).

Unreife dendritische Zellen nehmen Antigene überwiegend mittels konstitutiver Makropinozytose auf (Sallusto et al., 1995), daneben haben sie auch die Möglichkeit zur Phagozytose (Reis e Sousa et al., 1993; Matsuno et al., 1996). Bei der Makropinozytose werden pinozytische Vesikel gebildet, die im Vergleich zu Mikropinosomen um den Faktor 10 bis 30 ( $\approx 2 \mu\text{m}$ ) größer sind, auch ist dieser endozytische Vorgang Clathrin-unabhängig. Diese endozytischen Vorgänge beschränken sich allerdings auf das unreife Differenzierungsstadium. In dieser Phase internalisiert die Zelle große Mengen an Antigen, die Präsentation verläuft auf niedrigem Niveau, da ein Großteil der MHC II-Moleküle in intrazellulären Kompartimenten akkumuliert (Cella et al., 1997; Pierre et al., 1997). In Zellkultur konnte eine Reifung durch TNF- $\alpha$  und LPS induziert werden. Als Folge wurde die Rezeptor-vermittelte Endozytose und die Makropinozytose irreversibel reduziert (Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Sallusto et al., 1995), gleichzeitig wurden die intrazellulären MHC Klasse II-Moleküle zur Zelloberfläche transportiert. Damit schaltet die dendritische Zelle während der Reifung von der Antigenaufnahme auf die Antigenpräsentation um (Cella et al., 1997; Pierre et al., 1997).

Nach der Internalisierung der Antigene besteht der nächste wichtige Schritt in deren Prozessierung zu Peptidfragmenten. Die Identifizierung der notwendigen Proteasen gestaltet sich sehr schwierig, da bei unterschiedlichen Antigenen verschiedene Proteasen beteiligt sind. Das derzeitige Wissen basiert zum einen auf mehr (oder minder) spezifischen Proteaseinhi-

bitoren und zum anderen auf Versuchen, die Antigenprozessierung *in vitro* mit isolierten Proteasen zu rekonstruieren.

Die Interpretation der Inhibitoraten wird durch drei Dinge erschwert. Erstens weisen die Proteaseinhibitoren in der Regel ein recht breites Wirkspektrum auf und können ohnehin nur an bereits bekannten Proteasen getestet werden. Zweitens sind Proteasen nicht nur für die Generierung von antigenischen Peptiden wichtig, sie können auch Epitope zerstören. So ist gezeigt worden, daß die Inhibierung von Cysteinproteasen die Präsentation bestimmter Epitope durch B-Zellen verstärken kann (Vidard et al., 1991; Rodriguez & Diment, 1995). Drittens werden Proteasen auch für den Verdau der Ii und somit generell für die Antigenpräsentation benötigt. Trotz dieser Schwierigkeiten konnte die Prozessierung immer wieder einer Gruppe von endosomal/lysosomalen Proteasen, den Cathepsinen, zugeschrieben werden (Takahashi et al., 1989; Shaw & Chain, 1989; Diment, 1990; Vidard et al., 1991). Dabei handelt es sich um die Aspartatproteasen Cathepsin D und E sowie die Cysteinproteasen Cathepsin B, L und S. Sämtliche dieser Cathepsine sind Endopeptidasen, nur Cathepsin B weist sowohl eine Endo- als auch eine Exopeptidaseaktivität auf. Gemäß ihrer endosomal/lysosomalen Lokalisation funktionieren diese Enzyme bei saurem pH. Bei den Aspartatproteasen bewegt sich das pH-Optimum zwischen 3 und 4, die Cysteinproteasen bevorzugen nicht ganz so saure Bedingungen (pH 5-6) (Kirschke & Barrett, 1987). Eine Ausnahme stellt Cathepsin S dar: während die Aspartat- und die anderen Cysteinproteasen bei neutralem pH fast inaktiv sind, arbeitet Cathepsin S auch noch bei pH 8. Mit Hilfe der besagten Cathepsine konnte die Prozessierung von mehreren Antigenen zu T-Zellepitopen *in vitro* rekonstruiert werden (van Noort et al., 1991; Rodriguez & Diment, 1992; van Noort & Jacobs, 1994; Riese et al., 1996; Hewitt et al., 1997).

Neben der Proteolyse ist auch die Reduktion von Disulfidbrücken für die Prozessierung von Antigenen erforderlich (Collins et al., 1991; Jensen, 1991). Dies ist nicht weiter überraschend, da viele T-Zellepitope Cysteinreste enthalten, die im nativen Protein über eine Disulfidbindung verbrückt sind. Außerdem trägt die Reduktion zur Entfaltung des Antigens bei, so daß möglicherweise erst dadurch bestimmte Schnittstellen in einem Antigen für Proteasen zugänglich werden. Geeignete reduzierende Bedingungen wurden in Lysosomen nachgewiesen (Collins et al., 1991). Ob dies auch für andere Organellen zutrifft, ist bislang noch unklar.

Zusammen zeichnen die Ergebnisse folgendes Bild: Antigene werden je nach Zelltyp durch unterschiedliche Mechanismen von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und in endosomale, dann in lysosomale Kompartimente transportiert. Dort werden die Antigene unter reduzierenden Bedingungen entfaltet und kommen dort mit Proteasen in Kontakt. In einem mehrschrittigen Prozeß werden die Antigene gespalten, wobei in der Regel mehr als eine Protease beteiligt ist. Dabei entstehen als Resultat Peptide, die in Abhängigkeit ihrer Sequenz an MHC Klasse II-Moleküle binden können.

### 1.4.1.3 Die Antigenbeladung

MHC Klasse II-Moleküle werden im Regelfall in einem sauren, post-Golgi-Kompartiment mit proteolytischer Aktivität beladen (Germain & Hendrix, 1991). Der Nachweis wurde zunächst über lysosomotrope Agentien, die zur Neutralisierung des pH-Werts saurer Kompartimente führen, indirekt nachgewiesen. Bei Zellen, die z.B. mit Chloroquin behandelt wurden, wird die MHC II-abhängige Antigenpräsentation inhibiert (Ziegler & Unanue, 1982). Jedoch verhindern lysosomotrope Agentien auch den Abbau der Ii (Pieters et al., 1991) und den Transport von MHC II-Molekülen zur Plasmamembran (Neefjes & Ploegh, 1992). Ein anderer Nachweis gelang mit Hilfe der Pulse-Chase-Markierung, die indirekt zeigte, daß MHC II-Moleküle erst in einem endozytischen Kompartiment mit Peptiden beladen werden, respektive in die SDS-stabile Form übergehen (Germain & Hendrix, 1991).

Zur selben Zeit leiteten Peters et al. (1991) aus einer detaillierten immunzytochemischen Analyse eines humanen B-Zelllymphoms die Existenz einer Spezialisierung im endozytischen Weg ab. Sie fanden, daß die MHC Klasse II-Moleküle nicht über alle endosomalen Kompartimente gleich verteilt waren, sondern sich in einer bestimmten Population konzentrierten, die sie MIIC (MHC class II compartments) nannten. Diese Vesikel hatten einen Durchmesser von 200 bis 400 nm und erinnerten morphologisch an multivesikuläre Lysosomen. Tatsächlich konnten lysosomale Marker der Igp/lamp-Familie nachgewiesen werden; Invariante Kette, Transferrin und Mannose-6-phosphat-Rezeptoren waren dagegen abwesend. Dieses Kompartiment wurde später durch subzelluläre Fraktionierung charakterisiert, wobei die Autoren zu der Meinung gelangten, daß die Beladung von MHC Klasse II-Molekülen ausschließlich in diesem spezialisierten Beladungskompartiment abläuft (Amigorena et al., 1994; Tulp et al., 1994; West et al., 1994; Qui et al., 1994). Diese Meinung konnte allerdings nicht erhärtet werden. Vielmehr hat sich inzwischen die Ansicht durchgesetzt, daß Klasse II-Moleküle entlang des endozytischen Weges in verschiedenen Kompartimenten wie späten Endosomen, Prälysosomen und Lysosomen beladen werden.

Der erste Nachweis gelang Castellino und Germain (1995). Sie zeigten mit Hilfe einer verfeinerten Zellfraktionierungsmethode, daß ein großer Teil der Klasse II:Ii-Komplexe zunächst zu frühen Endosomen gebracht und von dort zu späten Endosomen und zu Prälysosomen transportiert wird. Während dieses Transportvorgangs wird die Invariante Kette in zunehmenden Maße abgebaut. Beladene MHC II-Moleküle wurden sowohl in späten Endosomen als auch in Prälysosomen detektiert. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß MHC Klasse II-Moleküle den ganzen endozytischen Weg durchlaufen können und in verschiedenen Kompartimenten unter unterschiedlichen Bedingungen beladen werden. In jedem Fall widersprechen die Daten der Meinung, daß die Beladung nur in einem einzigen Kompartiment, dem MIIC, stattfindet. Eine neuere Veröffentlichung, die sich wie die Arbeit von Peters et al. der Immunelektronenmikroskopie bediente, zeigte, daß es sich bei den MIIC nicht um ein spezialisiertes, endozytisches Kompartiment handelt, das charakteristisch für APCs ist. Vielmehr umfassen die MIIC eine heterogene Population von konventionellen endozytischen Vesikeln, zu denen späte Endosomen und Lysosomen gehören (Kleijmeer et al., 1997).

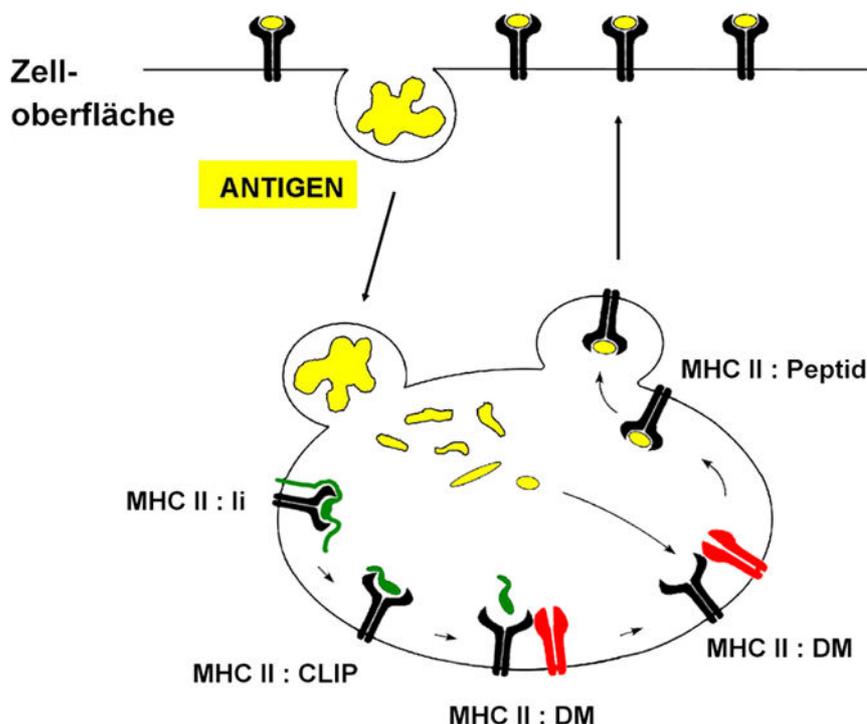
#### 1.4.1.4 Bedeutung der nicht-klassischen MHC Klasse II-Moleküle HLA-DM und HLA-DO für die Antigenbeladung

Zwei Beobachtungen wiesen darauf hin, daß die Aufnahme von Antigen und die endosomale Proteolyse der Ii für eine effiziente Antigenpräsentation nicht ausreicht. Die erste resultierte aus der kinetischen Analyse der Beladungsreaktion: unter *in vitro*-Bedingungen dauert die Beladung von Klasse II-Komplexen 24 bis 48 Stunden (Babbitt et al., 1985; Buus et al., 1986), während *in vivo* bereits nach 1 bis 2 Stunden beladene MHC Komplexe entdeckt werden (Neefjes & Ploegh, 1992). Der zweite Hinweis kam von mutierten Antigenpräsentierenden Zellen, die Mutationen oder Deletionen in der Klasse II-Region aufwiesen (Mellins et al., 1990; Mellins et al., 1991; Riberdy & Cresswell, 1992). Nach Transfektion mit Klasse II-Molekülen waren diese mutierten Zelllinien in der Lage, zwar peptidische Antigene, aber keine proteinogenen Antigene zu präsentieren. Umfangreiche Analysen ergaben, daß die Klasse II-Moleküle, die aus diesen Zellen isoliert worden waren, bestimmte, konformationsspezifische Epitope nicht besaßen (Riberdy & Cresswell, 1992), SDS-instabil waren (Mellins et al., 1990; Riberdy & Cresswell, 1992) und überwiegend mit Längenvarianten von CLIP assoziiert waren (Riberdy et al., 1992; Sette et al., 1992). Es stellte sich heraus, daß der Antigenpräsentationsdefekt die Gene HLA-DMA oder HLA-DMB betrifft (Morris et al., 1994; Fling et al., 1994; Denzin et al., 1994). Durch Transfektion der korrekten Gene in die mutierten Zellen wurde der Wildtyp-Phänotyp wiederhergestellt: Klasse II:CLIP-Komplexe wurden nur noch in geringer Menge detektiert und proteinogene Antigene konnten wieder präsentiert werden.

Bei HLA-DM handelt es sich um ein nicht-klassisches MHC Klasse II-Protein, das keine Peptide bindet und deshalb selbst nicht zur Antigenpräsentation befähigt ist. Auf diesen Umstand wiesen bereits Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von DM hin: Aufgrund von Oberflächenbiotinylierung, Immunelektronenmikroskopie und konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie kamen die Autoren zu dem Schluß, daß DM ausschließlich intrazellulär lokalisiert ist (Denzin et al., 1994; Sanderson et al., 1994; Karlsson et al., 1994): Der Hauptteil von DM akkumuliert in endozytischen Vesikeln, die die lysosomalen Marker Lamp-1 und CD 63 sowie MHC Klasse II enthielten. Diese qualitative Analyse wurde durch Arbeiten, die die Stöchiometrie von DM und DR in B-Zellen untersuchten, bestätigt. In lysosomalen Kompartimenten beträgt das Verhältnis ungefähr 1 : 5 (Kropshofer et al., 1997; Schafer et al., 1996), während es in Lysaten von ganzen Zellen bei etwa 1 : 20 liegt (Denzin & Cresswell, 1995; Schafer et al., 1996). Für den Transport in die endosomal-lysosomalen Kompartimente ist ein Tyrosinsortierungsmotiv verantwortlich, das sich in der zytoplasmatischen Region der DM $\beta$ -Kette befindet (Marks et al., 1995; Lindstedt et al., 1995). Allerdings kann die Sortierungsfunktion auch teilweise von der Transportsequenz der Ii übernommen werden. Nur die Mutation der Transportsequenz beider Proteine - DM und Ii - führt zu einem kompletten Rückgang der Beladung.

Die auffälligste Funktion von HLA-DM ist die Erhöhung der Dissoziationsrate von CLIP, wodurch die Beladung antigenischer Peptide beschleunigt wird (Sloan et al., 1995; Denzin & Cresswell, 1995; Sherman et al., 1995). Die höchste Aktivität weist DM zwischen pH 5,0 und pH 6,0 auf. Dies ist der typische pH-Bereich, den MHC Klasse II und DM-Moleküle in späten Endosomen und Lysosomen antreffen. Außerdem reichen substöchiometrische Mengen von DM aus, um den Beladungsprozeß zu beschleunigen und erinnert damit an einen Katalysator. Zwar gibt es bislang keine Hinweise, daß DM eine chemische Reaktion "katalysiert", also ein echtes Enzym ist, dennoch gehorcht der DM-vermittelte Beladungsprozeß den Regeln der Michalis-Menten-Kinetik, wobei DR:CLIP-Komplexe als Substrat dienen (Vogt et al., 1996). Der Prozeß beginnt mit der Bildung eines intermediären DR:DM-Komplexes. Die Assoziation der beiden Proteine führt zur Freisetzung von CLIP, während DM noch immer an DR gebunden ist. In Anwesenheit eines geeigneten Peptids wird DR mit diesem beladen und DM dissoziiert in Folge ab. Die Wechselzahl von DM ist recht niedrig: In Abhängigkeit des DR-Allels und des benutzten Peptids werden 3 bis 12 DR:CLIP-Komplexe pro Minute beladen (Vogt et al., 1996). Die errechnete Michaelis-Konstante  $K_M$  bewegt sich zwischen 0,5 und 1,2  $\mu\text{M}$ . Gemäß dieser Zahlen gehört DM in die Kategorie der Katalysatoren niedriger Kapazität mit hoher Substratspezifität.

Für die Katalyse ist die physikalische Interaktion unabdingbar. Erste Hinweise kamen von einer mutierten B-Zelllinie, die eine Punktmutation im DRA-Gen und dadurch eine zusätzliche Glykosylierungsstelle aufwies (Mellins et al., 1994). Diese Zelllinie hatte einen ähnlichen Phänotyp wie eine DM-negative Zelllinie, was auf eine sterische Hinderung zwischen den beiden Proteinen zurückgeführt wurde. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung gestützt, daß die *in vitro*-Beladung dieses mutierten DR-Moleküls nicht durch rekombinantes DM kataly-



**Abb. 1.5: Modell zur DM-vermittelten MHC Klasse II-Beladung**

In endosomal / lysosomalen Kompartimenten wird die Dissoziation von CLIP durch DM erheblich beschleunigt, dabei entsteht ein MHC Klasse II:DM-Komplex. Anschließend kann dieser durch ein antigenisches Peptid beladen werden, in Folge dissoziiert DM ab. Schließlich wandert das beladene Klasse II-Molekül zur Zelloberfläche.

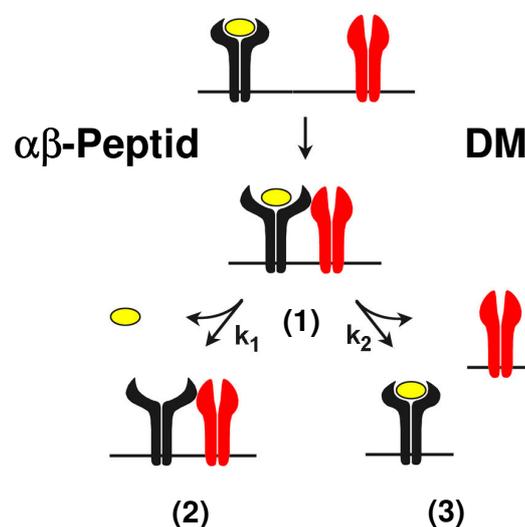
lysiert wurde (Sloan et al., 1995). Der Nachweis wurde schließlich über Immunpräzipitation erbracht: DR:DM-Komplexe konnten nur aus Zellsaten normaler B-Zellen kopräzipitiert werden, nicht aber aus Lysaten dieser mutierten Zelllinie (Sanderson et al., 1996).

HLA-DM erhöht jedoch nicht nur die Dissoziationsrate von CLIP, sondern kann auch die anderer Peptide. *In vitro*-Untersuchungen mit verschiedenen Peptiden bzw. mit Peptiden, deren Ankeraminosäuren substituiert worden waren, zeigten eine starke Korrelation zwischen der Dissoziationsgeschwindigkeit, also der kinetischen Stabilität, und der Anfälligkeit eines DM-vermittelten Peptidaustauschs (Kropshofer et al., 1996; Weber et al., 1996): Je höher die intrinsische Dissoziationsrate eines Peptids ist, desto leichter wird es ausgetauscht. Faktoren, die die Stabilität eines Peptids beeinflussen, sind in erster Linie seine Ankeraminosäuren, aber auch die Peptidlänge kann dazu beitragen (Kropshofer et al., 1996). Gleichzeitig wird die Bindung stabil-bindender Peptide durch DM nicht beeinflusst. Dies führt in einer Situation, in der mehrere Peptide miteinander um die Bindung an Klasse II-Moleküle konkurrieren, zu einem Selektionsprozeß („Editing“) durch DM. Ein *in vitro*-Test, bei dem die Bindung mehrerer Peptide an MHC Klasse II in An- und in Abwesenheit von DM verglichen wird, veranschaulicht die Funktion von DM als Peptid-Editor: Während die Peptidliganden ohne DM mehr oder minder gut an Klasse II binden, kommt es in Anwesenheit von DM zur Selektion bestimmter Peptide und zur Entfernung anderer (Kropshofer et al., 1997b).

Das Wissen um die Funktion als Peptid-Editor wurde in einem Modell, das einen kinetischen Korrekturmechanismus beschreibt, zusammengefaßt (Kropshofer et al., 1996; Kropshofer et al., 1997b): Demnach interagiert DM zunächst mit jedem Klasse II:Peptid-Komplex; wenn das Klasse II-Molekül ein Peptid niedriger Stabilität gebunden hat, dissoziiert der Ligand eher als DM. In diesem Fall ist ein leerer DR:DM-Komplex das Resultat. Wenn dagegen das Klasse II-Molekül ein stabiles Peptid gebunden hat, tritt der umgekehrte Fall ein und DM dissoziiert ab. Es ist wahrscheinlich, daß durch die Assoziation von DM eine offenere Konformation des Klasse II-Moleküls stabilisiert wird. Eine kleine strukturelle Änderung der Bindungsfurche könnte zu einer beschleunigten Dissoziation von instabilen Peptiden führen, während stabile

**Abb. 1.6: Der Peptid-Editor HLA-DM**

Nach der Modellvorstellung wird durch die Assoziation von DM an MHC Klasse II eine offenere Konformation transient stabilisiert (1). Im Fall eines instabil gebundenen Peptids dissoziiert dieses schneller als DM. Dabei entsteht ein leerer Klasse II:DM-Komplex (2), der neu beladen werden kann. Ist dagegen ein stabiles Peptid gebunden, dissoziiert DM schneller und der Klasse II:Peptid-Komplex bleibt erhalten (3).



Liganden stark genug sind, sich der Öffnung der Furche zu widersetzen. In dem letzten Fall wird DM dissoziieren, an das nächste Klasse II-Molekül binden und dieses der Stabilitätsprüfung unterziehen.

Als weitere Funktion kommt DM die Rolle eines molekularen Chaperons zu: Bei saurem pH haben leere MHC Klasse II-Dimere die Tendenz sich partiell zu entfalten, zu aggregieren und dabei ihre Peptidbindungskapazität zu verlieren (Stern & Wiley, 1992; Sadegh-Nasseri & Germain, 1992; Deveaux et al., 1995). Diese Inaktivierung wird von DM verhindert (Kropshofer et al., 1997; Denzin et al., 1996; Vogt & Kropshofer, 1999): Inkubation von DR:CLIP-Komplexen bei pH 5,0 führt zu einem zeitabhängigen Verlust der Bindungskapazität. Durch Zugabe stöchiometrischer Mengen DM kann dieser Verlust verhindert werden. Die Bedeutung dieser Funktion *in vivo* ergibt sich aus der Beobachtung, daß 30% des lysosomalen DM in Assoziation mit Klasse II-Molekülen vorkommt. Diese DR:DM-Komplexe waren leer, wie die massenspektrometrische Analyse zeigte, und funktionell, da sie effizient und schnell *in vitro* beladen werden konnten (Kropshofer et al., 1997).

Ein ebenfalls nicht-klassisches MHC Klasse II-Molekül ist HLA-DO, welches hauptsächlich in B-Zellen und in medulären Epithelzellen des Thymus exprimiert wird (Karlsson et al., 1991; Douek & Altmann, 1997). Die stabile Assoziation mit HLA-DM ist für seinen effizienten Transport in endosomale / lysosomale Kompartimente verantwortlich (Liljedahl et al., 1996). Aufgrund dieser starken Assoziation wurde spekuliert, daß DO ein Regulator der DM-abhängigen Beladung ist. Die Überexpression von DO führt in transfizierten Zellen tatsächlich zu einem Phänotyp, wie ihn DM-defiziente Zellen aufweisen: Die MHC-assoziierte CLIP-Expression auf der Oberfläche ist höher (Denzin et al., 1997; van Ham et al., 1997). Allerdings wird zur Zeit diskutiert, ob die Überexpression nicht zu einem artifiziellen Phänotyp führt: Bei DO-Knockout-Mäusen wird eine Inhibition der DM-Aktivität nur bei relativ hohem pH beobachtet (Liljedahl et al., 1998) und eine Expression von DO im physiologische Mengen führt statt zu einer Erhöhung zu einem Rückgang der CLIP-Expression auf der Oberfläche (Kropshofer et al., 1998). Unstrittig dagegen ist die Funktion von DO als Ko-Chaperon, da bei niedrigem pH DM durch DO stabilisiert wird. Zudem ist die Stabilisierung von leeren DR-Molekülen durch DM:DO-Komplexe deutlich effizienter als durch DM-Moleküle allein (Kropshofer et al., 1998).

#### 1.4.1.5 Die Antigenpräsentation

Der genaue Mechanismus, wie MHC Klasse II-Moleküle nach der Beladung die Oberfläche erreichen, ist noch nicht geklärt. Ein retrograder Transportweg über die frühen Endosomen kann aber ausgeschlossen werden. Zellen, deren Endosomen auf chemischen Wege quervernetzt und damit funktionell unbrauchbar gemacht wurden, können exogene Antigene sehr wohl prozessieren und präsentieren, wenn sie das Antigen bereits aufgenommen hatten (Pond & Watts, 1997). Es existieren Hinweise, daß die beladenen Komplexe mit Hilfe saurer Vesikeln zur Oberfläche geschickt werden: Wubbolts et al. haben DR1, an dessen zytoso-

liches Ende GFP gekoppelt war, in einer Melanomzelllinie exprimiert (1996). So waren sie in der Lage, den Transport von DR mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zu verfolgen. Dabei konnten sie Klasse II-positive Vesikel beobachten, die sich von lysosomalen Kompartimenten in Richtung Oberfläche bewegten und die schließlich mit der Plasmamembran fusionierten. Dabei kreuzte der Weg dieser Vesikel keine frühen endosomalen Kompartimente. Offen bleibt die Frage, wie es die Zelle steuert, daß überwiegend beladene MHC II-Komplexe und nicht li-assoziierte Komplexe die Oberfläche erreichen. Auch könnten auf diesem Weg lysosomale Proteine, wie beispielsweise DM, die Oberfläche erreichen. Diese könnten jedoch durch ihre jeweiligen Internalisierungssignale via Endozytose schnell von der Plasmamembran entfernt werden.

### 1.4.2 Der alternative Antigenpräsentationsweg

Der klassische Präsentationsweg bedient sich neusynthetisierter Klasse II-Moleküle (Davidson et al., 1991). Diese können das ER aber nur im Komplex mit der li verlassen, folglich wird dieser Weg als li-abhängig charakterisiert. Erste Hinweise, daß neben dem klassischen Weg mindestens ein weiterer existieren muß, kamen von der Beobachtung, daß die Präsentation bestimmter Antigene auch in Abwesenheit der li möglich ist (Nadimi et al., 1991; Momburg et al., 1993). Erklärt wurde dieses Phänomen durch die Annahme eines alternativen Beladungsweges: Dieser sollte sich die Tatsache zunutze machen, daß Oberflächenproteine, wie z.B. MHC Klasse II, einem konstitutiven Recycling unterliegen, d.h. daß diese Proteine ständig in ein frühes bzw. „recycling“ Endosom internalisiert und anschließend zurück zur Plasmamembran transportiert werden (Harding & Unanue, 1989; Salamero et al., 1990; Reid & Watts, 1990; Reid & Watts, 1992). Dabei würde die Beladung der internalisierten MHC Klasse II-Moleküle durch die leicht sauren Bedingungen unterstützt, wie sie in den frühen Endosomen vorherrschen.

Weitere Hinweise, die für die Existenz eines zweiten Beladungsweges sprachen, kamen von einer Arbeit von Pinet et al. (1994). Diese Arbeit untersuchte die unterschiedlichen Anforderungen für die Präsentation an Hand zwei verschiedener Antigene aus dem Influenzavirus. Bei dem einen Antigen handelte es sich um das Influenzamatrixprotein (IM), dieses gehorcht den Anforderungen des klassischen Beladungsweges: Es wird in Anwesenheit der li deutlich besser präsentiert, ferner hängt seine Präsentation direkt sowohl von der Proteinbiosynthese als auch von der DM-Expression ab. Das zweite Epitop stammte aus dem Influenzavirus Hämagglutinin (HA) und folgt anderen Regeln: Im Gegensatz zum IM-Epitop wird das HA-Epitop auch in Abwesenheit der li präsentiert. Auch findet die Präsentation dieses Epitops noch nach der Inhibition der Proteinbiosynthese oder in Abwesenheit von DM statt, obgleich beide Eingriffe zu einem merklichen Rückgang der T-Zellantwort führen. Aus diesen Charakteristika des HA-Epitops schlossen die Autoren, daß wahrscheinlich reife MHC Klasse II-Moleküle, die im Zuge des Recyclings internalisiert werden, mit diesem Epitop beladen werden. Dieser Schluß wurde durch eine transfizierte Fibroblastenzelllinie verifiziert, die MHC Klasse II-Proteine ohne deren zytosolische Internalisierungsmotive exprimierte (Pinet et al.,

1995; Pinet & Long, 1998). Diese Deletion verhinderte die Internalisierung der MHC Klasse II-Moleküle, die als Folge nicht mehr am Recycling teilnehmen konnten. Bei den li-unabhängigen Epitopen, wie HA oder auch basisches Myelinprotein (MBP), führte dies tatsächlich zu einer deutlichen Abnahme der Präsentation. Auf die Präsentation li-abhängiger Epitope, wie Influenzamatixprotein, hatte dagegen diese Deletion keinen Einfluß, da der Transport neusynthetisierter Klasse II-Moleküle durch die Sortierungssequenz der li gesteuert wird.

Obwohl noch der direkte Beweis aussteht, sprechen zahlreiche indirekte Beweise dafür, daß im alternativen Weg die Klasse II-Moleküle beladen werden, während sie sich in den frühen Endosomen aufhalten. So erfolgt die Präsentation über den alternativen Weg im Vergleich zum klassischen Weg etwa fünfmal schneller (Bonnerot et al., 1995; Griffin et al., 1997), da das Antigen nicht in spät endosomale oder lysosomale Kompartimente internalisiert werden muß. Auch ist die Präsentation von der proteolytischen Prozessierung abhängig, wie die Verwendung von Proteaseinhibitoren demonstrierte (Pinet & Long, 1998).

Als weitere Frage steht offen, welche Population der auf der Oberfläche vorhandenen MHC Klasse II-Moleküle am alternativen Beladungsweg beteiligt ist. Neben Peptid oder CLIP beladenen MHC-Molekülen kommen auch Klasse II:li-Komplexe in Frage (Roche et al., 1993). Die Stabilität der MHC II:Peptid-Komplexe auf der Oberflächen gibt keinen eindeutigen Hinweis, da dieser Punkt in der Literatur kontrovers diskutiert wird: Lanzavecchia et al. zeigten (1992), daß Klasse II:Peptid-Komplexe, die mit exogenem Peptid beladen sind, auf der Zelloberfläche recht stabil sind. Ihre Halbwertszeit war mit der durchschnittlichen Halbwertszeit von MHC Klasse II identisch, was gegen ihre Beteiligung im alternativen Weg spricht. Später widersprach jedoch eine andere Arbeit diesem Befund und zeigte, daß in Abhängigkeit von der Sequenz die durchschnittliche Lebensdauer von dem jeweiligen Klasse II:Peptid-Komplex unter- oder überschritten werden konnte (Nelson et al., 1994). Die instabileren Komplexe könnten entweder durch Abbau oder durch einen Peptidaustausch von der Zelloberfläche entfernt worden sein. Dafür sprechen auch die Beobachtungen, daß die Präsentation eines exogenen Peptids durch einen Kompetitor reduziert wird, auch wenn der Kompetitor erst im nachhinein zugegeben wird (Adorini et al., 1989) und daß die Präsentation eines endogenen Epitops durch die Zugabe eines exogenen Peptids vermindert wird (Adorini et al., 1991).

Unklar ist auch der Einfluß von HLA-DM im alternativen Präsentationsweg. Diese Frage stand zwar bislang nicht im Vordergrund, da mehrere Arbeiten DM auf der Oberfläche nicht nachweisen konnten (Denzin et al., 1994; Karlsson et al., 1994; Sanderson et al., 1994). Außerdem fand die Beladung von Antigenen im alternativen Weg auch in Zelllinien statt, die kein DM enthielten (Pinet et al., 1995). Bei dem bislang einzigen Vergleich einer humanen, DM-positiven B-Zelllinie mit ihrer DM-negativen Schwesterzelllinie fällt jedoch auf, daß in Abwesenheit von DM die Präsentation von li-unabhängigen Epitopen zwar nicht zum Erliegen kommt, aber merklich reduziert ist (Pinet et al., 1994). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß DM auch im alternativen Weg an der Beladung beteiligt ist.

## 1.5 Zielsetzungen der Promotionsarbeit

Zu Beginn dieser Dissertation wurde von verschiedenen Gruppen gezeigt, daß die Beladung von MHC Klasse II-Molekülen in einem spezialisierten Beladungskompartiment stattfinden würde, das sich von konventionellen Organellen unterschied. Allerdings wichen die jeweiligen spezifischen Merkmale dieses Beladungskompartiments in den einzelnen Studien erheblich voneinander ab. Daher kamen Zweifel auf, ob es sich bei dem Beladungskompartiment tatsächlich nur um ein distinktes Kompartiment handelt. Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, in welchen Kompartimenten einer humanen, EBV-transformierten B-Zelllinie die Beladung von MHC Klasse II-Molekülen stattfindet.

Ebenfalls zu Beginn der Promotion wurde an Hand von *in vitro*-Daten nachgewiesen, daß das Protein HLA-DM sowohl die Beladung von MHC Klasse II-Molekülen katalysiert als auch instabile Peptide gegen stabilere auszutauscht. In der Zelle, wo viele verschiedene Peptide um die Bindung an ein MHC Klasse II-Molekül konkurrieren, sollte diese Austauschfunktion von HLA-DM zu einem Selektionsprozeß führen. Daraus ergab sich als weitere Aufgabengstellung, den Einfluß von HLA-DM auf das Peptidrepertoire näher zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde auch der Frage nachgegangen, wo HLA-DM auf subzellulärer Ebene vorkommt. Da das zytosolische Sortierungsmotiv von DM auch gleichzeitig als Internalisierungssignal fungiert, wurde die Plasmamembran und die unmittelbar kommunizierenden Recycling-Endosomen auf DM untersucht. Durch das Auffinden von DM auf der Plasmamembran ergaben sich folgende Fragen:

- Ist Oberflächen-DM an einer Beladung im alternativen Weg beteiligt?
- Kann Oberflächen-DM einen Peptid austausch vermitteln?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

|  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| Acetonitril, gradient grade (LiChrosolv <sup>®</sup> )   | E. Merck                            |
| Acrylamid/Bisacrylamid: rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30  | C. Roth GmbH + Co.                  |
| 6-Aminocaprinsäure   | Fluka                               |
| 7-Amino-4-methylcoumarin-3-essigsäure (AMCA)   | Lambda                              |
| Ammoniumperoxosulfat (APS)   | C. Roth GmbH + Co.                  |
| Bromphenolblau   | Boehringer Mannheim                 |
| 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)  | Sigma                               |
| Chymostatin  | Boehringer Mannheim                 |
| Cycloheximid   | Sigma                               |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)  | Sigma                               |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT)   | Boehringer Mannheim                 |
| Leupeptin  | Boehringer Mannheim                 |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)   | BioRad                              |
| (p-Nitrophenyl)-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid (= (p-Nitrophenyl)-<br>-2-acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid) | Sigma                               |
| Nonidet <sup>®</sup> P 40 (NP 40)  | Fluka                               |
| Pepstatin  | Boehringer Mannheim                 |
| Percoll <sup>®</sup>   | Pharmacia                           |
| Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)   | Boehringer Mannheim                 |
| Rinderserumalbumin (BSA)   | E. Merck                            |
| Saccharose, für die Dichtegradientenzentrifugation   | E. Merck                            |
| Sepharose, CNBr-aktiviert  | Pharmacia                           |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)   | C. Roth GmbH + Co.                  |
| Trifluoressigsäure (TFA), gradient grade (LiChrosolv <sup>®</sup> )  | E. Merck                            |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)  | Gibco BRL sowie Sigma               |
| N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin (TRICIN)   | C. Roth GmbH + Co.                  |
| Tween <sup>®</sup> 20 (=Polyoxyethylensorbitanmonolaureat)   | Merck-Schuchardt                    |
| Wasser, gradient grade (LiChrosolv <sup>®</sup> )  | E. Merck                            |
| Wasserstoffperoxid, 30%, p.a. (Perhydrol <sup>®</sup> )  | E. Merck                            |
| Wortmannin   | Sigma                               |
| Zwittergent <sup>®</sup> 3-12 (= N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-<br>-1-propansulfonat)                                   | Calbiochem <sup>®</sup> Corporation |

Sämtliche der hier nicht aufgeführten Standardchemikalien wurde von der Firma E. Merck, Darmstadt bezogen; Flüssigkeiten in der Reinheitsstufe „gradient grade“ (LiChrosolv<sup>®</sup>), Feststoffe in der Reinheitsstufe „p.a.“ (zur Analyse).

## 2.1.2 Peptide

|              |                                       |
|--------------|---------------------------------------|
| HA(307-319)  | P K Y V K Q N T L K L A T             |
| A2(103-117)  | V G S D W R F L R G Y H Q Y A         |
| SP3(2-16)    | I L E F R A M A Q F S R K T D         |
| Igκ(188-202) | K H K V Y A C E V T H Q G L S         |
| Col(260-274) | G I A G F K G E Q G P K G E H P G     |
| YRAM         | A A A Y R A M A T L A A A A           |
| MBP(87-99)   | V H F F K N I V T P R T P             |
| MBP(111-129) | L S R F S W G A E G Q R P G F G Y G G |
| ApoB100      | I S N Q L T L D S N T K Y F H K       |

Die Peptide wurden mittels Festphasensynthese nach der Fmoc/tBu-Strategie synthetisiert (Asharton & Sheppard, 1989). Die Peptide synthetisierte Dr. R. Pipkorn (DKFZ, Heidelberg). Alle Peptide wurden HPLC-gereinigt und mittels Massenspektrometrie kontrolliert.

Die spezifische Fluoreszenzmarkierung der synthetischen Peptide mit 7-Amino-4-methylcoumarin-3-essigsäure (AMCA) oder Biotin wurde im Labor von Dr. R. Pipkorn (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt. Dazu wurde AMCA bzw. Biotin wie eine Aminosäure über die freie Carboxyfunktion an die  $\delta$ -Aminogruppe des Seitenketten-geschützten und noch an das Harz gebundenen Peptids gebunden. Erst nach der Markierung erfolgt die Abspaltung des Peptids vom Harz mittels TFA.

## 2.1.3 Zelllinien

### 2.1.3.1 Hybridomzelllinien

- L243 Hybridom, das einen monoklonalen Antikörper (mAk) produziert, welcher HLA-DR  $\delta$  $\beta$ -Komplexe erkennt mit Ausnahme von DR $\delta$  $\beta$ :Ii-Komplexe (Lampson & Levy, 1980; Gorga et al., 1987).
- IB5 Hybridom, das einen mAk produziert, welcher ein zytosolisches Epitop auf der  $\delta$ -Kette von HLA-DR erkennt (Adams et al, 1983; G. Moldenhauer, persönliche Mitteilung).

DM.K8 Hybridom, das einen mAk produziert, welcher ein zytosolisches Epitop auf der  $\beta$ -Kette von HLA-DM erkennt (Vogt et al., 1996).

### 2.1.3.2 EBV-transformierte B-Zelllinien & Hybridzelllinien

Folgende EBV-transformierte B-Lymphoblastoid-Zelllinien (B-LCL) wurden für die vorliegenden Untersuchungen kultiviert:

|          |         |       |
|----------|---------|-------|
| WT-100:  | DR1Dw1  | (DR1) |
| Jesthom: | DR1Dw1  | (DR1) |
| Jutthom: | DR1Dw1  | (DR1) |
| COX:     | DR17Dw3 | (DR3) |

Weiterhin sind folgende T $\times$ B-Hybridzellen verwendet worden, die sich von Zelllinie T2 ableiten und stabil mit DR4 (DRA1\*0101/DRB1\*0401) und respektive DM transfiziert worden sind:

|            |        |       |
|------------|--------|-------|
| T2.DR4:    | DR4Dw4 | (DR4) |
| T2.DR4.DM: | DR4Dw4 | (DR4) |

Die Klasse II-Haplotypen sind nach der aktuellen Nomenklatur (WHO Nomenklatur, 1990) sowie in runden Klammern in der noch oft zitierten alten Nomenklatur (WHO Nomenklatur, 1968; Bodmer et al., 1984) angegeben.

### 2.1.4 Kulturmedium für die Zellkultur

Als Kulturmedium für alle Zelllinien wurde RPMI 1640-Medium (incl. HEPES und L-Gln) von der Firma Gibco verwendet. Das Pulvermedium wurde entsprechend den Angaben hergestellt, mit 5 M NaOH auf pH 7,3 - 7,4 eingestellt und sterilfiltriert. Das RPMI Medium ist bei 4 °C ca. 4 bis 6 Wochen haltbar.

Zur Hitzeinaktivierung von Komplement-Proteasen wurde das im Kühlschrank aufgetaute FCS (Gibco) 30 Minuten bei 56 °C inkubiert. Pro 1l wurde kurz vor Gebrauch 50 bzw. 100 ml hitzeinaktiviertes FCS (Gibco) zugegeben.

Bei der Kultivierung von Hybridomzelllinien in miniPERM-Modulen sind pro 1l Komplettmedium noch folgende Zusätze zugegeben worden:

|       |   |
|-------|---|
| 5 ml  | Glucose (45%)                                   |
| 10 ml | Pencilin / Streptomycin (10000 IU/ml, GibcoBRL) |
| 5 ml  | Fungizone (GibcoBRL)                            |

## 2.1.5 Antikörper

### 2.1.5.1 Erstantikörper

| Antigen (Ag)    | Name            | Art        | Verdünnung | Spezies   | Subtyp        | MW des Ag [kD] |
|-----------------|-----------------|------------|------------|-----------|---------------|----------------|
| CD 22           |                 | Serum      | 1:100      | Kaninchen | -             | 135            |
| calnexin        | MA-003          | mAk        | 1:4500     | Maus      | ?             | 90             |
| rab5            |                 | Serum      | 1:600      | Kaninchen | -             | 25             |
| rab7            |                 | Serum      | 1:600      | Kaninchen | -             | 27             |
| CI-MPR          |                 | Serum      | 1:200      | Ziege     | -             | 215            |
| Lamp-1          | #932-A          | Serum      | 1:2000     | Kaninchen | -             | 100            |
| HLA-DR $\alpha$ | 1B5             | mAk        | 1:6        | Maus      | IgG1          | 29             |
| HLA-DR $\beta$  | L227            | mAk        | 1:20       | Maus      | IgG1          | 33             |
| HLA-DR          | L243            | mAk        | -          | Maus      | IgG2a         | 62             |
| MHC I           | HC-A2<br>HC-10  | mAk<br>mAk | 1:4,5      | Maus      | IgG1<br>IgG2a | 45             |
| li              | SD <sub>3</sub> | mAk        | 1:1        | Maus      | IgG1          | 33, 35 & 41    |
| HLA-DM $\beta$  | DM.K8           | mAk        | 1:1000     | Maus      | IgG1          | 32             |
| HLA-DM          | 11323           | Serum      | -          | Kaninchen | -             |                |
| HLA-DOB         | DOB.L1          | mAk        | 1:1000     | Maus      | IgG2b         | 32             |

| Antigen (Ag)    | Name           | Bezugsquelle   | Referenz  |
|-----------------|----------------|----------------|---|
| CD 22           |                | G. Moldenhauer | Schwarz-Albiez et al. (1991) <i>Int. Immunol.</i> <b>3</b> , 623-633  |
| calnexin        | MA-003         | Alexis         |   |
| rab5            |                | W. Faigle      | Chavrier et al. (1990) <i>Cell</i> <b>62</b> , 317-329  |
| rab7            |                | W. Faigle      | Chavrier et al. (1990) <i>Cell</i> <b>62</b> , 317-329  |
| CI-MPR          |                | von Figura     | Geuze et al. (1984) <i>JCB</i> <b>98</b> , 2047-2054  |
| Lamp-2          | #932-A         | S. Carlsson    | Carlsson et al. (1988) <i>JBC</i> <b>263</b> , 18911-18919  |
| HLA-DR $\alpha$ | 1B5            | J. Neefjes     | Adams et al. (1983) <i>Immunol.</i> <b>50</b> , 613-624   |
| HLA-DR $\beta$  | L227           | ATCC           | Lampson & Levy (1980) <i>J. Immunol.</i> <b>125</b> , 293-299   |
| HLA-DR          | L243           | ATCC           | Lampson & Levy (1980) <i>J. Immunol.</i> <b>125</b> , 293-299;<br>Gorga et al. (1987) <i>JBC</i> <b>262</b> , 16087-16094 |
| MHC I           | HC-A2<br>HC-10 | G. Moldenhauer | Stam et al. (1990) <i>Int. Immunol.</i> <b>2</b> , 113-125  |

|                |                 |                 |   |
|----------------|-----------------|-----------------|---|
| li             | SD <sub>3</sub> | C.A. Müller, Tü | Max et al. (1993) <i>Hum. Immunol.</i> <b>38</b> , 193-200  |
| HLA-DM $\beta$ | DM.K8           | G. Moldenhauer  | Vogt et al. (1996) <i>PNAS</i> <b>93</b> , 9724-29  |
| HLA-DM         | 11323           | D. Zaller       | Busch et al. (1998) <i>J. Immunol.</i> <b>160</b> , 734-43<br>Liu et al. (1998) <i>J. Cell Biol.</i> <b>140</b> , 1023-37 |
| HLA-DO $\beta$ | DOB.L1          | G. Moldenhauer  | Kropshofer et al. (1998) <i>EMBO J.</i> <b>17</b> , 2971-81   |

### 2.1.5.2 Zweitantikörper

Sämtliche der folgenden Zweitantikörper-Enzymkonjugate wurden von der Firma Dianova GmbH bezogen:

- GaM-POX     gerichtet gegen den Fc $\gamma$ -Teil eines IgGs
- GaR-POX     gerichtet gegen die leichte und die schwere Kette eines IgGs
- DaG-POX     gerichtet gegen die leichte und die schwere Kette eines IgGs

Daneben wurden bei der Western Blot-Analyse von Immunpräzipitaten bzw. Isolaten isotyp-spezifische Zweitantikörper-Enzymkonjugate (GaMlgG1-, GaMlgG2a- oder GaMlgG2b-POX) eingesetzt. Dadurch wurde ein Anfärben der schweren Kette des Antikörpers, mit dem präzipitiert worden war, ausgeschlossen.

## 2.1.6 Geräte

### 2.1.6.1 Zentrifugen

|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| Zentrifuge für Eppendorfreaktionsgefäße | Heraeus Biofuge A<br>Heraeus      |
| Zentrifuge                              | Heraeus Minifuge 2                |
| Kühlzentrifuge                          | Du Pont Instruments Sorvall RC-5B |
| Ultrazentrifuge                         | Beckmann L8-60M sowie L8-M55      |

### 2.1.6.2 Massenspektrometrie

|                           |   |
|---------------------------|---|
| MALDI-Massenspektrometer: | Flugzeit-MS mit Laserdesorptionseinheit<br>Finnigan LaserMAT Version 2000 |
|---------------------------|---|

### 2.1.6.3 Spektroskopie

|                   |                                      |
|-------------------|--------------------------------------|
| ELISA-Photometer  | Multiscan, Titertek                  |
| Fluoreszenzreader | Victor Multilabelcounter, Wallac ADL |

#### 2.1.6.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

|                      |   |
|----------------------|---|
| Autosampler          | CMA / 200 Axel Semrau GmbH + Co.  |
| Pumpe                | Intelligent Pump L 6200, E. Merck                                       |
| Steuerung:           | LC Organizer  |
| Detektoren:          | Fluorescence Detector F 1080, E. Merck<br>UV Detector L 4000A, E. Merck |
| Integrator:          | D-2500 Integrator, E. Merck   |
| Gelfiltrationssäule: | Pharmacia Superdex 75 HR 5/20<br>Trennbereich: 1 - 70 kD                |

#### 2.1.6.5 Flußzytometrie

|            |                  |
|------------|------------------|
| FACS-Gerät | Becton Dickenson |
|------------|------------------|

## 2.2 Zellbiologische Techniken

### 2.2.1 Kultivierung von B-Lymphozyten

EBV-transformierte B-Zellen werden zur Herstellung großer Mengen in Rollflaschen kultiviert. Hierzu werden sterile 2l-Glasflaschen mit Dichtung (Schott) verwendet; die Zellen werden in einem Rollschrank bei 37 °C mit 3 - 4 Umdrehungen/min rotiert.

Die mittlere Zelldichte wird bei den Rollkulturen durch Zusatz von frischem Medium auf  $0,4-0,8 \times 10^6$  Zellen/ml gehalten.

EBV-transformierte B-Zellen werden bei einer Dichte von  $0,8-1,2 \times 10^6$  Zellen/ml durch Zentrifugation in 250 ml Gefäßen (1500 rpm, 10 min, 4 °C, JA-10 Beckman-Rotor) geerntet.

### 2.2.2 Kultivierung von Hybridomzelllinien in miniPERM-Modulen

150 ml Hybridomzellsuspension mit einer Dichte von etwa  $1 \times 10^6$  Zellen/ml werden in 50 ml Falcontubes abzentrifugiert (800 rpm, 5 min; Heraeus Minifuge 2). Die Pellets werden in insgesamt 45 ml 10% Kompletmedium resuspendiert und mit Hilfe einer 50 ml-Einwegspritze in das MiniPERM-Modul (Heraeus) ohne Luftblasenbildung eingefüllt. Anschliessend wird das Versorgungsmodul mit 350-400 ml 10% Kompletmedium befüllt. Die Zellen werden in einem Rollschrank bei 37 °C mit 3 - 4 Umdrehungen/min rotiert.

Durch die semipermeable Dialysemembran werden die Zellen und die sezernierten Antikörper in hoher Konzentration im Produktionsmodul zurückgehalten, während das Medium im Versorgungsmodul alle 3-4 Tage ausgewechselt wird. Nach ca 3-4 Wochen können die mAks in einer Dichte von 0.8-1.2 mg mAks/ml geerntet werden.

### 2.2.3 Lagerung von B-Lymphozyten

Zur Lagerung werden die geernteten Zellen (s. 2.2.1) auf Eis mit einer 10 ml Pipette resuspendiert und sämtliche Pellets in 50 ml Falcon-Tubes überführt. Nach erneuter Zentrifugation (2000 rpm, 10 min, 4 °C, Heraeus Minifuge) wird der Überstand vorsichtig abgenommen, und das Zellpellet auf Eis in 10 °C kaltem Einfriermedium (85% RPMI-Medium, 10% DMSO, 5% FCS) im Verhältnis 1:1 resuspendiert. Dabei werden die Zellen in einer Dichte von  $1-2 \times 10^7$  Zellen/ml aufgenommen. Die Zellsuspension wird in den 50 ml Röhrchen als Pellets bei -70 °C im Tiefkühlschrank eingefroren.

### 2.2.4 Kryokonservierung von B-Lymphozyten und Hybridomzellen

Zur Kryokonservierung werden die Zellen aus Suspensionskulturen abzentrifugiert (700rpm, 4 min, 4° C, Minifuge 2) und in 10° C kaltem, sterilfiltriertem Einfriermedium (50% FCS, 40% RPMI und 10% DMSO) suspendiert. Dabei werden die Zellen in einer Dichte von 1 bis  $2 \times 10^7$

Zellen/ml aufgenommen und auf Eis in 2 ml-Kryoampullen (Nunc) aliquotiert. Die Ampullen werden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  in einer Styroporschachtel langsam eingefroren. Nach 1-2 Tagen werden die eingefrorenen Zellen in flüssigen  $\text{N}_2$  überführt, wo sie mehrere Monate bis Jahre gelagert werden können.

### **2.2.5 Rekultivierung von B-Lymphozyten und Hybridomzellen**

Die in 2 ml-Kryoampullen in flüssigem  $\text{N}_2$  gelagerten Zellen werden in einem  $37^{\circ}\text{C}$ -warmen Wasserbad innerhalb weniger Minuten zu 90% aufgetaut und sofort in ein 15 ml-Falkonröhrchen mit 10 ml  $10^{\circ}\text{C}$  kaltem 10%igem Komplettmedium überführt. Nach Zentrifugation (700rpm, 4 min,  $4^{\circ}\text{C}$ , Minifuge 2) wird das DMSO-haltige Einfriermedium abdekantiert, und die Zellen werden bei einer Dichte von  $0,3$  bis  $0,6 \times 10^6$  Zellen/ml in 10%igem Komplettmedium rekultiviert.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Isolierung monoklonaler Antikörper (mAk)

#### 2.3.1.1 Affinätschromatographische Reinigung von mAk mittels Protein A

Der antikörperhaltige Hybridomüberstand wird über eine Tangentialfluß-Ultramembranfiltrationseinheit, Ausschlußgrenze 100 kD (Millipore) mit Hilfe einer Masterflex Schlauchpumpe (Millipore) um den Faktor 100 konzentriert. Bei mAk-haltigen Überständen, die aus MiniPerm-Modulen (Heraeus) gewonnen wurden, entfällt dieser Schritt. Durch Zusatz der entsprechenden Salze in fester Form wird unter Rühren eine Konzentration von 1,5 M Glycin, 3 M NaCl eingestellt und der pH mit 5 M NaOH auf pH 8,9 titriert. Vor der Protein A-Chromatographie wird die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert.

5 ml eines Sepharose Cl-4B Protein A-Konjugats (Pharmacia) werden in eine Polypropylen-säule gefüllt und mit 1,5 M Glycin, 3 M NaCl, pH 8,9 bei einer Flußrate von 20 ml/h äquili-briert. Der konzentrierte Hybridomüberstand mit einem Antikörper-Gehalt von bis zu 25 mg wird in 1 bis 2 Zyklen mit einer Flußrate von 40 ml/h aufgetragen. Zunächst wird die Säule unter UV-Detektion ( $\lambda = 278$  nm) mit dem Hochsalzpuffer gewaschen, anschließend mit 100 mM Citratpuffer, pH 7,0 bis die Basislinie jeweils erreicht wird. Eluiert wird der mAk mit 100 mM Citratpuffer, pH 4,0 bei einem Fluß von 80 ml/h. Die Peakfraktion ( $\lambda = 278$  nm) wird gesammelt und umgehend mit 1 M NaOH neutralisiert. Die Säulenregeneration erfolgt mit 5 Säulenvolumina 100 mM Citrat, pH 3,0 und anschließender Äquilibrierung mit dem Hochsalz-puffer (1,5 M Glycin, 3 M NaCl, pH 8,9).

Die Konzentration des eluierten mAk wird mittels Bradfordtest bestimmt. Anschließend wird die mAk-Lösung durch Ultrafiltration in einer P 10 Kammer (Amicon) auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Bei einer sich anschließenden Immobilisierung des Antikörpers an CNBr-aktivierte Sepharose wird das Isolat gleichzeitig auf 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 500 mM NaCl, pH 8,0 umgepuffert. Die Überprüfung der Reinheit des Antikörper-Isolats erfolgt über Gel-elektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung.

#### 2.3.1.2 Immobilisierung von mAk an Cyanobromid-aktivierte Sepharose

Für 15 mg Antikörper werden 1,5 g trockene CNBr-aktivierte Sepharose Cl-4B (Pharmacia) 30 min bei 4 °C in 50 ml 1 mM HCl gequollen. Nach dem Quellvorgang wird das Material in eine 18 ml Schüttelente überführt, der Überstand abgesaugt, und die Sepharose dreimal mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 500 mM NaCl, pH 8,0 gewaschen. Anschließend wird die Protein A-gerei-nigte mAk-Lösung zu der gequollenen Sepharose (ca. 5 ml) gegeben und über Nacht bei 4 °C unter langsamen Rotieren in einem Falcongefäß inkubiert, so daß keine Schaumbildung auftritt. Am nächsten Tag wird die Vollständigkeit der Immobilisierung durch Bradford-Pro-teinbestimmung überprüft. Restaktivitäten der Sepharose werden durch Zugabe von 20 ml

100 mM TRIS-HCl, pH 8,0 und durch eine nachfolgende einstündige Inkubation inaktiviert. Nach Überführung der Suspension in die Schüttelente wird die Sepharose dreimal mit 500 mM NaCl, 50 mM TRIS-HCl, pH 8,0, gewaschen. Am Schluß wird das Material mit 100 mM NaCl, 50 mM Na-Phosphat, pH 8,0 gewaschen und in diesem Puffer bei 4°C gelagert.

## 2.3.2 Präparative Isolierung subzellulärer Kompartimente

### 2.3.2.1 Differentielle Percoll-Dichtegradientenzentrifugation

In Einfriermedium tiefgefrorene B-Zellen werden möglichst rasch aufgetaut, indem sie mit Hilfe einer 10 ml Pipette in RPMI-Medium (Gibco) resuspendiert werden. Anschließend werden sie durch Zentrifugation (4 min, 1400 rpm, 4 °C, Heraeus Minifuge) gewaschen. Das Zellpellet wird mit dem gleichen Volumen eines hypotonen Puffers (20 mM TRIS-HCl, pH 7,8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,02% Natriumazid, 0,2 mM PMSF, 5 µM Leupeptin, 10µM Pepstatin und 1 µM Chymostatin) versetzt und resuspendiert. Die osmotisch vergrößerten Zellen werden dann mit Hilfe eines Potter-Elvehjem-Homogenators (70 µm Spalt, 600 rpm, 20 min) unter Eiskühlung aufgebrochen. Die Überprüfung der Lyse-Effizienz erfolgt mikroskopisch. Nach dem Homogenisieren wird das Zellhomogenat zur Vermeidung von Organellen-Lyse mit 2,5 M Saccharoselösung isoton gestellt (250 mM Saccharose).

Während der Promotionsarbeit wurde bei der Homogenisierung auf ein schonenderes Verfahren umgestellt, das sich des „EMBL cell crackers“ bedient. Bei diesem Gerät handelt es sich um einen Stahlblock mit zwei Ein- bzw. Ausgängen und einer definierten Bohrung (8,020 mm) sowie einer Kugel mit einem Durchmesser von 8,002 mm. Dabei werden die Zellen in einer Dichte von  $3 \times 10^7$  Zellen/ml in 250 mM Saccharose, 10 mM Triethanolamin, 10 mM Essigsäure, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5 aufgenommen, resuspendiert und in eine 10ml-Spritze aufgezogen. Dann wird die Zellsuspension durch die Bohrung des „EMBL cell crackers“ in eine zweite Spritze gedrückt. Die Scherkräfte, die beim Passieren des kleinen Spalts zwischen Kugel und Stahlblock entstehen, führen zum Platzen der Zellen. 6 Passagen sind für eine effiziente Homogenisierung völlig ausreichend.

Durch Zentrifugation (4 min, 2000 rpm, 4 °C, Minifuge) des Zellhomogenats werden intakte Zellen, Zellreste und Zellkerne entfernt. In den Überstand wird Percoll (Pharmacia) und 2,5 M Saccharose/100 mM TRIS-HCl (pH 7,8) eingewogen, so daß der Überstand Percoll in einer definierten Konzentration (WT-100: 24%, T2.DR4(.DM): 27%), 250 mM Saccharose sowie 10 mM TRIS-HCl enthält. Die Zellkonzentration soll  $7,5 \times 10^6$  Zellen/ml nicht überschreiten. Die Suspension wird dann 45 min bei 25000 rpm und 4 °C in einem Type 45Ti-Rotor (Beckman) zentrifugiert, anschließend wird mittels einer Pipette die obere Hälfte des Gradienten vorsichtig abgenommen. Diese wird nun auf 10% Percoll, die untere Hälfte auf 40% Percoll eingestellt, wobei die Saccharose und die TRIS-Konzentration unverändert bleiben. Die tatsächliche Percollkonzentration wird mit einem Pyknometer (50 ml, Brand®) überprüft und gegebenenfalls nachgestellt. Daraufhin wird erneut zentrifugiert: 45 min, 25000 rpm, 4 °C, Type 45Ti-Rotor. Nachdem beide Gradienten mit einer Pipette in je 10 Fraktionen fraktioniert wor-

den sind, werden die Percoll-haltigen Fraktionen mit 250 mM Saccharoselösung um Faktor 6 verdünnt und in dem Ausschwingrotor SW28 bzw. SW27 ultrazentrifugiert (90 bzw. 105 min, 28000 bzw. 27000 rpm, 4 °C). Die Organellenpellets werden mit einer Eppendorfpipette in 200 µl Volumen aufgenommen und mit Protease-Inhibitoren versetzt (0,2 mg/l NaN<sub>3</sub>, 0,2 mM PMSF, 5 µM Leupeptin, 10 µM Pepstatin und 10 µM Chymostatin).

Die so gewonnen Organellenpellets werden entweder bei -70 °C schockgefroren und bei dieser Temperatur gelagert oder bei sofortiger Verarbeitung mit Detergens (beispielsweise 1% NP-40 oder 1% CHAPS) versetzt und mindestens 45 min unter Schütteln lysiert. Nicht lyalisierte Bestandteile werden abschließend durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min 4 °C) entfernt.

### **2.3.2.2 Isolierung von intrazellulären Proteinen mittels Oberflächenbiotinylierung**

5 x 10<sup>8</sup> Zellen werden zweimal mit isotonem Puffer (250 mM Saccharose, 30 mM Na-Phosphat, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5) bei 4 °C gewaschen (1200 rpm, 4 min, Heraeus Minifuge 2). Danach werden die Zellen in 10 ml frisch angesetztem 3 mg/ml Biotinylierungsreagenz (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce) in isotonem Puffer resuspendiert und 15 min bei 4 °C rotiert. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 4 min) und zweimal in 10 ml 50 mM Glycin/isotonem Puffer (4 °C) zum Blockieren der Restaktivität des NHS-Esters und einmal in 10 ml hypotonem Puffer (20 mM TRIS, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5) gewaschen (1200 rpm, 4 min). Die Zellen werden mit 10 ml 1% NP-40 in hypotonem Puffer (mit Protease-Inhibitoren) durch einstündige Inkubation bei 4 °C lysiert. Unlösliche Bestandteile werden durch zweimaliges Zentrifugieren (1700rpm, dann 4500 rpm, 5 min, 4 °C) beseitigt.

In einem zweiten Schritt werden die biotinylierten Oberflächenproteine quantitativ aus dem Lysat entfernt. Dazu wird das Lysat über Nacht bei 4 °C unter Rollen mit 1 ml Beads inkubiert, an die monomeres Avidin gekoppelt ist (Pierce). Diese Beads haben den Vorteil, daß sie nach Regeneration mit 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,8 wiederverwendet werden können. Die vollständige Entfernung der biotinylierten Oberflächenproteine wird an Hand des Proteins DR überprüft, indem die Menge der DR(bio)-Moleküle über einen Sandwich-ELISA vor und nach der Präzipitation bestimmt wird (s. 2.4.7). Intrazelluläre DR-Moleküle können nun wie unter 2.3.3 beschrieben mit 150 µl L243-Sepharose isoliert werden.

### **2.3.2.3 Isolierung von Plasmamembranproteinen mittels Immunpräzipitation**

5 x 10<sup>8</sup> Zellen werden zweimal mit Komplettmedium (RPMI + 10% FCS) bei 4 °C gewaschen (1200 rpm, 4 min, Heraeus Minifuge 2) und darin aufgenommen. Die Zellsuspension wird dann zusammen mit 150 µg biotinyliertem mAk L243 30 min bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal mit isotonem Puffer (250 mM Saccharose, 30 mM Na-Phosphat, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5) und einmal mit hypotonem Puffer (20 mM TRIS, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5) bei 4 °C gewaschen (1200 rpm, 4 min). Die Zellen werden dann

mit 10 ml 1% NP-40 in hypotonem Puffer (mit Protease-Inhibitoren) durch einstündige Inkubation bei 4 ° C lysiert. Unlösliche Bestandteile werden durch zweimalige Zentrifugation (1200 rpm, dann 4500 rpm, 5 min, 4 ° C) entfernt. Um die Antikörperkomplexe zu präzipitieren, wird das Lysat mit 150 µl NeutrAvidin-Beads über Nacht bei 4° C inkubiert. Die Vollständigkeit der Präzipitation wird in einem Sandwich-Immunoassay (2.4.7) mit RaM-beschichteten Platten (Rabbit anti-Mouse) überprüft. HLA-DR, das von der Plasmamembran stammt, kann, wie unter 2.3.3 beschrieben, direkt von den NeutrAvidin-Beads eluiert werden.

### 2.3.3 Mikro-Isolierung von HLA-DR-Molekülen aus Lysaten

Jedes Lysat wird zusammen mit 100 µl L243-Sepharose in einem 2 ml „Safe-lock“-Reaktionsgefäß 24 h lang bei 4 ° C unter Rotieren inkubiert. Anschließend wird die Sepharose abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Sepharose wird viermal mit Waschpuffer I (100 mM NaCl, 50 mM Natriumphosphat, 1% NP-40, pH 8,0), dreimal mit Waschpuffer II (100 mM Natriumphosphat, 0,5% ZW-12, pH 8,0) und viermal mit Waschpuffer III (100 mM Natriumphosphat, 0,1% ZW-12, pH 8,0) gewaschen. Im Anschluß erfolgt die Elution durch Inkubation mit 1 ml Elutionspuffer (100 mM Natriumphosphat, 0,1% ZW-12, pH 11,0): nach einer kurze Inkubation mit dem Elutionspuffer wird die Sepharose abzentrifugiert, danach wird der Überstand abgenommen und mit HCl neutralisiert. Diese Elutionsprozedur wird insgesamt 4× durchgeführt. Zum Schluß werden je 3 der 4 ml Eluat in Ultrafiltrationseinheiten (Ultrafree<sup>®</sup>-MC spin columns, Millipore, Ausschlußgrenze 30 kD) auf ca. 100 µl aufkonzentriert, wobei der Flüssigkeitsspiegel nie unter diese Marke sinkt. Das Isolat wird am Schluß vorsichtig abgenommen und getrennt aufbewahrt.

### 2.3.4 Saure Freisetzung von Peptiden aus mikro-isolierten HLA-Molekülen

HLA-DR-Eluate oder -Isolate werden in Ultrafiltrationseinheiten bis zur Trockne reduziert. Um das Detergenz zu entfernen werden die Einheiten nachfolgend zehnmal mit je 350 µl HPLC-Wasser gewaschen. Nach Zugabe von je 50 µl 2% TFA auf die Ultrafree<sup>®</sup>-MC Säule wird der Ansatz 30 min bei 37 ° C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wird die Säule erneut mit 50 µl 2% TFA gewaschen, 20 min bei 37 ° C inkubiert und abzentrifugiert. Die Peptidlösungen werden zum Schluß in der SpeedVac getrocknet.

### 2.3.5 Immunpräzipitation von Plasmamembranproteinen

$2,5 \times 10^7$  Zellen werden wie unter 2.3.2.3 gewaschen und in Medium (RPMI +10% FCS) aufgenommen. Die Zellsuspension wird dann zusammen mit 5 µg biotinyliertem Antikörper 30 min bei 4 ° C unter Rotieren inkubiert. Dabei wird der mAk L243 verwendet; als Negativkontrolle dient der mAk IB5, der ein zytosolisches Epitop der DR $\alpha$ -Kette erkennt und deshalb

nicht von außen binden kann. Danach werden die Zellen zweimal mit isotonem Puffer (250 mM Saccharose, 30 mM Na-Phosphat, 5 mM  $MgCl_2$ , 0,1 mM  $CaCl_2$ , pH 7,3) und einmal mit hypotonem Puffer (20 mM HEPES, 5 mM  $MgOAc$ , pH 6,4) bei 4 °C gewaschen (2500 rpm, 2 min, Heraeus Biofuge Fresco). Die Zellen werden mit 1 ml 1% CHAPS oder 1% NP-40 in hypotonem Puffer (mit Protease-Inhibitoren) durch einstündige Inkubation bei 4 °C lysiert. Unlösliche Bestandteile werden durch zweimalige Zentrifugation (4000rpm, dann 13000 rpm, 5 min, 4 °C) entfernt. Um die Antikörperkomplexe zu präzipitieren, wird das Lysat mit 7,5  $\mu$ l NeutrAvidin-Beads mindestens 3 h oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wird der Überstand verworfen, und die Beads werden viermal mit Waschpuffer (50 mM NaCl, 100 mM Natriumphosphat, 1% Detergenz, pH 6,8) gewaschen (5000 rpm, 1 min). Anschließend werden die Antikörperkomplexe durch Denaturierung von den Beads eluiert. Dazu werden die Beads mit 30  $\mu$ l 2 x Lämmli-puffer 5 min bei 95 °C aufgeköcht, der Überstand abgenommen, die Beads erneut mit 30  $\mu$ l 2 x Lämmli-puffer und 1  $\mu$ l 3M DTT aufgeköcht und die Überstände vereinigt. Die Eluate werden mittels SDS-Gelelektrophorese (2.4.3.1) getrennt und mittels Western Blotting (2.4.4) analysiert. Das Anfärben des bei der Präzipitation verwendeten Antikörpers kann durch isotypspezifische Antikörper bei der Immunfärbung vermieden werden.

### **2.3.6 Quantifizierung der Plasmamembran- und der intrazellulären Anteile**

$5 \times 10^7$  Zellen werden mit 1,5 ml frisch angesetztem Biotinylierungsreagenz (3 mg/ml, EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce) quantitativ biotinyliert (vgl. 2.3.2.2). In einem Parallelansatz werden  $5 \times 10^7$  Zellen nur mit isotonem Puffer behandelt. Nach der NP40-Lyse werden unlösliche Bestandteile durch zweimalige Zentrifugation (4000 rpm, dann 13000 rpm, 5 min, 4 °C, Heraeus Biofuge Fresco) entfernt. Die Proteinkonzentration der Lysate wird mit Lysepuffer auf 1 mg/ml eingestellt (s. 2.4.1.1). Anschließend werden je 300  $\mu$ l Lysat mit 80  $\mu$ l NeutrAvidin Beads 3 h bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Bei diesem Schritt ist die genaue Vorgehensweise wichtig, um die Verdünnung des Lysats durch die Bead-Suspension möglichst klein zu halten: Die Beads werden in ein leeres Gefäß vorgelegt, abzentrifugiert, und der Überstand wird vorsichtig abgenommen. Erst dann wird das Lysat zu den Beads gegeben. Nach der Inkubation werden die Beads abzentrifugiert (5000 rpm, 1 min), das inkubierte Lysat vorsichtig abgenommen und separat aufgehoben. Die vollständige Depletion der biotinylierten Proteine wird an Hand des Proteins DR überprüft, indem die Menge der DR(bio)-Moleküle über einen Sandwich-ELISA vor und nach der Präzipitation bestimmt wird (s. 2.4.7).

Sowohl der Überstand von den biotinylierten Zellen (intrazelluläre Proteine) als auch der Überstand von den unbehandelten Zellen (Gesamtprotein) werden mit 60  $\mu$ l Lämmli-puffer versetzt und 5 min bei 95 °C gekocht. Die Beads werden viermal gewaschen (50 mM NaCl, 100 mM Natriumphosphat, 1% NP-40, pH 8,0, RT) und durch dreimaliges Aufköchen mit je 50, 50 und 40  $\mu$ l Lämmli-puffer eluiert. Dabei enthalten die Beads, die mit dem Lysat der bio-

tinylierten Zellen inkubiert wurden, die Plasmamembranproteine, während die anderen Beads als Negativkontrolle für unspezifischen Hintergrund dienen. Abschließend wird eine Mengenbestimmung mittels quantitativem Western Blotting (2.4.4.4) für ausgewählte Proteine durchgeführt. Die Umrechnung in die relativen Anteile am Gesamtgehalt erfolgt unter Einbeziehung der jeweiligen Volumina über Dreisatz, wobei bei den Eluaten ein zusätzliches Totvolumen von 30  $\mu$ l berücksichtigt wird.

### **2.3.7 *In vivo*-Beladungsassay**

#### **2.3.7.1 Standardassay**

Ungefähr 50 bis 100 ml Zellsuspension werden zunächst abzentrifugiert (1200 rpm, 4 min, Heraeus Minifuge 2) und zweimal mit 20 ml Medium (RPML plus 10% FCS) gewaschen. Vor dem letzten Zentrifugationsschritt wird eine Zellzählung durchgeführt. Nach der Zentrifugation wird das Pellet in Medium in einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen und auf 0,5 ml-SafeLock-Gefäße in 300  $\mu$ l Aliquots verteilt. Zu der Zellsuspension wird dann biotinyliertes HA(307-319)-Peptid gegeben, so daß die Endkonzentration 15  $\mu$ M beträgt. Anschließend wurde die Zellsuspension 3 h bei 37° C unter Rotieren inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen abzentrifugiert (2500 rpm, 2 min, 4 ° C; Heraeus Biofuge Fresco) und zunächst mit isotonem Puffer (250 mM Saccharose, 30 mM Na-Phosphat, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,3), dann mit hypotonem Puffer (20 mM TRIS, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5) gewaschen. Das Zellpellet wird abschließend mit 75  $\mu$ l 1% NP-40 in hypotonem Puffer (incl. Protease-Inhibitoren) versetzt und mindestens 45 min bei 4° C unter Schütteln lysiert. Nicht lysierte Bestandteile werden abschließend durch zweimalige Zentrifugation (4000, dann 13000 rpm, 5 min 4 ° C) entfernt. Durch eine Bestimmung des Gesamtproteins (2.4.1.1) in den Lysaten kann sichergestellt werden, daß alle Parallelansätze vergleichbare Bedingungen (Wasch- und Lyseeffizienz) erfahren haben. Die gebildeten DR:HA(bio)-Komplexe wurden durch einen Sandwich-Immunoassay (2.4.7) quantifiziert.

#### **2.3.7.2 Inhibition von Oberflächen-DM**

Die Durchführung erfolgt wie unter 2.3.7.1 beschrieben. Zur Inhibition von Oberflächen-DM wurde unmittelbar vor der Peptidzugabe die angegebene Menge DM-Antiserum (11323) in die Zellsuspension gegeben und inkubiert. Bei dem Kontrollserum handelt es sich um ein Kaninchenserum, das gegen den zytoplasmatischen Teil von DO $\beta$  gerichtet ist.

Für die Inhibitionskinetik werden T2.DR4.DM-Zellen entweder mit 4  $\mu$ l DM-Antiserum 11323 oder mit 4  $\mu$ l Kontrollserum (anti-DO $\beta$ , s.o.) 30 min auf Eis vorinkubiert. Anschließend wird das ungebundene Serum durch Waschen mit Medium entfernt. Die Zellen werden dann mit biotinyliertem HA(307-319)-Peptid für die angegebenen Zeiten inkubiert, und die DR4:HA(bio)-Komplexe wie unter 2.3.7.1 quantifiziert. Die Inhibition berechnet sich aus dem Verhältnis der Beladung in Anwesenheit von DM-Antiserum bzw. Kontrollserum.

### **2.3.7.3 Inhibition der Endozytose bzw. Proteinbiosynthese**

Im Unterschied zum Standardassay werden die Zellen vor der Peptidzugabe 30 min bei 37 °C vorbehandelt, indem entweder nichts (Kontrolle) oder die angegebenen Substanzen zugefügt werden. Nach der Vorbehandlung wird das Peptid ohne Waschen der Zellen zugegeben, d.h. die Peptidinkubation erfolgt in Anwesenheit der Inhibitoren. Die sonstige Durchführung erfolgt wie unter 2.3.7.1 beschrieben. Stammlösungen werden für Wortmannin in DMSO, für Cycloheximid und Natriumazid in Medium angesetzt. Die Endkonzentrationen betragen 5 µM bei Wortmannin, 20 mM bei Azid und 10 µg/ml bei Cycloheximid.

### **2.3.7.4 Kompetitionsassay**

Die Durchführung erfolgt wie unter 2.3.7.1 beschrieben. Nach 30-minütiger Inkubation mit dem biotinylierten Peptid wird entweder kein Peptid oder ein unmarkiertes Peptid als Kompetitor in der gleichen molaren Konzentration (15 µM) zugegeben. Als weiterer Kompetitor wird intaktes basisches Myelinprotein benutzt. Die Inkubation wird nach insgesamt 3 Stunden durch Lyse abgebrochen, und DR4:HA(bio)-Komplexe werden wie beschrieben quantifiziert.

## 2.4 Biochemisch-analytische Methoden

### 2.4.1 Proteinbestimmung

#### 2.4.1.1 BCA-Proteinbestimmung

Der BCA\* Assay (Pierce) funktioniert nach der Bicinchonin-Methode, dabei werden in Abhängigkeit der Proteinkonzentration einwertige Kupferionen generiert, die mit BCA einen farbigen Komplex bilden (Smith et al., 1985). Der Bestimmungskit ist Mikrotiterplatten-geeignet und zeichnet sich durch Sensitivität sowie Kompatibilität zu vielen verwendeten Chemikalien einschließlich Detergenzien aus.

Zur Durchführung der Proteinbestimmung werden 10 µl Probe in die Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend werden über eine Multipette (Eppendorf) je 200 µl der Arbeitslösung zupipettiert, ca. 30 min bei 37 °C inkubiert und die Absorption bei 540nm ermittelt. Zusätzlich zu den Fraktionen werden bei jeder Proteinbestimmung mehrere BSA-Standards in unterschiedlichen Konzentrationen vermessen, so daß über eine Eichgrade die absolute Konzentration in den Proben bestimmt werden kann.

#### 2.4.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt von detergentfreien Lösungen kann nach der Vorschrift von Bradford bestimmt werden (Bradford et al., 1976). Etwa 0,3 bis 3 µg der zu analysierenden Probe werden zu 980 µl Bradfordreagenz pipettiert, das in einer Halbmikroküvette vorgelegt wird. Das Gesamtvolumen wird mit aqua bidest. auf 1000 µl gebracht. Nach dreimaligem Invertieren wird die Lösung für 5 min bei RT stengelassen. Anschließend wird die Absorption 595 nm gegen eine entsprechende Pufferkontrolle gemessen. Die Eichung wird mit BSA im Bereich von 0,1 bis 4 µg Protein vorgenommen.

Das Bradford-Reagenz wird folgendermaßen hergestellt:

|   |                          |
|---|--------------------------|
| 100 mg Coomassie-Brillant-Blue G250 (Serva) | werden in                |
| 50 ml Ethanol                               | gelöst, dann werden      |
| 100 ml Phosphorsäure (85% v/v)              | zugefügt und das Volumen |
| ad 1000 ml mit aqua bidest.                 | aufgefüllt.              |

Nach 30-minütigem Rühren wird die Lösung filtriert und in einer Braunglasflasche aufbewahrt.

## 2.4.2 Aktivitätsbestimmung von $\beta$ -Hexosaminidase

Ein Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

10  $\mu$ l Lysat

5  $\mu$ l (p-Nitrophenyl)-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid (5 mg/ml in DMSO)

35  $\mu$ l Puffer (100 mM Natriumcitrat, 200 mM Natriumphosphat, 0,1% NP-40, pH 4,5)

Die Ansätze werden 5 bis 6 Stunden bei 37 ° C inkubiert, danach wird die Reaktion durch Zupipettieren von 200  $\mu$ l Stoppuffer (1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 550 mM Glycin, pH 10,0) beendet. Danach werden die Ansätze zentrifugiert (13000 rpm, 10 min) und die Überstände in eine Mikrotiter-Platte transferiert. Im Anschluß daran wird die Absorption bei 405 nm gemessen. Dieser Test stellt eine Modifikation eines  $\beta$ -Hexosaminidase-Tests dar, wie er von Beaufay et al. verwendet wurde (Beaufay et al., 1974).

Alternativ kann statt der p-Nitrophenol-Verbindung das entsprechende 5-Methyl-umbelliferyl-derivat verwendet werden. Dabei verkürzt sich die Inkubationszeit auf 1 bis 2 Stunden und die Notwendigkeit der Zentrifugation entfällt. Die Detektion erfolgt dann fluorimetrisch bei 355 nm bzw. 450 nm (Emission respektive Extinktion).

## 2.4.3 Gelelektrophoresen

### 2.4.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wird nach dem Prinzip von Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1972). Sammel- und Trenngel werden nach dem folgenden Pipettierschema hergestellt:

|                         | Sammelgel  |             | Trenngel    |             |
|-------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
|                         | (5%)       | 7,5%        | 10%         | 11,5%       |
| Aqua bidest.            | 3,540 ml   | 4,500 ml    | 3,350 ml    | 2,750 ml    |
| 1 M TRIS pH 8,8         | -          | 5,000 ml    | 5,000 ml    | 5,000 ml    |
| 1 M TRIS pH 6,8         | 0,680 ml   | -           | -           | -           |
| 30 % (Bis-)Acrylamidsg. | 0,720 ml   | 3,250 ml    | 4,400 ml    | 5,000 ml    |
| 10 % (w/v) SDS          | 60 $\mu$ l | 150 $\mu$ l | 150 $\mu$ l | 150 $\mu$ l |
| TEMED                   | 35 $\mu$ l | 25 $\mu$ l  | 25 $\mu$ l  | 25 $\mu$ l  |
| 10 % (w/v) APS          | 35 $\mu$ l | 80 $\mu$ l  | 80 $\mu$ l  | 80 $\mu$ l  |

Die Minigelplatten haben eine Abmessung von 10  $\times$  8 cm, die Spacer eine Dicke von 1 mm. Trenn- und Sammelgel werden vor dem Zusatz von APS nicht entgast, das Trenngel wird mit Isopropanol überschichtet. Die Höhe des Sammelgels beträgt ca. 1,5 cm. Die Teflon-Kämme haben 13 Probestaschen mit ca. 25  $\mu$ l Probenvolumen. Die Gele werden vertikal in eine Mi-

nigel-Kammer (Eigenbau) eingebaut, die dann mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) gefüllt wird.

Die Proben werden im Verhältnis 1:5 (v/v) mit 6 × Laemmli-Probenpuffer (150 mM Tris/HCl, pH 6,9, 12% (w/v) SDS, 30% (w/v) Glycerin, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau; bei reduzierendem Probenpuffer zusätzlich mit 0,6 M 1,4-DTT) versetzt. Wenn es nicht ausdrücklich anders angegeben wird, werden die Proben anschließend 3 min bei 95 °C gekocht, auf Eis abgeschreckt und dann in die Probenaschen pipettiert.

Die Elektrophorese dauert unter Konstanthaltung des Stroms bei 18 mA und einer Spannung von 70-150 V ca. 1h 20min.

### 2.4.3.2 Coomassie-Färbung

Für die Coomassie Färbung der Gele werden folgende Lösungen eingesetzt:

Färbelösung: 0,2 % Serva-Blue R, 50 % (v/v) MeOH, 8 % (v/v) Eisessig, filtriert;

Entfärber: 10 % (v/v) Eisessig, 15 % (v/v) MeOH.

Die Gele werden zunächst 15 min in Färbelösung sanft geschüttelt. Anschließend wird die Färbelösung abdekantiert, und die Gele werden 3 bis 4 mal in frischem Entfärber geschüttelt. Die entfärbten Gele werden in aqua bidest. gewässert, evtl. photographiert und schließlich auf 3MM Whatman-Papier im Gelrockner getrocknet.

## 2.4.4 Western Blotting und Immunfärbung

### 2.4.4.1 Western Blotting

Die Polyacrylamidgele werden auf eine Immobilon™ PVDF Transfer Membran (Millipore, Inc.) nach dem „semi dry“-Verfahren geblottet. Dazu werden Filterpapiere sowie die Gele und die Membranen, die in verschiedenen Puffern gewässert wurden, übereinandergeschichtet. Der Aufbau sieht folgendermaßen aus:

|                    |            |
|--------------------|------------|
| Kathode            |            |
| 6 Filterpapiere    | (Puffer 3) |
| Polyacrylamidgel   | (Puffer 2) |
| Immobilon™ Membran | (Puffer 2) |
| 2 Filterpapiere    | (Puffer 2) |
| 8 Filterpapiere    | (Puffer 1) |
| Anode              |            |

Die Puffer setzen sich zusammen wie folgt:

Puffer 1: 0,3 M Tris-HCl pH 10,4  
20% (v/v) Methanol (technisch)

Puffer 2: 0,025 M Tris pH 10,4  
20% (v/v) Methanol (technisch)

Puffer 3: 0,025 M Tris pH 9,4  
0,040 M 6-Aminocapronsäure  
20% (v/v) Methanol (technisch)

Beim Aufbau werden zunächst die gewässerten unteren Filterpapiere auf die Anode gelegt. Bevor die Immobilon™ Membran (10×7 cm) in Puffer 2 gewässert werden kann, muß sie durch kurzes Schwenken in Methanol benetzt werden. Nach dem Auflegen der Membran, des Gels und der restlichen Filterpapiere, wird die Kathode aufgelegt und mit ca. 1kg beschwert.

Bei SDS-Polyacrylamidgelen wird das Blotting unter Konstanthaltung des Stromes bei 160 mA und einer Spannung von 12-25 V für 1 h durchgeführt, wenn 2 Gele gleichzeitig geblottet werden. Wird nur ein Gel geblottet, wird die Stromstärke auf 100 mA reduziert und die anderen Parameter beibehalten. Tris-Tricin-Gele werden unter Konstanthaltung des Stromes bei 200 mA 1h10 geblottet. Geeignete „prestained molecular weight marker“ (BioRad), die vor der Elektrophorese als Probe aufgetragen wurden, geben nicht nur Auskunft über die Verteilung verschieden schwerer Proteine, sondern auch über die Blot-Effizienz.

Abschließend werden die Membranen entweder 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C in einer 1%igen Lösung aus „blocking reagent“ (Boehringer Mannheim) geblockt.

#### 2.4.4.2 Immunfärbung

Um Proteine spezifisch auf dem Western Blot nachzuweisen, wird die Membran in einer PBS-Lösung, die 0,5% Tween® enthält, gewaschen. Anschließend wird die Membran mit dem jeweiligen Erstantikörper 40 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Erstantikörperlösung wird nach der Inkubation in ihr Aufbewahrungsgefäß zurückpipettiert und die Membran dreimal 5 min in PBS/Tween® gewaschen. Nach dem Waschen wird die Membran mit dem entsprechenden Zweitantikörper-Enzymkonjugat 40 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wird die Zweitantikörperlösung verworfen, und die Membran erneut dreimal 5 min in PBS/Tween® gewaschen. Sämtliche Inkubations- und Waschschriffe erfolgen einzeln in einer Petrischale (Ø = 12 cm).

Sowohl Erst- als auch Zweitantikörper werden in einer PBS-Lösung verdünnt, die 1% BSA und 0,5% Tween® enthält. Zur Lagerung wird der Erstantikörperlösung 0,05% Natriumazid beigegeben.

### 2.4.4.3 Detektion mittels ECL

Membranen werden mit dem „SuperSignal™ CL-HRP Substrate System“ oder „SuperSignal Ultra™“ (Pierce) entwickelt. Dabei wird die Membran 1 bis 2 min in einer Gebrauchslösung inkubiert, die gleiche Anteile der beiden Stammlösungen des Kits enthält.

In Anschluß an die Inkubation läßt man die Flüssigkeit kurz von der Membran abtropfen, platziert sie in eine Klarsichthülle, die zu diesem Zweck an drei Seiten offen ist, und legt einen Film auf. Die Expositionsdauer reicht, abhängig von der Signalintensität, von 1 s bis 10 min. Die Filme werden abschließend in einer Entwicklereinheit (Agfa) entwickelt und fixiert.

### 2.4.4.4 Quantitatives Western Blotting

Beim quantitativen Western Blotting werden vier oder fünf unterschiedliche Mengen einer Referenzprobe zusammen mit den zu messenden Proben auf das SDS-Gel aufgetragen. Für eine absolute Konzentrationsbestimmung wird als Referenzprobe ein Proteinisolat bekannter Konzentration eingesetzt. Zur relativen Bestimmung, wie dies bei Punkt 2.3.6 der Fall ist, wird ein Zellysat verwendet, auf das sich dann die Konzentration der Meßprobe bezieht.

Das weitere Vorgehen entspricht den Punkten 2.4.4.1 bis 2.4.4.3. Am Schluß werden die Filme gescannt (Studioscan lisi, AGFA; Software: FotoLook SA2.05) und mit Hilfe des Programmes ScanAnalysis densitometrisch ausgewertet. Mit Hilfe der Referenzproben wird dann eine Eichkurve erstellt und ein linearer Bereich festgelegt. Die Auswertung der zu messenden Proben erfolgt über lineare Regression und ist nur dann sinnvoll, wenn sich ihre Intensität innerhalb der Grenzen des linearen Eichbereichs bewegt.

## 2.4.5 Gelfiltrations-Assays

### 2.4.5.1 HPSEC-Bindungsassay

Der nicht-radioaktive Peptidbindungsassay wurde von Kalbacher & Kropshofer (1991) entwickelt und beruht auf der Trennung der an MHC Klasse II gebundenen Peptiden von freiem Peptid mittels Gelfiltration (HPSEC = high performance size exclusion chromatography) und on-line Fluoreszenzdetektion. In jüngster Zeit wurde der Assay durch Einsatz einer miniaturisierten Gelfiltrationssäule und durch den Einbau von Mikro-Durchflußküvetten hinsichtlich Probendurchsatz, Materialverbrauch und Sensitivität deutlich verbessert.

Je 100 ng Isolat werden mit einem spezifisch N-terminal AMCA-markierten Peptid (bei 37 °C in Puffer (50 mM Natriumphosphat, 50 mM Natriumcitrat, 0,1% ZW-12, pH 4,8) inkubiert. Die HPSEC-Trennung erfolgt auf einer Superdex 75 HR 5/20 (Pharmacia), die mit einer Flußrate von 0,4 ml/min und einem Gegendruck von 15-16 bar gefahren wird. Als Laufmittel wird HPSEC-Puffer benutzt, der aus 150 mM Na-Phosphat, pH 6,0, 15 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % Zwittergent-12 besteht.

Die Quantifizierung des gebundenen Peptids erfolgt über die Höhe des Fluoreszenzsignals im Verhältnis zur Höhe des on-line detektierten UV-Signals ( $\lambda_{\text{Det}} = 214 \text{ nm}$ ). Die UV-Normierung des Bindungssignals auf die tatsächlich im Bindungsansatz vorhandene Proteinmenge ermöglicht eine hohe Reproduzierbarkeit der Messungen (die Fehler liegen in der Regel bei maximal 4 - 5%).

### **2.4.6 Massenspektrometrie (MALDI-MS)**

Zur Massenbestimmung von Peptiden ist ein Flugzeit-Massenspektrometer (Finnigan Laser-MAT Version 2000) mit Laserdesorptionseinheit eingesetzt worden. Dabei wird die Probe, in 1  $\mu\text{l}$  0,1% TFA / Aqua dest. (HPLC-grade) gelöst und 0,3  $\mu\text{l}$  hiervon mit 0,3  $\mu\text{l}$  Matrixlösung (1,4-Dihydroxybenzoesäure, gesättigt in 1% TFA, 50% AcN,  $\text{H}_2\text{O}$ ) auf einen MS-Probenteller pipettiert. Die zur Trockne eingedampfte Probe wird durch einen Laser ionisiert und durch das elektrische Feld beschleunigt.

Die Vorteile dieser Technik liegen in der hohen Empfindlichkeit (für Peptide  $\geq 1 \times 10^{-16} \text{ M}$ ) und der hohen Toleranz gegenüber Salz- und Detergenz-Kontaminationen.

### **2.4.7 DELFIA (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay)**

#### **2.4.7.1 Beschichten von Mikrotiterplatten**

In jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte (F16 Black Polysorp Fluoronunc, Nunc) werden 100  $\mu\text{l}$  einer verdünnten Antikörperlösung (1 mg/ml Antikörper, verdünnt 1:300 in 0,05 M Natriumkarbonatpuffer, pH 9,6) pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wird die Flüssigkeit abgeschüttelt, und die Mikrotiterplatte mit 200  $\mu\text{l}$  PBS/Tween<sup>®</sup> pro Vertiefung dreimal gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschrritten wird die Platte umgedreht auf saugfähigem Papier ausgeschlagen, um die Waschflüssigkeit möglichst vollständig zu entfernen. Zur Blockierung der unspezifischen Proteinadsorption wird in jede Vertiefung 200  $\mu\text{l}$  0,2 % Gelatine in PBS gegeben und 1 bis 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach können die Platten entweder sofort benutzt oder in Frischhaltefolie gepackt mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden.

#### **2.4.7.2 Sandwich-Immunoassay**

Vor Gebrauch wird die beschichtete Mikrotiterplatte dreimal mit 200  $\mu\text{l}$  PBS/Tween<sup>®</sup> wie beschrieben gewaschen. Dann werden in jede Vertiefung soviel 1 % BSA in PBS/Tween<sup>®</sup> vorgelegt, daß das Endvolumen 100  $\mu\text{l}$  beträgt. Anschließend werden die zu messenden Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert und mit der Pipette resuspendiert. Nach 2 h Inkubation bei RT wird die Mikrotiterplatte dreimal mit 200  $\mu\text{l}$  PBS/Tween<sup>®</sup> gewaschen. Biotiny-

lierte Proteinkomplexe werden mit Europium-markiertem Streptavidin (Wallac Oy, Turku, Finnland) detektiert. Dazu wird die (Eu)Streptavidin-Stammlösung 1:1000 in Assay Buffer (Wallac Oy, Turku, Finnland) verdünnt, 100 µl der verdünnten Lösung in jede Vertiefung gegeben, und die Mikrotiterplatte 45 min bei RT inkubiert. Danach wird die Mikrotiterplatte viermal mit 200 µl PBS/Tween<sup>®</sup> gewaschen. In jede Vertiefung werden 150 µl Enhancement Solution (Wallac Oy, Turku, Finnland) pipettiert. Durch den sauren pH wird der Chelator protoniert, über den das Europium an das Streptavidin gebunden war. In Folge dissoziiert das Europium-Ion und wird durch einen zweiten Chelator gebunden, der in der Enhancement Solution vorhanden ist und Europium pH-unabhängig bindet. Die Fluoreszenz des neuen Europiumchelatkompleses kann nun mit einem Fluoreszenzreader (Extinktion: 340 nm, Emission: 613 nm, 1420 Viktor Multilabel Counter, Wallac Oy, Turku, Finnland) in Lösung gemessen werden.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Subzelluläre Charakterisierung von MHC Klasse II-Molekülen

In vielen der bisherigen Arbeiten, die der Frage nachgingen, in welchen Kompartimenten Beladung von MHC Klasse II - Molekülen stattfindet, wurde der Nachweis über SDS-stabile Klasse II - Dimere geführt (Amigorena et al., 1994; Tulp et al., 1994; West et al., 1994; Qui et al., 1994). Damit wurde aber nur das Akkumulieren beladener MHC Klasse II-Moleküle gezeigt, nicht aber der Beladungsvorgang selbst. Im Rahmen dieser Arbeit ist deshalb ein anderer Ansatz gewählt worden: MHC Klasse II:CLIP-Komplexe sind die wichtigsten bislang beschriebenen Substrate für HLA-DM, das CLIP gegen antigenische Peptide austauscht. Daraus ergibt sich, daß MHC Klasse II:CLIP-Komplexe die unmittelbare Vorstufen des beladenen Klasse II-Moleküls sind. Auf dieser Basis werden Beladungskompartimente als solche definiert, die sowohl die Vorstufe, MHC Klasse II:CLIP-Komplexe, als auch das Beladungskatalysator, HLA-DM, enthalten. Zielsetzung der nachfolgenden Experimente war die Identifikation von Kompartimenten, in denen gemäß dieser Definition Beladung stattfinden kann.

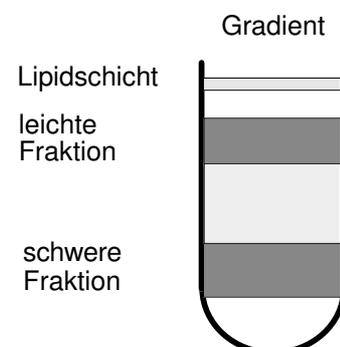
Die Fraktionierung der Zellen wurde auf zwei unterschiedliche Arten vorgenommen, wobei jede der beiden Techniken ihre eigenen Vorteile hat: Die Dichtegradientenzentrifugation trennt mehrere Arten von Organellen gemäß ihrer Dichte auf, während die Oberflächenbiotinylierung eine sehr saubere Unterscheidung zwischen intrazellulären Proteinen und Oberflächenproteinen erlaubt. Für ein abgerundetes Bild müssen die Ergebnisse beider Fraktionierungsmethoden zusammen betrachtet werden.

#### 3.1.1 Charakterisierung von MHC Klasse II-Molekülen in endosomalen und lysosomalen Kompartimenten

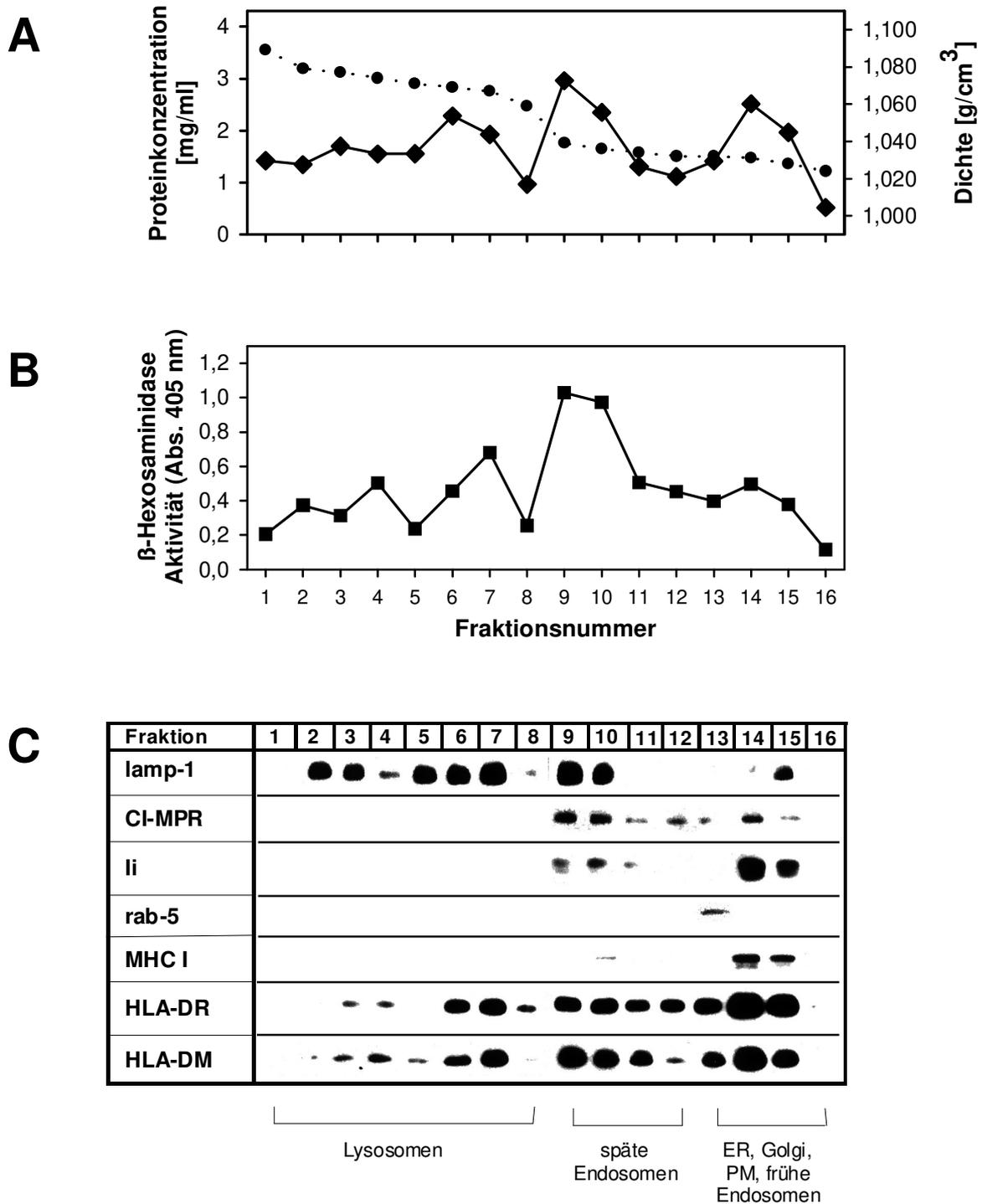
##### 3.1.1.1 Markeranalyse des Dichtegradienten

Zunächst wurden 10 Milliarden WT-100 Zellen nach ihrer Homogenisierung auf einem isotonen 24% Percoll-Gradienten fraktioniert. Dabei ergab sich folgendes repräsentatives Bild (Abb. 3.1):

Um die Trennleistung des Percoll-Gradienten zu verbessern, wurde in dieser Arbeit statt der üblichen Ein-Schritt-Zentrifugation (West et al., 1994; Qiu et al., 1994) eine zwei-stufige Zentrifugation angewendet. Dabei wurde die



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung eines Percollgradienten nach Zentrifugation



**Abb. 3.2: Leitproteinanalyse der sequentiellen Percoll-Dichtegradientenzentrifugation von WT-100**

- (A) Verteilung des Gesamtproteins über den Dichtegradienten ( $\rho$ ) sowie Dichtebestimmung ( $\lambda$ )  
 (B) Verteilung der Enzymaktivität des lysosomalen Markers  $\beta$ -Hexosaminidase ( $\nu$ )  
 (C) Western Blot-Analyse: Verteilung der Leitproteine lamp-1 (spezifisch für Lysosomen), CI-MPR (spezifisch für späte Endosomen sowie TGN), li (spezifisch für ER, Golgi und Endosomen), rab-5 (spezifisch für frühe Endosomen) und MHC Klasse I (spezifisch für ER, Golgi, Plasmamembran). Vergleich mit der Verteilung der MHC Klasse II-Proteine HLA-DR und HLA-DM.

obere Hälfte des 24% Gradienten nach der ersten Zentrifugation auf 10% Percoll und die untere Hälfte auf 40% Percoll eingestellt. Erst nach erneuter Zentrifugation (zweite Stufe) wurden sowohl der 10%- als auch der 40%-Gradient in jeweils 8 Fraktionen getrennt.

Im Anschluß an die Dichtegradientenzentrifugation wurden die einzelnen Fraktionen auf ihren Gesamtproteingehalt, auf die Aktivität eines Markerenzym sowie mittels Western Blot-Analyse auf Leitproteine (Abb. 3.2, A-C) untersucht. Dabei zeichnete sich folgendes Bild ab: Durch das sequentielle Fraktionierungsprotokoll sind die Organellen in 3 Gruppen aufgetrennt worden. Lysosomen unterschiedlicher Dichte befinden sich in den Fraktionen 1 bis 8. Diese Fraktionen zeichnen sich durch die Anwesenheit der lysosomalen / spätendosomalen Marker lamp-1 (Peters & von Figura, 1994) und  $\beta$ -Hexosaminidase (EC 3.2.1.20; Castellino & Germain, 1995)) aus. Die Hauptaktivität dieses Enzyms tritt in den Fraktionen 9 und 10 auf. Diese Fraktionen enthalten außerdem das Leitprotein CI-MPR (cation-independent manose 6-phosphate receptor), das vor allem in späten Endosomen und im TGN vorkommt, nicht aber in Lysosomen (Kornfeld, 1992). Es eignet sich daher für die Unterscheidung zwischen Lysosomen und späten Endosomen. Letztere sind folglich in den Fraktionen 9 bis 12 lokalisiert. Eine Kontamination der späten Endosomen durch Lysosomen läßt sich allerdings nicht ausschließen, da keine Leitproteine verfügbar sind, die nur in Lysosomen, nicht aber in späten Endosomen vorkommen: Alle bekannten lysosomalen Proteine gelangen über die späten Endosomen zu ihrem Bestimmungsort. Die leichtesten Fraktionen (13-16) waren die einzigen, in denen MHC Klasse I (Marker für ER, Golgi und Plasmamembran) und rab-5 (Marker für frühe Endosomen) nachgewiesen wurden. Auch enthielten sie den Hauptteil an intakter li sowie geringere Mengen an CI-MPR. Demnach bestehen die Fraktionen 13-16 aus einer Mischung aus ER, Golgi, frühen Endosomen und Plasmamembran.

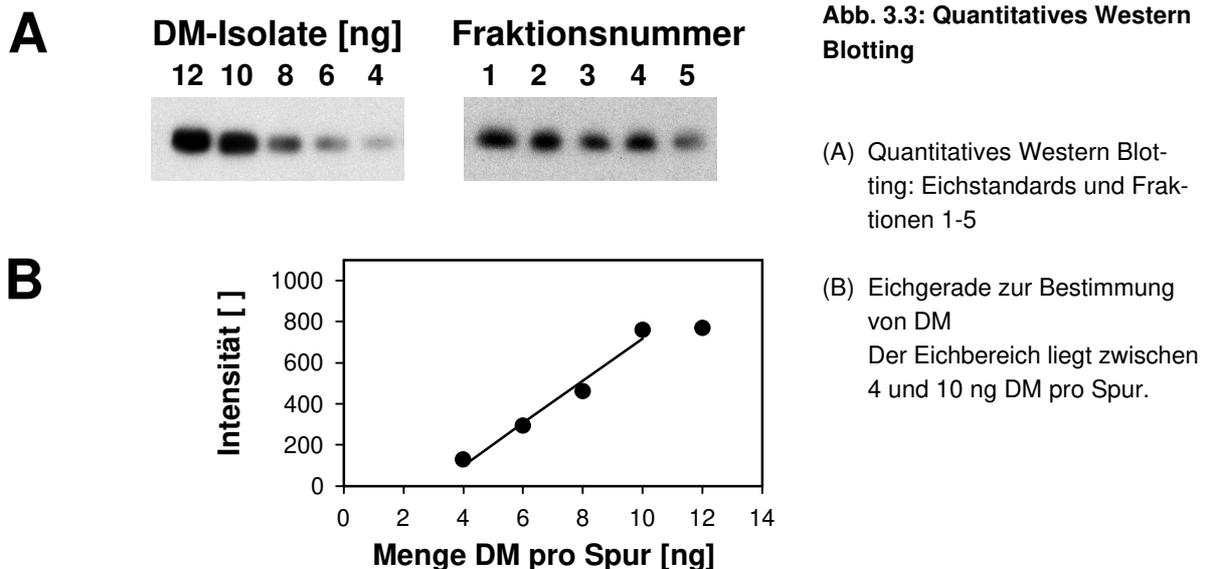
Die MHC Klasse II-Proteine HLA-DR und HLA-DM wurden in den meisten Fraktionen nachgewiesen, auch in späten Endosomen und Lysosomen. In Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß HLA-DR überwiegend auf der Zelloberfläche exprimiert ist, zeigen die Plasmamembranfraktionen 14 & 15 die höchsten Signalintensitäten für HLA-DR.

**Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation wurden aufgeschlossene B-Zellen in drei Organellgruppen fraktioniert: Die erste enthielt im wesentlichen Lysosomen, die zweite späte Endosomen und die dritte bestand aus frühen Endosomen, Plasmamembran, ER und Golgi.**

### 3.1.1.2 Verteilung und Quantifizierung von MHC-Molekülen

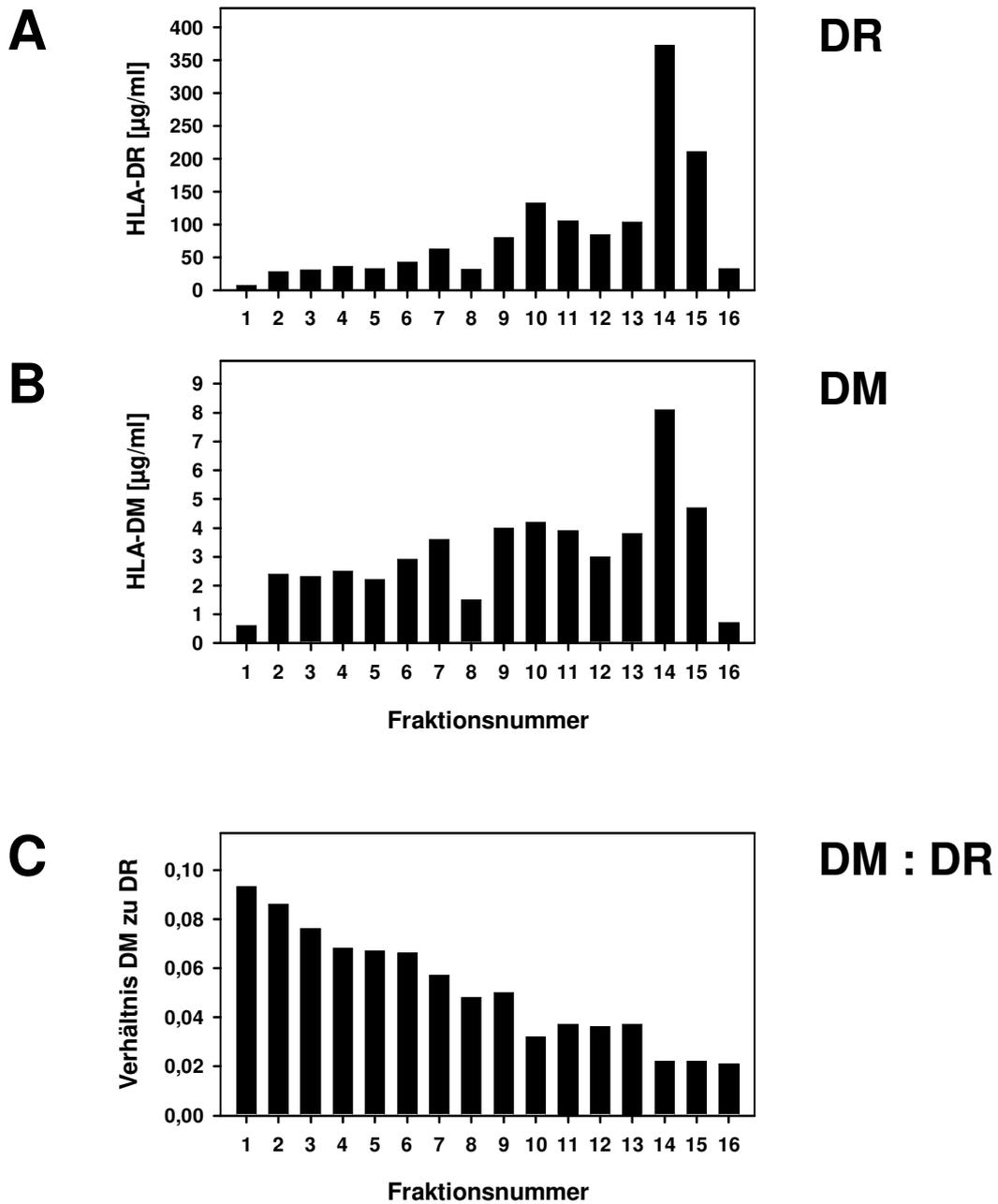
HLA-DM katalysiert den Beladungsprozeß von MHC Klasse II - Molekülen, die mit CLIP oder mit anderen, instabilen Peptidliganden vorbeladen sind (Sloan et al., 1995). Um die Wirkungsorte von HLA-DM und damit potentielle Beladungskompartimente zu identifizieren, wurde mittels quantitativem Western Blotting die Verteilung der beiden Proteine DR und DM bestimmt. Dafür wurden unterschiedliche Mengen von isoliertem DR oder DM als Eichstan-

dard zusammen mit den einzelnen Fraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen und auf der Blotmembran mit dem entsprechenden Antikörper detektiert (Abb. 3.3 A und B). Die Färbung wurde anschließend über Chemolumineszenz sichtbar gemacht und densitometrisch quantifiziert. Bei dieser Methode ist der Meßbereich sehr klein (Abb. 3.3 B). Daher wurden die aufgetragene Menge so gewählt, daß die Intensitäten sowohl der Eichstandards als auch der Fraktionen innerhalb des linearen Meßbereichs lagen. Mittels der Eichgeraden wurde die aufgetragene Menge jeder Fraktion bestimmt und durch Division mit dem aufgetragenen Volumen die jeweilige Konzentration berechnet.



Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in den Abb. 3.4 A und B dargestellt. In jeder der Fraktionen wurde sowohl DR als auch DM nachgewiesen. Während DM relativ gleichmäßig über den Dichtegradienten verteilt ist, zeigt DR eine Akkumulation in den Fraktionen 13 bis 15, die auch die Plasmamembran enthalten. In den spät-endosomalen Fraktionen 9 bis 12 kommt DR bereits weniger häufig vor, in den lysosomalen Fraktionen (1 bis 8) nimmt die Konzentration noch weiter ab. Das Ergebnis der Quantifizierungen stimmt mit den Western Blots (Abb. 3.2 C) überein.

Über alle Fraktionen gemittelt ergibt sich ein Verhältnis DM zu DR von 1:28, was mit der von Denzin & Cresswell (1995) veröffentlichten Abschätzung übereinstimmt. Weiterhin ist an Hand der Abb. 3.4 C folgender Zusammenhang erkennbar: Das Verhältnis DM zu DR fällt von den sauren Organellen zu den weniger sauren Organellen stark ab. Beträgt es in den lysosomalen Fraktionen noch 1:10, verringert es sich in den späten Endosomen auf 1:30. In den Fraktionen 14 bis 16 wurde ein Verhältnis von 1:45 bestimmt, wobei berücksichtigt werden muß, daß in diesen Fraktionen verschiedene Organellen kofraktionieren. Auch dieser Befund ist konsistent mit den Literaturdaten, denen andere Quantifizierungs-Techniken zu Grunde liegen und die ein Verhältnis DM zu DR von ca. 1:5 in den Lysosomen beschreiben (Schafer et al., 1996; Kropshofer et al., 1997).



**Abb. 3.4: Quantifizierung der MHC II - Moleküle DR und DM**

WT-100 Zellen wurden nach ihrem Aufschluß durch Homogenisieren mittels Percoll-Dichtegradientenzentrifugation subzellulär fraktioniert. Die Membranpellets der Fraktionen wurden in 1% NP-40 lysiert, anschließend wurden die Lysate mittels quantitativem Western Blotting auf DR und DM untersucht.

- (A) Quantifizierung von DR
- (B) Quantifizierung von DM
- (C) Verhältnis DM zu DR

**Die Konzentrationen von HLA-DR und HLA-DM wurden in jeder Fraktion bestimmt. Das daraus errechnete Verhältnis DM zu DR ist in den lysosomalen Kompartimenten am höchsten und nimmt zu den weniger sauren Kompartimenten hin ab.**

### **3.1.1.3 Nachweis von CLIP im DR-assoziierten Peptidrepertoire**

Potentielle Beladungskompartimente sollten die Vorstufe des beladenen DR-Moleküls, DR:CLIP, enthalten. Daher wurde das DR-assoziierte Peptidrepertoire auf CLIP untersucht: DR wurde aus jeder Fraktion affinitätschromatographisch isoliert, anschließend wurden die Peptide aus jedem DR-Isolat durch TFA-Behandlung freigesetzt und massenspektrometrisch analysiert. Dabei entstehen sogenannte Massenprofile (Abb. 3.5 & 3.6), die die heterogene Natur der DR-assoziierten Peptide widerspiegeln. In diesen Massenprofilen kann das Vorhandensein von CLIP-Peptiden nachgewiesen werden (Chicz et al., 1992; Sette et al., 1992), da CLIP nicht nur in der Variante 81-105, sondern auch in C- und N-terminalen Verkürzungsvarianten auftritt. Die Identifizierung einer CLIP-Variante kann daher zusätzlich zur absoluten Masse über die Massendifferenz zu benachbarten CLIP-Peaks geschehen. Diese muß mit der CLIP-Sequenz übereinstimmen und ermöglicht so eine zuverlässige Zuordnung der CLIP-Spezies.

Die Peptidprofile der verschiedenen Fraktionen zeigen, daß die Masse der DR-assoziierten Peptide in allen Fraktionen zwischen 1400 und 2800 Da liegt. Dies entspricht der erwarteten Länge von 12 bis 24 Aminosäuren. CLIP-Peptide konnten in den Fraktionen 4 bis 13 nachgewiesen werden. Die verbleibenden Fraktionen können in zwei Gruppen unterschieden werden: Die Massenprofile der lysosomalen Fraktionen 1-3 weisen ein Intensitätsmaximum bei 1800 Da auf, die Intensität im CLIP-typischen Bereich zwischen 2400 und 2800 Da ist bereits bis fast auf die Basislinie zurückgegangen. Diese Fraktionen enthalten daher kein CLIP. Die Massenprofile der Fraktionen 14 und 15 hingegen zeichnen sich durch zwei Intensitätsmaxima aus: Das erste liegt bei 1800 Da, das zweite bei 2500 Da. Auch wenn bei diesen Fraktionen keine CLIP-Peaks aus den Massenprofilen herausragen, kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese Fraktionen DR:CLIP-Komplexe in geringerer Konzentration enthalten. Gestützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, daß bei der vorliegenden Zelllinie CLIP auf der Plasmamembran durch FACS-Analyse in kleiner Menge nachgewiesen werden kann.

**CLIP:DR-Komplexe, die die bona fide Substrate für DM und damit unmittelbare Vorstufe der Beladung sind, wurden sowohl in spätendosomalen als auch in lysosomalen Fraktionen nachgewiesen. Diese Kompartimente erfüllen damit die Kriterien, die sie als Beladungskompartimente auszeichnen.**

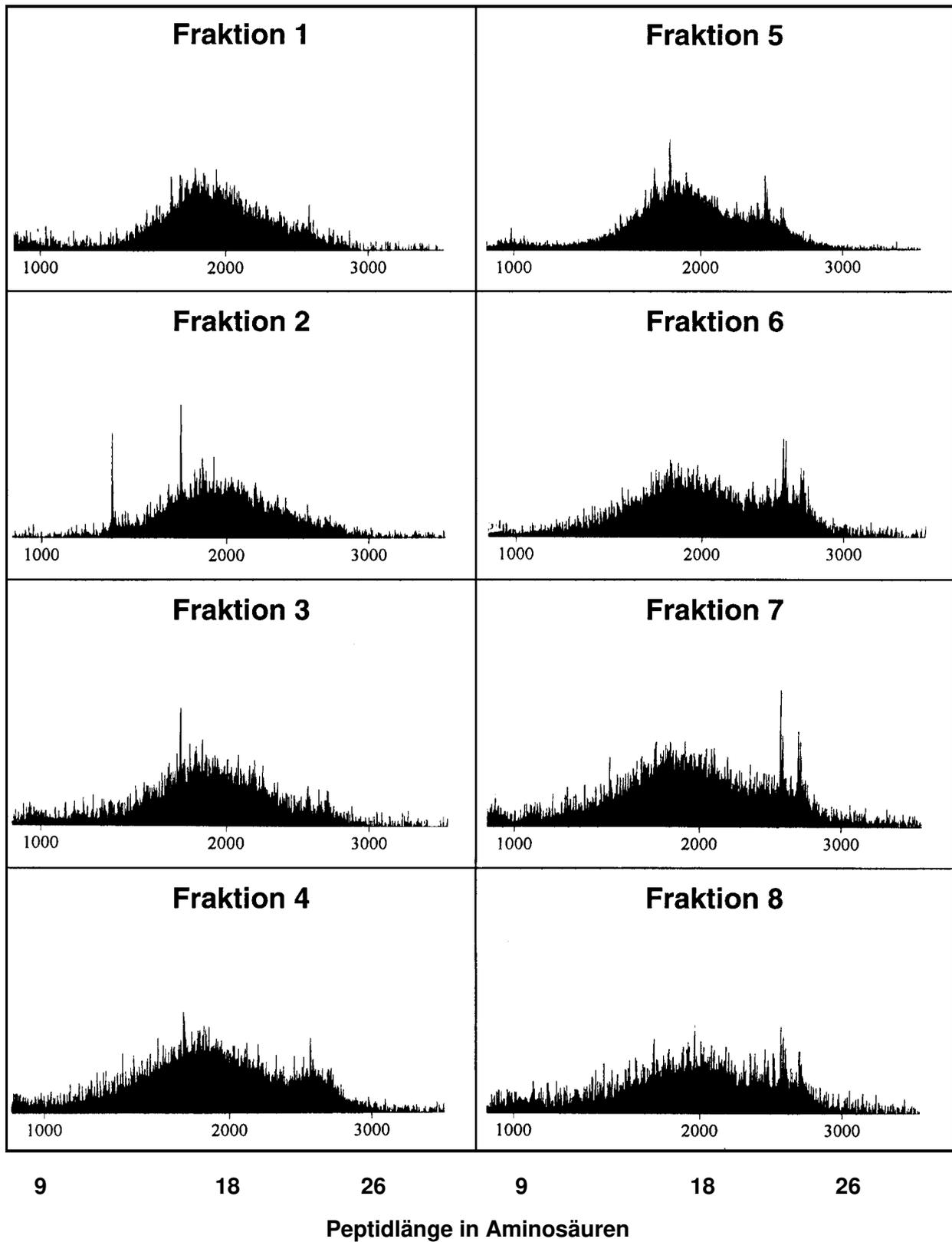


Abb. 3.5: Massenprofile der Fraktionen 1 bis 8

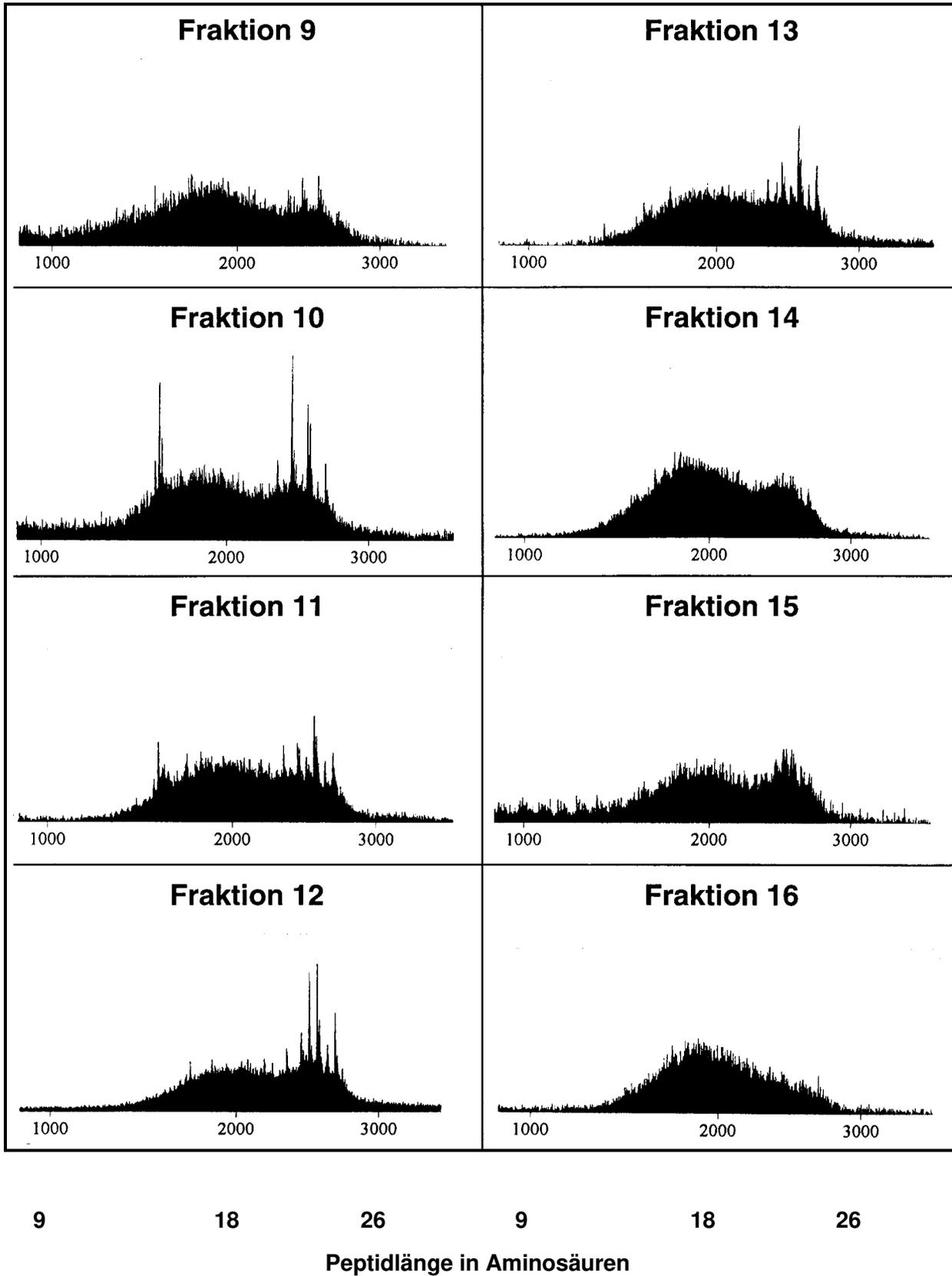


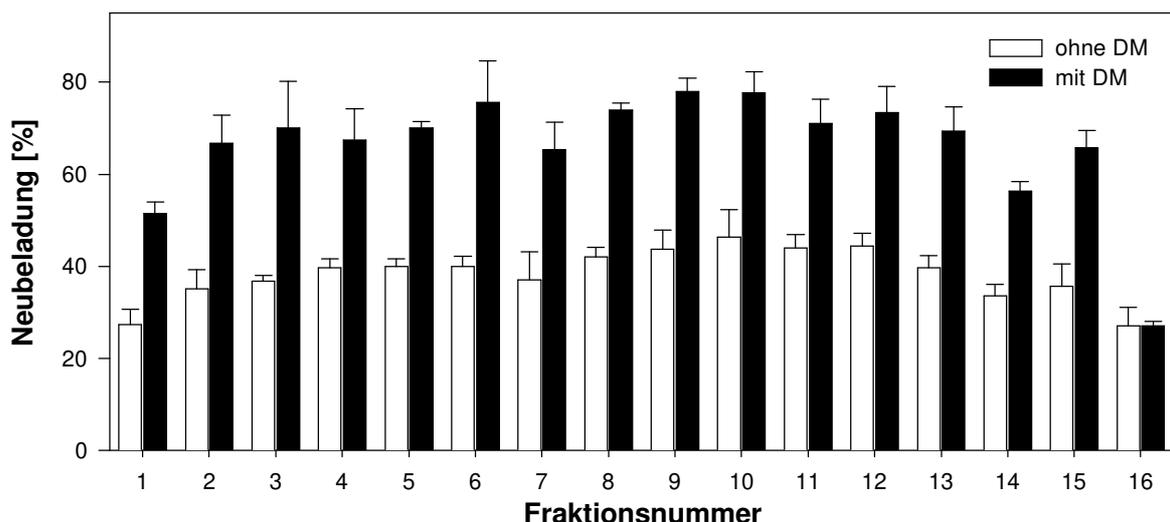
Abb. 3.6: Massenprofile der Fraktionen 9 bis 16

### 3.1.1.4 Stabilität des DR-assoziierten Peptidrepertoires

HLA-DM katalysiert nicht nur den Austausch von CLIP gegen antigenisches Peptid, sondern selektioniert dabei auch nach Stabilität: Stehen mehrere Peptide zur Auswahl, bevorzugt DM die Peptide, die mit einer niedrigen Dissoziationshalbwertszeit an MHC Klasse II-Proteine binden (Kropshofer et al., 1996). Beide Vorgänge führen zu einer Erhöhung der durchschnittlichen Stabilität der MHC II:Peptid-Komplexe. Folglich sollten sich Kompartimente, in denen der Beladungsvorgang noch am Anfang steht, von Kompartimenten fortgeschrittener Beladung in der Stabilität ihres DR-assoziierten Peptidrepertoires unterscheiden.

Ziel des folgenden Experiments war es, die Beladungskompartimente, die in 3.1.1.2 und 3.1.1.3 identifiziert wurden (Lysosomen unterschiedlicher Dichte sowie späte Endosomen), bezüglich ihres Beladungszustandes zu charakterisieren. Dazu wurden DR1-Isolate aus jeder Fraktion in einem *in vitro*-Test auf ihre Stabilität hin untersucht: Eine definierte Menge des jeweiligen Isolats wurde in An- oder in Abwesenheit von isoliertem DM mit einem Überschuss des stabil-bindenden Reporterpeptids AMCA-HA inkubiert. Anschließend wurde mit dem HPSEC-Bindungsassay der Anteil an DR1-Molekülen quantifiziert, die das Reporterpeptid gebunden hatten (Abb. 3.7). Die Stabilität des endogenen Peptidrepertoires verhält sich bei diesem Versuch reziprok zur Beladung: Bei einem stabilen Peptidrepertoire findet nur in geringem Umfang Neubeladung mit einem Reporterpeptid statt, während bei einem instabilen Repertoire der Anteil an DR:Reporterpeptid-Komplexen hoch ist.

Die Beladbarkeit sämtlicher DR1-Isolate ist bemerkenswert hoch: Sie liegt in Abwesenheit von DM bei ca. 35 bis 40%, in Anwesenheit von DM sogar bei 70 bis 80%. Die einzelnen Isolate unterscheiden sich in ihrer Beladbarkeit kaum. Eine Korrelation der Beladbarkeit mit der endogenen DM-Konzentration oder mit der Menge an CLIP im DR-assoziierten Peptidre-



**Abb. 3.7: Bindung eines Reporterpeptids (AMCA-HA) an DR1-Isolate einzelner Fraktionen**

HPSEC-Bindungsassay mit DR1-Isolaten (80 nM) aus verschiedenen Fraktionen mit AMCA-markiertem HA(307-319) (30  $\mu$ M] in Anwesenheit von DM (20nM, schwarze Säulen) bzw. in Abwesenheit von DM (weiße Säulen). Fehlerbalken geben die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen an.

pertoire konnte damit nicht beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für dieses überraschende Ergebnis ist die Annahme, daß stabil-bindende Peptide in den Beladungskompartimenten nicht in ausreichender Zahl zur Verfügung stehen und damit limitierend sind. In diesem Fall belädt DM die entsprechenden DR-Moleküle auch mit instabileren Peptiden.

**Der Vergleich der Stabilitäten der fraktionsspezifischen DR-Isolate lieferte ein unerwartetes Resultat: Die Stabilitäten waren durchgängig recht niedrig (35 bis 40% Neubeladung) und unterschieden sich voneinander kaum.**

### **3.1.2 Charakterisierung von MHC Klasse II-Molekülen auf der Zelloberfläche**

Im Zusammenhang mit der Beladung von MHC Klasse II-Proteinen steht auch die Frage, ob und wie der Editierprozeß das Peptidrepertoire beeinflusst. Bislang ist gezeigt worden, daß DM unter *in vitro*-Bedingungen Peptide nach ihrer Stabilität selektioniert (Kropshofer et al., 1996; Weber et al., 1996). Ferner ist gezeigt worden, daß das Peptidrepertoire DM-negativer Zelllinien durch Transfektion von HLA-DM verändert wird (Ramachandra et al., 1996; Katz et al., 1996). Der direkte *in vivo* oder *ex vivo* Nachweis, daß das Peptidrepertoire tatsächlich im Anschluß an die Beladung durch Austausch verändert wird ("editing"), stand jedoch noch aus.

Um den Einfluß des Editierprozesses auf das Peptidrepertoire zu demonstrieren, wurden erneut Zellen einer B-Zelllinie subzellulär fraktioniert. Dabei galt es in erster Linie, Kompartimente, in denen der Editierprozeß bereits abgelaufen war (Plasmamembran), von Kompartimenten, in denen der Editierprozeß erst angefangen hatte (intrazelluläre Beladungskompartimente), zu trennen. Die Dichtegradientenzentrifugation schied als Fraktionierungsmethode hierfür aus, da sie die Plasmamembranvesikel von anderen leichten Organellen, wie ER, Golgi und frühen Endosomen, nicht separieren konnte (s. 3.1.1.1). Daher wurde eine ebenfalls präparative Methode etabliert, die die gewünschte Unterscheidung zwischen Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten erlaubte.

#### **3.1.2.1 Verteilung und Quantifizierung von MHC-Molekülen: Plasmamembran vs. intrazelluläre Kompartimente**

Bei der Isolierung und der Quantifizierung von Oberflächenproteinen macht man sich die Tatsache zunutze, daß die Plasmamembran sowohl für Reagenzien mit hohem Molekulargewicht als auch für geladene Reagenzien impermeabel ist. So wurden spezifisch die Oberflächenproteine von intakten Zellen mit einem sehr reaktiven Reagenz quantitativ biotinyliert. Eine negativ geladene Sulfogruppe gewährleistete, daß die Biotinylierung nur an der Außenseite der Zellen stattfand. Nach Detergenzlyse der Zellen wurden die biotinylierten Oberflächenproteine durch Inkubation mit NeutrAvidin-Beads mit einer Effizienz von über 99% iso-

|                |         | HLA-DR<br>[%] |      | HLA-DM<br>[%] |    | lamp-1<br>[%] |
|----------------|---------|---------------|------|---------------|----|---------------|
|                |         | IC            | PM   | IC            | PM | PM            |
| <b>WT-100</b>  | Exp. I  | 32            | 67   | 64            | 17 | 7             |
|                | Exp. II | 21            | n.b. | 76            | 13 | 5             |
| <b>Jesthom</b> | Exp. I  | 28            | 59   | 82            | 8  | 4             |
|                | Exp. II | 27            | 57   | 79            | 11 | n.b.          |
| <b>Jutthom</b> | Exp. I  | 21            | 50   | 67            | 9  | 4             |
|                | Exp. II | 20            | 80   | 75            | 11 | 5             |

**Tabelle 3.1: Quantifizierung von DR, DM und lamp-1**

Die Proteine DR, DM und lamp-1 wurden mittels quantitativem Western Blotting bei den B-Zelllinien WT-100, Jesthom und Jutthom in je 2 unabhängigen Experimenten (Exp. 1 & Exp.2) quantifiziert. Dabei wurde der Anteil jedes Proteins auf der Zelloberfläche wie auch intrazellulär bestimmt und als Anteil an der Gesamtmenge angegeben. n.b. = nicht bestimmt.

liert und damit von den nicht-biotinylierten intrazellulären Proteinen abgetrennt). Mit der anschließenden Quantifizierung wurden zwei Ziele verfolgt. Erstens sollte die allgemein angenommene Verteilung der MHC Klasse II-Moleküle DR und DM für die verwendeten Zelllinien bestätigt werden. Zweitens sollte der Nachweis erbracht werden, daß diese Vorgehensweise eine saubere Separierung in Plasmamembranproteine und intrazelluläre Proteine erlaubt. Dazu sollten sowohl die Anteile eines Proteins, das größtenteils auf der Plasmamembran lokalisiert ist (DR), als auch der Anteil eines intrazellulären Proteins (lamp-1) bestimmt werden. Dementsprechend wurde die Verteilung von DM quantifiziert.

Mittels der beschriebenen Methode wurde der Anteil dieser Proteine bei den B-Zelllinien WT-100, Jesthom und Jutthom bestimmt (Tabelle 3.1). DR ist erwartungsgemäß zu etwa 60-70% auf der Plasmamembran lokalisiert und zu 20-30% intrazellulär. Das lysosomale Markerprotein lamp-1 ist mit einem Anteil von 5% auf der Zelloberfläche anwesend. Dieses Ergebnis stimmt mit den Arbeiten anderer Gruppen überein, die den Plasmamembrananteil dieses Proteins mit 3% angaben (Rohrer et al., 1996). DM hingegen ist größtenteils (70-80%) intrazellulär vertreten. Interessanterweise wurde auch eine signifikante Population (10-15%) von DM auf der Plasmamembran nachgewiesen.

Die Summe der Anteile von "intrazellulär" und "Plasmamembran" bewegen sich für DR und DM jeweils meist unter 100%, woraus abzulesen ist, daß die Methode der Western Blot-Quantifizierung eher zu einer leichten Unterschätzung führt. Der Anteil des intrazellulären Markers lamp-1 auf der Oberfläche lag im Bereich der Literaturangaben; somit ist das Ober-

flächenisolat sehr rein (>95%). Die Reinheit der intrazellulären Fraktion kann leider nicht so exakt bestimmt werden. Da jedoch die Verteilung von DR im erwarteten Rahmen lag, kann sie keine größeren Kontaminationen durch Plasmamembranproteine enthalten.

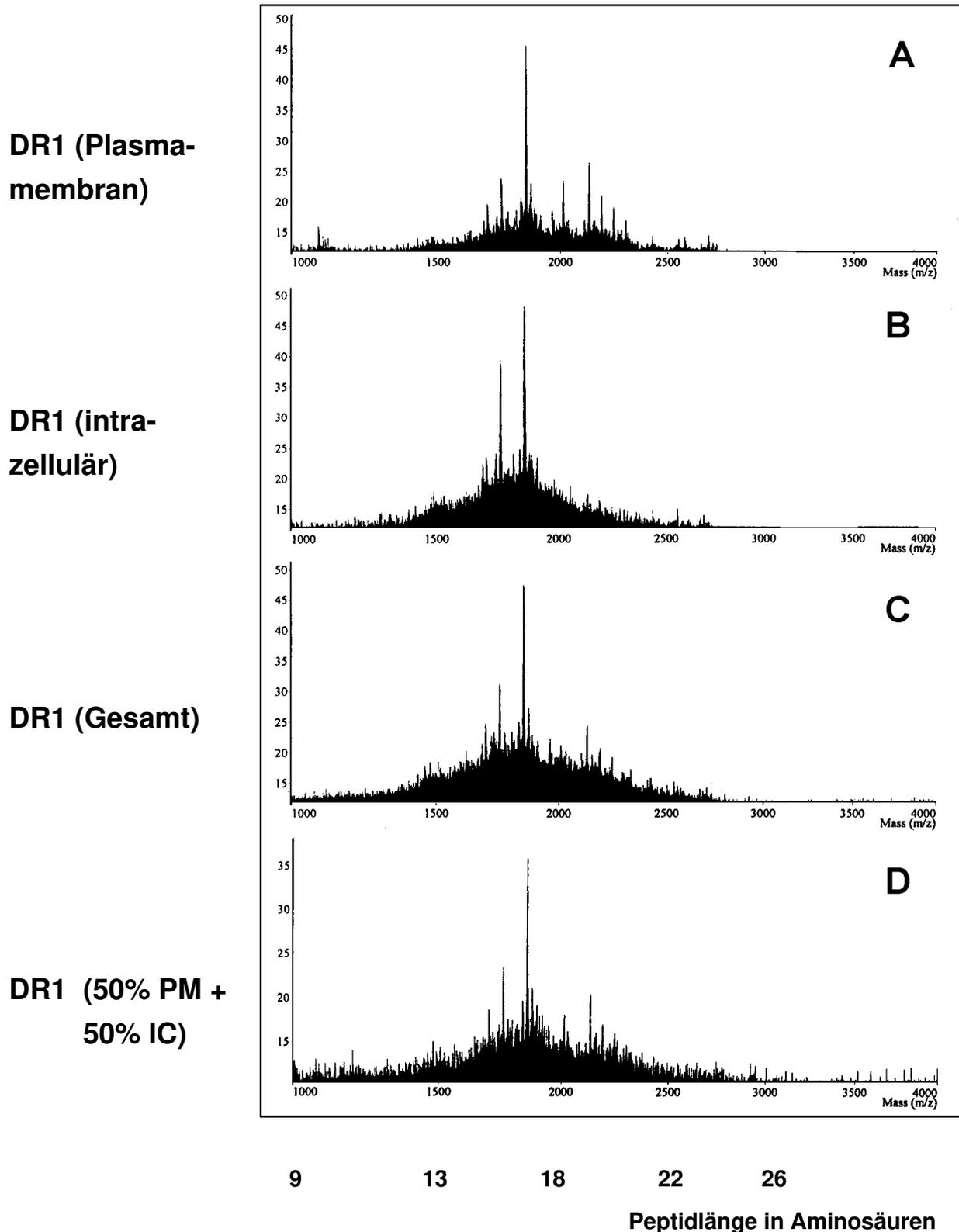
**Die Quantifizierung der Proteine HLA-DR und HLA-DM mittels Oberflächenbiotinylierung bestätigt die erwartete Verteilung zwischen den intrazellulären Kompartimenten und der Plasmamembran. Überraschend ist dabei der Nachweis einer Subpopulation von DM auf der Zelloberfläche.**

### **3.1.2.2 Vergleich DR-assoziiertes Peptidrepertoire: Plasmamembran vs. intrazelluläre Kompartimente**

Geht man davon aus, daß das Peptidrepertoire im Anschluß an die Beladung durch den Austausch von Peptiden verändert wird, also einem Editierprozeß unterliegt, dann sollte sich das Oberflächenrepertoire von dem intrazellulären hinsichtlich der Art der Peptide und hinsichtlich der kinetischen Stabilität der Peptide unterscheiden. Dabei werden sich Unterschiede im Peptidrepertoire um so leichter nachweisen lassen, je weniger verschiedenartige Peptide das Repertoire umfaßt.

Ziel des folgenden Experiments war es, die DR-assoziierten Peptidpools nach erfolgter Trennung in intrazelluläre und Plasmamembran-ständige DR-Moleküle auf Unterschiede hin zu untersuchen. Dazu wurden mit der Oberflächenbiotinylierung und anschließender Depletierung der biotinylierten Proteine intrazelluläre DR-Moleküle isoliert. Oberflächen-DR-Moleküle wurden direkt durch Inkubation von intakten Zellen mit anti-DR-Antikörpern dargestellt. Anschließend wurden die Peptide aus beiden DR-Isolaten durch TFA-Behandlung freigesetzt und massenspektrometrisch analysiert. Für dieses Experiment sind die B-Zelllinien Jethom und Jutthom geeigneter als WT-100, da die ersten beiden Zelllinien ein sehr markantes Peptidprofil mit einer begrenzten Zahl prominenter Peptid-Signale aufweisen.

Die Profile der Zelllinie Jutthom (Abb. 3.8) illustrieren signifikante Unterschiede im Peptidrepertoire von DR1: Das Repertoire der intrazellulären Organellen (Abb. 3.8 B) besteht aus vielen unterschiedlichen Peptiden im Bereich von 1400 bis 2300 Da, was einer Länge von 12 bis 20 Aminosäuren entspricht. Die beiden herausragenden Peptidspezies stammen von dem DR1-immundominanten Epitop des endogenen Proteins HLA-A2, die früher im Kontext der Haplotyp-gleichen B-LCL LG-2 nachgewiesen wurden (Chicz et al., 1992). Im Gegensatz dazu ist das Peptidprofil der Plasmamembranfraktion (Abb. 3.8 A) weniger divers und wird hauptsächlich durch mehrere diskrete Peptidspezies bestimmt, die ein Molekulargewicht zwischen 1700 und 2700 Da (13 bis 22 Aminosäuren) besitzen. Dabei handelt es sich mit Sicherheit um N- und C-terminale Verkürzungsvarianten, die sich ebenfalls von dem MHC Klasse I-Protein HLA-A2 ableiten. Als Kontrolle wurde ein Gemisch (Abb. 3.8 D), das jeweils zur Hälfte aus intrazellulären und aus Oberflächenpeptiden bestand, mit den DR1-assoziierten Peptiden (Abb. 3.8 C), die aus ganzen Zellen direkt isoliert wurden, verglichen. Beide Profile ähneln sich sehr stark, was die Zuverlässigkeit der Methode untermauert.



**Abb. 3.8: Kompartimentspezifische Massenprofile der Zelllinie Jutthom**

DR1 wurde spezifisch von der Plasmamembran (A), aus intrazellulären Kompartimenten (B) oder aus der ganzen Zelle (C) isoliert. (D) stellt ein Gemisch dar, das zu je 50% aus (A) und (B) besteht. Peptide wurden durch TFA-Behandlung eluiert und massenspektrometrisch analysiert. Die beobachteten Unterschiede zwischen der Plasmamembranfraktion und den intrazellulären Kompartimenten stehen im Einklang mit der These eines DM-vermittelten Editierprozeß, dem MHC Klasse II-Moleküle auf ihrem Weg zur Plasmamembran ausgesetzt sind.

Dasselbe Experiment wurde auch mit der Zelllinie Jesthom durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Hierbei war allerdings kein prinzipieller Unterschied zwischen dem intrazellulären und dem Oberflächenpeptidpool erkennbar. Beide Massenprofile wurden durch wenige diskrete Peptidspezies dominiert, die sich dem immundominanten DR1-Epitop aus HLA-A2 zuordnen lassen. Möglicherweise läuft bei Jesthom der Editierprozeß so schnell ab, daß er bereits kurz nach dem Beladen abgeschlossen ist. Dies würde auch erklären, warum das Jesthom-Profil außer den Varianten des A2-Epitops kaum andere Peptide aufweist.

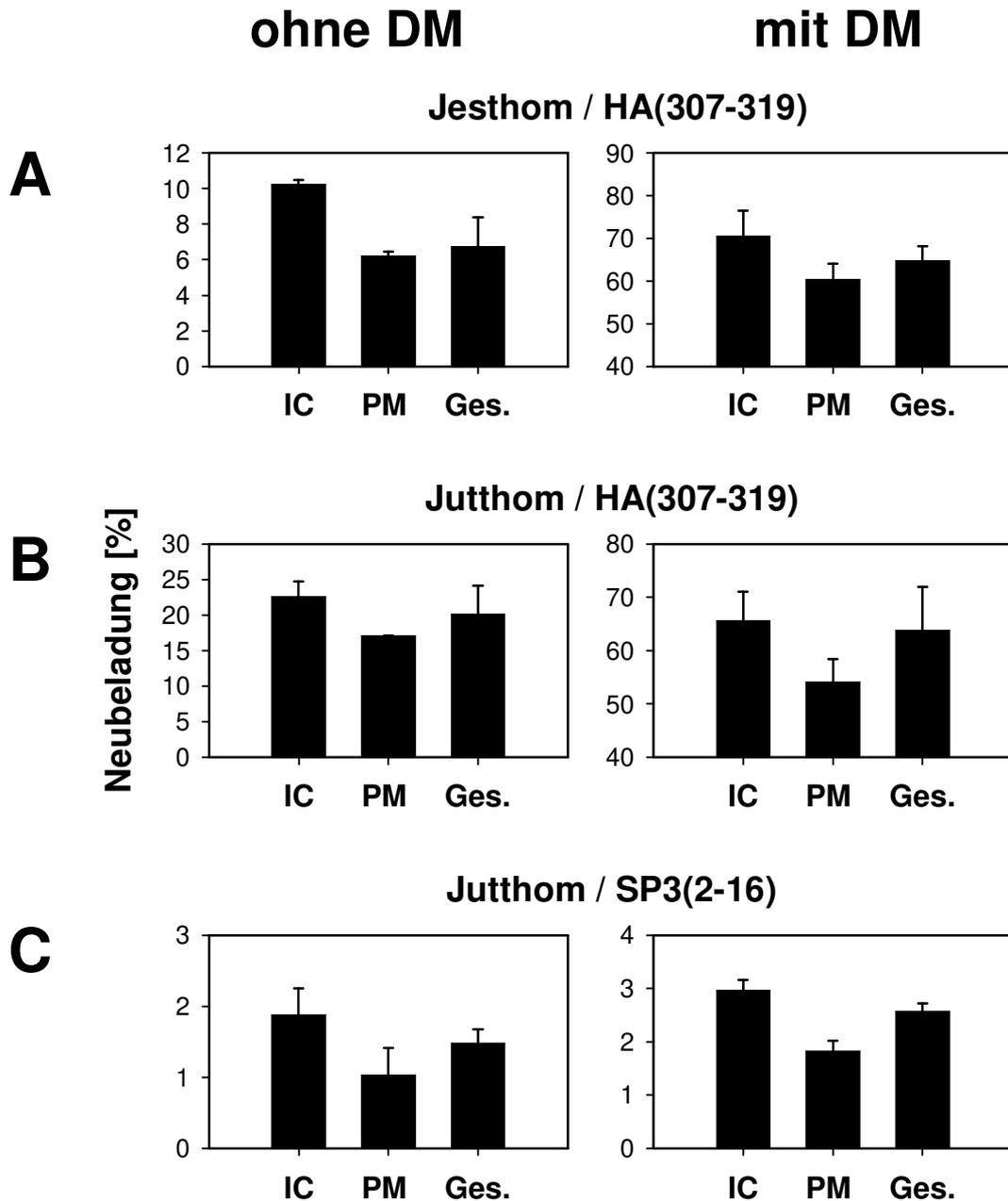
**Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß im Fall der Zelllinie Jutthom die DR-assoziierten Peptide der Plasmamembranfraktion im Durchschnitt 2 bis 3 Aminosäuren länger sind als die der intrazellulären Organellen. Außerdem werden in der Oberflächenfraktion Peptide beobachtet, die im intrazellulären Pool fehlen.**

### **3.1.2.3 Vergleich der Stabilität des DR-assoziierten Peptidrepertoires: Plasmamembran vs. intrazelluläre Kompartimente**

Durch *in vitro*-Experimente ist nachgewiesen worden, daß HLA-DM den Austausch von instabilen gegen stabile Peptide katalysiert (Kropshofer et al., 1996). Dieser Editierprozeß führt zur einer Erhöhung der Stabilität des Peptidrepertoires. Um zu untersuchen, ob auch der obige Austauschprozeß mit einer Erhöhung der Stabilität einhergeht, wurden DR1-Isolate aus Jutthom und Jesthom (vgl. 3.1.2.2) im HPSEC-Bindungsassay bezüglich ihrer Stabilität verglichen. Dazu wurden sie mit einem Überschuß an AMCA-markiertem Reporterpeptid in An- und Abwesenheit von DM bei pH 5,1 inkubiert. Als Reporterpeptide wurden zwei DM-insensitive Peptide (Kropshofer et al., 1996) verwendet: das im DR1-Kontext hochstabile HA(307-319) Peptid und das nicht ganz so stabile SP3(2-16) Peptid. Anschließend wurde der Anteil an beladenen DR1-Molekülen quantifiziert.

Aus Abb. 3.9 ist zu ersehen, daß das Oberflächenrepertoire in sämtlichen Fällen stabiler ist als das intrazelluläre Repertoire, denn die Neubeladung mit AMCA-Peptiden erfolgt schwerer. Das Gesamtzellrepertoire nimmt, wie erwartet, eine Position dazwischen ein. Ob die Beladung der Isolate in An- oder in Abwesenheit von DM durchgeführt wird, ändert nur die Höhe der Beladung, nicht aber das prinzipielle Ergebnis. Verglichen mit der Plasmamembran steigt die Beladbarkeit der intrazellulären DR1-Moleküle um 20 bis 60%. Dieser Anstieg ist zwar nicht dramatisch, aber signifikant meßbar. Auffällig ist die Tatsache, daß die Beladbarkeit mit dem SP3-Peptid erwartungsgemäß sehr niedrig ausfällt, die Unterschiede in der Beladbarkeit aber mit dem weniger stabilen Reporterpeptid SP3 höher ausfallen als mit dem hochstabilen HA-Peptid. Auch dies ist ein Hinweis, daß die Verfügbarkeit von hochstabil-bindenden Peptiden begrenzt ist und die Zelle daher gezwungen ist, auch auf weniger stabile Peptide zurückzugreifen.

Die Ergebnisse demonstrieren, daß im Vergleich zum intrazellulären Peptidrepertoire die Stabilität des Oberflächenrepertoires von DR1 signifikant höher ist. Dieser Befund stützt die These, daß DM an einem Editierprozeß beteiligt ist, der die Stabilität der MHC Klasse II:Peptid-Komplexe auf ihrem Weg zur Plasmamembran erhöht.



**Abb. 3.9:** Bindung eines Reporterpeptids (AMCA-HA bzw. AMCA-SP3) an DR1-Isolate einzelner Fraktionen

HPSEC-Bindungsassay: DR1-Isolate (80 nM) aus Jesthom (A) oder aus Jutthom (B&C) wurden mit AMCA-markiertem HA(307-319) (6  $\mu$ M, A&B) oder mit AMCA-markierten SP3(2-16) (6  $\mu$ M, C) in Anwesenheit von DM (50nM, rechte Reihe) bzw. in Abwesenheit von DM (linke Reihe) bei pH 5,1 und 37° C inkubiert. Anschließend wurde der Anteil der neu beladenen DR1-Molekülen quantifiziert. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen an.

## **3.2 Vorkommen und Funktion von HLA-DM auf der Zelloberfläche**

Wie bei der Quantifizierung von MHC Klasse II-Molekülen auf der Plasmamembran nachgewiesen wurde (3.1.2.1), befindet sich eine beträchtliche Subpopulation von HLA-DM auf der Zelloberfläche. Dieser Befund steht im Gegensatz zur vorherrschenden Meinung in der Literatur (Denzin et al., 1994; Sanderson et al., 1994; Karlsson et al., 1994). Daher wird in diesem Kapitel zunächst mit zwei weiteren, unabhängigen Methoden nachgewiesen, daß sich DM tatsächlich auf der Zelloberfläche befindet. Anschließend wird die Frage nach der Funktion dieser Oberflächenpopulation von DM erörtert.

### **3.2.1 Nachweis von HLA-DM auf der Zelloberfläche**

#### **3.2.1.1 FACS-Analyse**

Um DM auf der Plasmamembran flußzytometrisch nachzuweisen, wurde das Kaninchenantisera 11323 verwendet. Dabei handelt es sich um ein polyklonales Serum, das gegen rekombinantes DM, dem die Transmembrandomäne und der zytosolische Schwanz fehlen, hergestellt wurde. Dieses Serum wurde bereits in der Immunpräzipitation (Busch et al., 1998) und in der FACS-Analyse (Liu et al., 1998) eingesetzt und hat dort seine Spezifität unter Beweis gestellt.

Die flußzytometrische Analyse der Transfektanten T2.DR4.DM sowie der B-Zelllinien WT-100 und Jethom zeigte, daß DM auf der Oberfläche exprimiert wird (Abb. 3.10). Dagegen ist die Transfektante T2.DR4, der die MHC Klasse II-Region und damit DM im Genom fehlt, tatsächlich negativ. Aus der FACS-Analyse geht weiter hervor, daß alle Zellen normale DR-Expression zeigen.

#### **3.2.1.2 Immunpräzipitation von Oberflächen-MHC Klasse II-Molekülen**

Der dritte Nachweis, daß sich DM sehr wohl auf der Oberfläche befindet, wurde über die Immunpräzipitation von Oberflächen-DR-Molekülen geführt. Dabei wurden intakte Jethom-Zellen mit dem biotinylierten L243-Antikörper, der eine extrazytoplasmatische Domäne von HLA-DR erkennt, bei 4° C inkubiert. Da bei dieser Temperatur keine Internalisierung stattfinden kann, ist gewährleistet, daß der Antikörper ausschließlich von außen bindet. Nach erfolgter Detergenzlyse mit NP-40 oder CHAPS wurden die Antikörper:DR-Komplexe über NeutrAvidin-Beads (eine immobilisierte Form des Avidins) isoliert. Diese Vorgehensweise erlaubte es, DR selektiv von der Plasmamembran zu präzipitieren und auf andere Proteine, die mit DR einen Komplex bilden, zu analysieren.

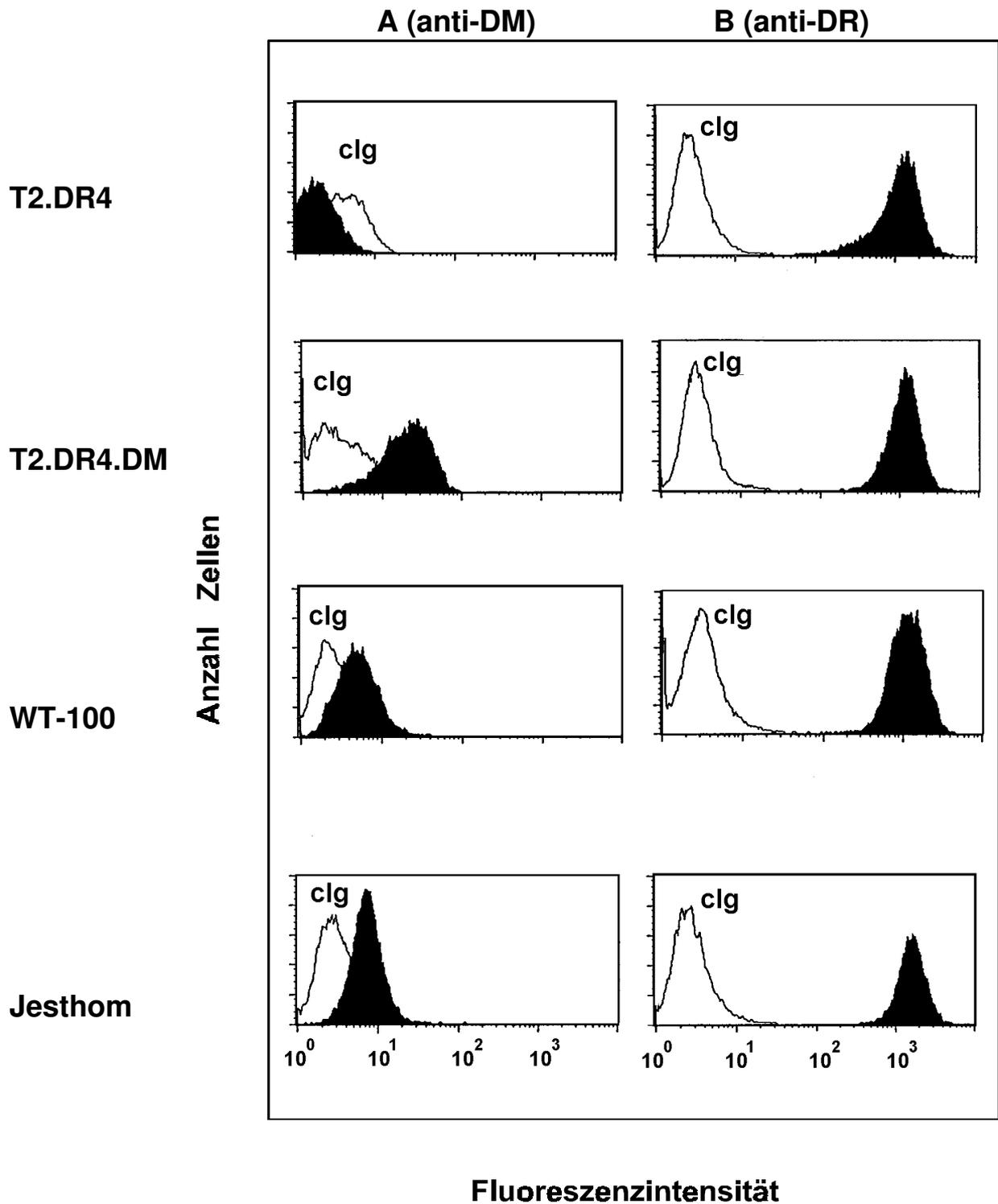
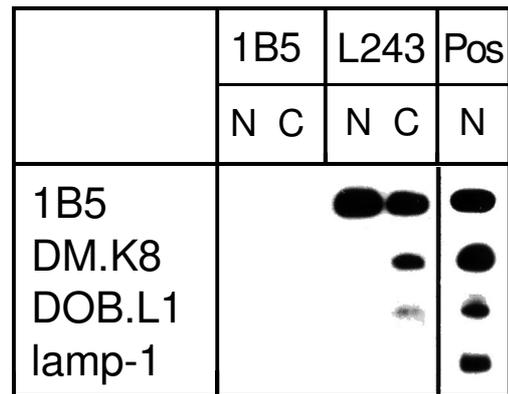


Abb. 3.10: FACS-Analyse verschiedener Zelllinien auf HLA-DM und HLA-DR

T2.DR4, T2.DR4.DM, WT-100 und Jesthom wurden flußzytometrisch mit Kaninchenantiserum 11323 (A) auf DM-Expression sowie mit dem biotinylierten Antikörper L243 (B) auf DR-Expression untersucht (schwarze Profile). Die Hintergrundkontrolle wurde mit einem irrelevanten Kaninchenantiserum (A) bzw. einem irrelevanten Mausantikörper gleichen Isotyps (B) durchgeführt (weiße Profile).

Abb. 3.11 zeigt, daß sowohl DM als auch DO, aber nicht das Kontrollprotein lamp-1 mit Oberflächen-DR co-immunpräzipitieren, wenn die Zellen in CHAPS lysiert wurden. Dies war jedoch nicht der Fall, wenn die Zellen mit dem stärkeren Detergenz NP-40 lysiert wurden. Dies wurde bereits von der Gruppe von Trowsdale beobachtet (Sanderson et al., 1996), da die DR:DM-Komplexe in NP-40 dissoziieren. Um auszuschließen, daß einige Zellen nicht intakt waren und so intrazelluläres DR hätte präzipitiert werden können, wurde dasselbe Experiment parallel mit biotinyliertem IB5-Antikörper durchgeführt. Dieser Antikörper erkennt ein Epitop auf der zytosolischen Seite von DR $\alpha$  und kann daher nicht an die Oberfläche von intakten Zellen binden, sondern nur an Zelltrümmer oder Zellen, die ihre Integrität verloren haben. Abb. 3.11 zeigt deutlich, daß der 1B5-Antikörper weder DR noch ein anderes Protein präzipitiert. Dieses Experiment ist auch mit WT-100-Zellen durchgeführt worden und bestätigte das vorliegende Ergebnis (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.11: Immunpräzipitation von Oberflächen-DR**

Jesthom-Zellen wurden mit den Antikörpern IB5 oder L243 bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 1% NP-40 (N) oder in 1% CHAPS (C) lysiert. Antikörper:DR-Komplexe wurden präzipitiert und anschließend durch Western Blotting auf DR $\alpha$ , DM $\beta$ , DO $\beta$  und lamp-1 analysiert.

Ein NP-40-Lysat von Jesthom-Zellen diente als Positivkontrolle (Pos)

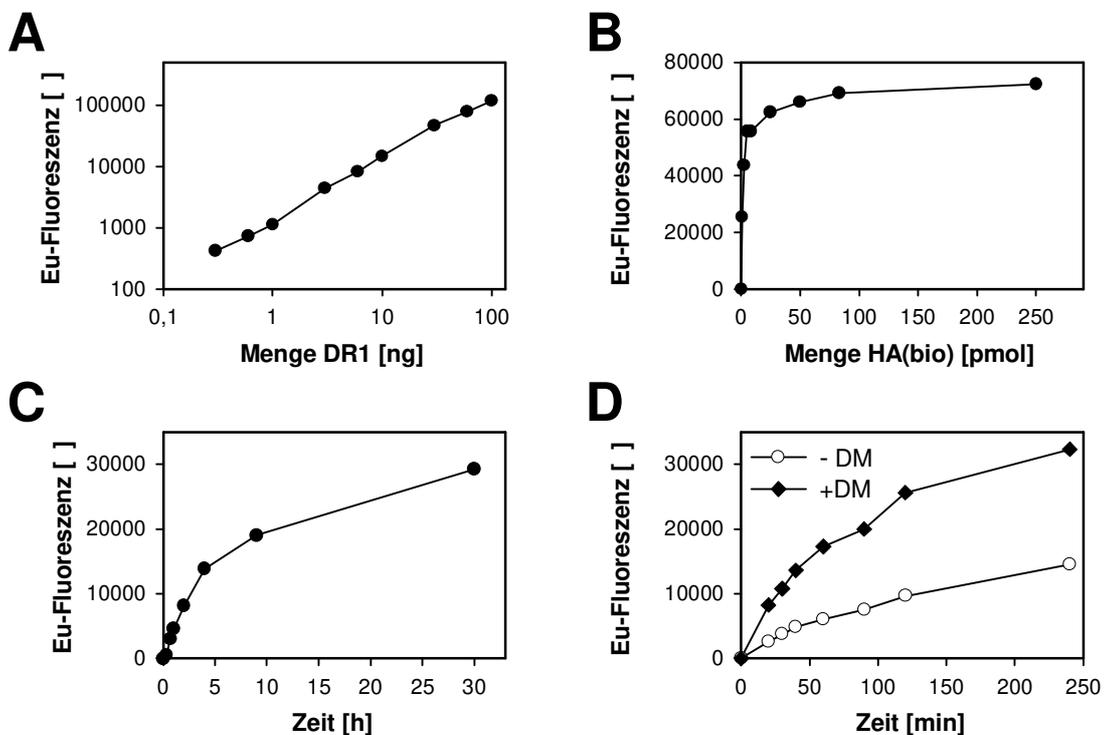
**Damit ist durch drei unabhängige Methoden, nämlich Biotinylieren und anschließendes Präzipitieren sämtlicher Oberflächenmoleküle (3.1.2.1), FACS-Analyse (3.2.1.1) sowie Präzipitation von Oberflächen-DR (3.2.1.2), nachgewiesen worden, daß DM sowohl von der Transfektanten T2.DR4.DM als auch B-Zelllinien auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Gemäß der Quantifizierung beträgt der Anteil von DM auf der Oberfläche bezogen auf die DM-Gesamtmenge ca. 10 bis 15%.**

### 3.2.2 Etablierung eines Nachweises von DR:Peptid-Komplexen

Aus dem Wissen über die Funktionsweise von DM entstand die Arbeitshypothese, daß Oberflächen-DM möglicherweise die Antigenbeladung von MHC II-Molekülen beeinflussen würde. Daher wurde ein quantitatives Testsystem für die Beladung von MHC Klasse II-Molekülen etabliert, das den subzellulären Gegebenheiten Rechnung trägt und das möglicherweise zwischen lysosomalem DM und Oberflächen-DM unterscheiden kann. Konkret sollten intakte B-Zellen zusammen mit einem markierten Peptid inkubiert werden, so daß diese das exogene Peptid endozytieren und dann beladen können. Der Vorteil dieses Mo-

delsystems liegt darin, daß die Beladung *in vivo* abläuft und damit die subzellulären Gegebenheiten automatisch berücksichtigt werden. Nach Lyse der Zellen sollten die neu beladenen DR:Peptid-Komplexe quantifiziert werden. Dazu wurde zunächst ein Sandwich-Immunoassay etabliert und unter *in vitro*-Bedingungen validiert.

Bei diesem Nachweis wurden Mikrotitrationsplatten mit einem monoklonalen Antikörper, der DR:Peptid-Komplexe bindet, durch passive Absorption beschichtet. Die Peptid-Antigene wurden biotinyliert eingesetzt, so daß die Quantifizierung der Komplexe über Streptavidin erfolgen konnte, an das über einen Chelator Europium-Ionen gekoppelt waren. Die  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen, deren Menge sich proportional zur Menge an DR:Peptid(bio)-Komplexen verhält, wurden anschließend über ihre Lanthanidfluoreszenz bestimmt. Dabei handelt es sich um eine sehr langlebige Fluoreszenz ( $\tau = 500\text{ns}$ ) mit einem großen Stock'schen Shift (ca. 300 nm), die es erlaubt,  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen selektiv und äußerst sensitiv (bis ca. 10 attomol) nachzuweisen.



**Abb. 3.12: Etablierung eines Sandwich-Immunoassays für DR:Peptid(bio)-Komplexe**

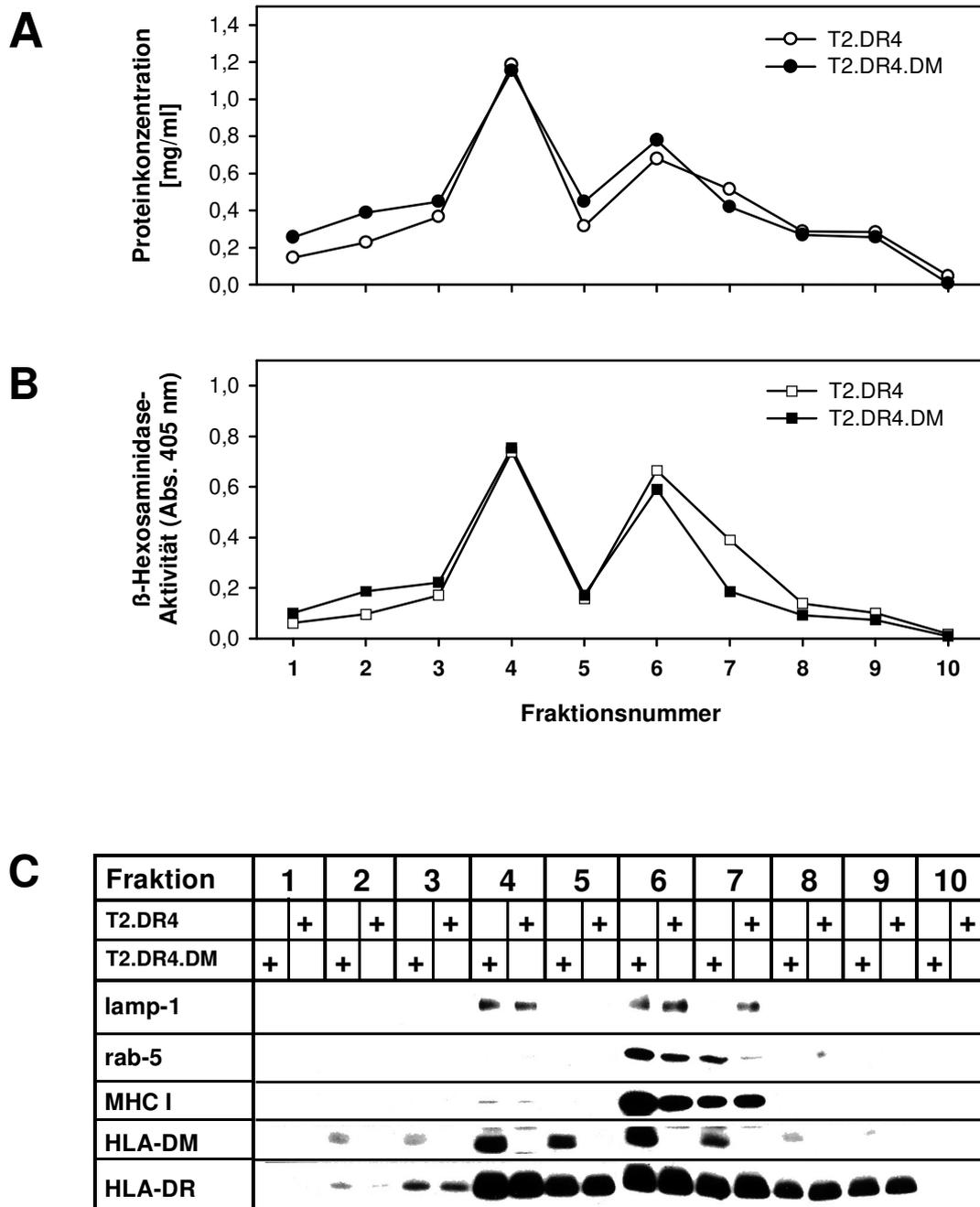
- (A) Titration der DR:HA(bio)- Menge: DR1 aus T2.DR1 wurde mit dem 200xfachen Überschuß an HA(307-319)-Bio bei pH 4,8 und 37° C 2 Tage inkubiert. Anschließend wurde unterschiedliche Mengen (0,3 bis 100ng) quantifiziert.
- (B) Titration der HA(bio)-Konzentration: 0,83 pmol DR1 wurden mit unterschiedlichen Mengen HA(bio)-Peptid (0,83 bis 250 pmol) bei pH 4,8 und 37° C 1,5 Tage inkubiert, anschließend wurden DR:Peptid(bio)-Komplexe quantifiziert.
- (C) Kinetik in Abwesenheit von DM: 0,67 pmol DR1 wurden mit 6,67 pmol HA(bio)-Peptid bei pH 4,8 und 37° C inkubiert. Aliquots wurden zu verschiedenen Zeiten abgenommen (0 bis 30h) und DR:Peptid(bio)-Komplexe quantifiziert.
- (D) Kinetik in Ab- und Anwesenheit von DM: 0,50 pmol DR1 wurden mit 5,0 pmol HA(bio)-Peptid bei pH 4,8 und 37° C in Ab- oder in Anwesenheit von DM (0,07 pmol) inkubiert. Aliquots wurden zu verschiedenen Zeiter abgenommen (0-4h) und DR:Peptid(bio)-Komplexe quantifiziert.

### **Diese Experimente zeigen, daß mit Hilfe dieses Fluoreszenzimmunoassays DR:Peptid-Komplexe unter verschiedenen Bedingungen quantitativ bestimmt werden können.**

Ausgangsmaterial für diese Experimente war ein DR1-Isolat aus der Zelllinie T2.DR1, das ausschließlich mit CLIP-Varianten beladen ist und daher leicht mit anderen Peptiden beladen werden kann. Dieses wurde 2 Tage lang bei pH 4,8 und 37° C mit einem großen Überschuß an biotinyliertem HA(307-319)-Peptid inkubiert. Da dieses Peptid an DR1 sehr stabil bindet, ist der Austausch unter diesen Bedingungen quasi quantitativ. Anschließend wurde ein Verdünnungsreihe erstellt, und die Menge an DR1:HA(bio)-Komplexen bestimmt. Wie aus Abb. 3.12 (A) hervorgeht, erstreckt sich der lineare Meßbereich über mehr als zwei Dekaden und ist damit im Vergleich zu einem konventionellen ELISA um eine Dekade breiter. Im nächsten Experiment sollte nachgewiesen werden, daß die Signalintensität nicht nur von der Menge an DR1, sondern auch von der eingesetzten Peptidkonzentration abhängt und damit für DR1:HA(bio)-Komplexe spezifisch ist. Dazu wurde eine konstante Menge DR1-Isolat mit verschiedenen Mengen HA(bio)-Peptid 36h bei pH 4,8 und 37° C inkubiert. In Abb. 3.12 (B) ist die  $Eu^{3+}$ -Fluoreszenz gegen den molaren Überschuß an HA-Peptid aufgetragen. Die Intensität steigt, wie erwartet, mit steigendem Peptidüberschuß an und erreicht bei sehr hohem Überschuß dann schließlich ein Plateau. Die Gleichgewichtseinstellung für diesen Peptidaustausch dauert, wie bekannt ist, in Abwesenheit des Katalysators DM sehr lange (ca. 50h). Der kinetische Verlauf sollte mit dem Sandwichimmunoassay nachvollzogen werden: Dazu wurde eine konstante Menge DR1-Isolat mit dem 10fachen molaren Überschuß an HA(Bio)-Peptid bei pH 4,8 und 37° C inkubiert, und nach verschiedenen Zeitpunkten ein Aliquot abgenommen. Dieses Experiment wurde zunächst nur in Abwesenheit von DM (Abb. 3.12 (C)) durchgeführt. Bei der anschließenden Wiederholung wurde parallel dazu die Beladung in Anwesenheit von DM gemessen (Abb. 3.12 (D)). Die erste Kinetik spiegelt den langsame Reaktionsverlauf wider, erst am Ende der 30-stündigen Inkubation scheint die Reaktion auf ein Plateau zuzulaufen. Bei der zweiten Kinetik wird die Wirkung von DM sichtbar: die Beladung verläuft beschleunigt, daher werden das Plateau und damit die Gleichgewichtseinstellung schneller erreicht.

### **3.2.3 Einfluß von DM auf die subzelluläre Verteilung von MHC Klasse II**

Um den Einfluß von DM zu demonstrieren, sollten mit Hilfe des in vivo-Beladungsassays, T2.DR4 mit ihrer DM-transfizierten Schwesterzelllinie T2.DR4.DM verglichen werden. Dabei sollten Unterschiede in ihrem Beladungsverhalten dem Einfluß von DM zugeschrieben werden, weil beide Zelllinien ähnliche Mengen an DR4 exprimieren und sich nur in der DM-Expression unterscheiden. In der Vergangenheit gab es allerdings einen Bericht (Riberdy et al., 1994), nach dem die Transfektante T2.DR3 in ihrer Morphologie und in ihrer subzellulären MHC Klasse II-Verteilung erheblich von DM-positiven Zellen abweicht. Da sich die T2.DR3-



**Abb. 3.13: Analyse der sequentiellen Percoll-Dichtegradientenzentrifugation von T2.DR4 vs. T2.DR4.DM**

T2.DR4- und T2.DR4.DM-Zellen wurden nach ihrem Aufschluß durch Homogenisieren getrennt auf einem 20%-Percollgradienten getrennt. Danach wurde die obere Hälfte auf 10% Percoll, die untere Hälfte auf 40% Percoll eingestellt und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden beide Gradienten in jeweils 10 Fraktionen getrennt, zu Doppelfraktionen vereinigt und analysiert.

- (A) Verteilung des Gesamtproteins über den Dichtegradienten ( $\lambda$  bzw.  $\gamma$ )  
 (B) Verteilung der Enzymaktivität des lysosomalen Markers  $\beta$ -Hexosaminidase ( $v$  bzw.  $o$ )  
 (C) Western Blot-Analyse: Verteilung der Markerproteine lamp-1 (spezifisch für Lysosomen und späte Endosomen), rab-5 (spezifisch für frühe Endosomen) und MHC Klasse I (spezifisch für ER, Golgi, Plasmamembran). Vergleich mit der Verteilung der MHC Klasse II-Proteine HLA-DM und HLA-DR.

Zellen von den hier verwendeten T2.DR4-Zellen nur in dem transfizierten DR-Allel unterscheiden, liegt der Verdacht nahe, daß auch T2.DR4 eine veränderte Klasse II-Verteilung aufweisen würden und somit der Beladungsprozeß mit dem der Schwesterzelle nicht direkt vergleichbar wäre. Durch die getrennte Fraktionierung von T2.DR4- und T2.DR4.DM-Zellen über einen Percoll-Dichtegradienten und den Vergleich der Verteilung von MHC Klasse II sollte dieser Hypothese nachgegangen werden.

Aus der Analyse der Dichtegradienten geht hervor, daß nicht nur die Verteilung des Gesamtproteins, sondern auch die der einzelnen Marker sehr ähnlich ist. Folglich sind die Zelllinien T2.DR4 und T2.DR4.DM identisch fraktioniert worden. Der Dichtegradient hat dabei die Organellen beider Zelllinien in zwei Gruppen separiert (Abb. 3.13 A bis C): Die erste Gruppe enthält das Markerprotein lamp 1 und das Enzym  $\beta$ -Hexosaminidase, dessen Hauptaktivität in Fraktion 4 akkumuliert. Diese Gruppe besteht daher aus sauren Kompartimenten, wie Lysosomen und späten Endosomen. Die leichten Fraktionen (6 bis 9) waren die einzigen, in denen MHC Klasse I (Marker für ER, Golgi und Plasmamembran) und rab-5 (Marker für frühe Endosomen) nachgewiesen wurden. Demnach bestehen die Fraktionen 6-9 aus einer Mischung aus ER, Golgi, frühen Endosomen und Plasmamembran, die durch sauren Organellen kontaminiert sind. DM kommt erwartungsgemäß nur in den Fraktionen von T2.DR4.DM vor, während die Verteilung von DR bei beiden Zelllinien über den kompletten Gradienten identisch ist. **DM hat im Kontext der T2.DR4-Transfektante keinen Einfluß auf die subzelluläre MHC Klasse II-Verteilung.**

### 3.2.4 DM beschleunigt die Beladung von exogenen Peptiden

Mit Hilfe des *in vivo*-Beladungsassays sollte der Einfluß von DM auf die Beladung exogener Peptide untersucht werden: T2.DR4- und T2.DR4.DM-Zellen wurden mit einem biotinylierten Peptid exogen gepulst, anschließend wurde die Menge der neu beladenen DR:Peptid Komplexe mit dem etablierten Sandwichimmunoassay quantifiziert. Als Peptid wurde HA(307-319), das immundominante Epitop von Influenzavirus-Hämagglutinin im Kontext von DR4, verwendet.

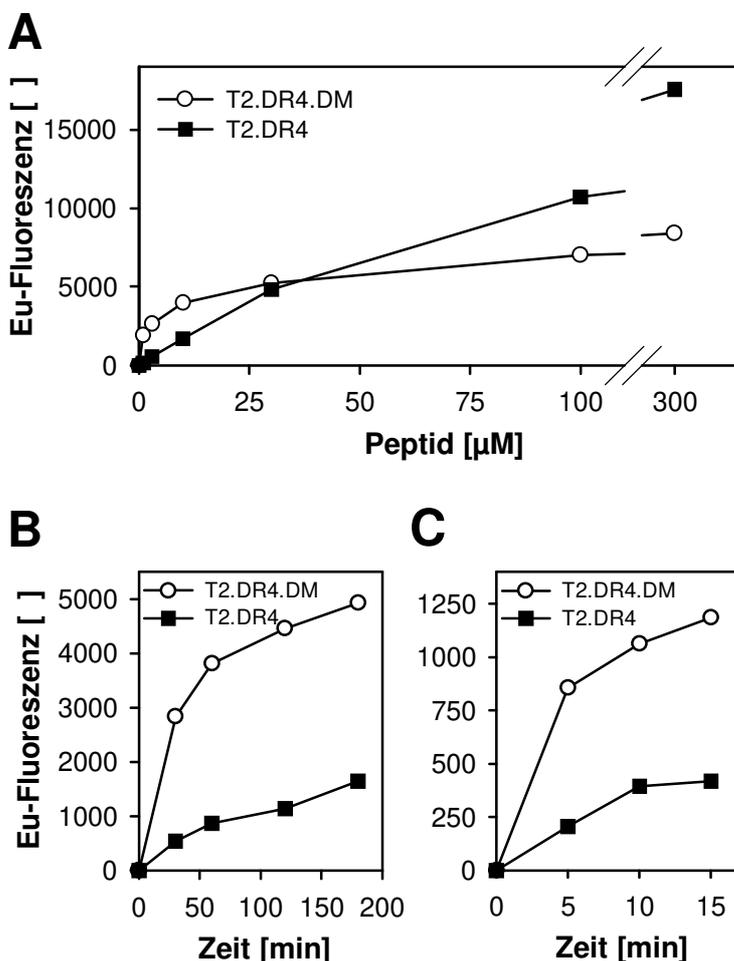
Welche der beiden Zelllinien im gleichen Zeitraum stärker beladen wird, hängt von der Rolle von DM bei der Beladung exogenen Peptids ab: Wird die Beladung durch DM beeinflusst, würde man erwarten, daß die T2.DR4.DM-Zellen vermehrt beladen werden. Spielt DM hingegen keine Rolle bei der Beladung von exogenen Peptiden, dann sollten die T2.DR4.DM-Zellen keinen Vorteil gegenüber T2.DR4 haben. Das Titrationsexperiment (Abb. 3.14 A), bei dem die Konzentration des HA(bio)-Peptids variiert wurde, zeigt, daß beide Fälle zutreffen: Bei niedrigen Dosen ist T2.DR4.DM, bei hohen Peptidkonzentrationen die DM-negative Transfektante im Vorteil. Auch unterscheiden sich die Peptidkonzentrationen, bei der die halbmaximale Beladung eintritt, erheblich. Im Fall der DM-positiven Transfektante wurde sie bereits bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M erreicht, während bei den T2.DR4-Zellen mehr als

50  $\mu\text{M}$  nötig waren. Daraus läßt sich folgern, daß mindestens zwei Beladungsmechanismen, ein DM-abhängiger und ein DM-unabhängiger, existieren und beide simultan ablaufen.

Der Grund, warum beide Fälle gleichzeitig eintreten können, liegt in den verschiedenen Reaktionsmechanismen: Die DM-katalysierte Reaktion folgt der Michalis-Menten-Kinetik, und der entscheidene Schritt ist dabei die Bildung des DR:DM-Komplexes (Vogt et al., 1996). Daher ist die Reaktionsgeschwindigkeit der DM-vermittelten Beladung von der Konzentration des Peptids unabhängig. Die DM-unabhängige Beladung indessen folgt dem Massenwirkungsgesetz und hängt somit stark von der Peptidkonzentration ab. Zusammengenommen führt dies dazu, daß bei niedrigen Konzentration die DM-vermittelte Beladung überwiegt, während bei hohen Konzentrationen diese durch die DM-unabhängige Beladung zurückgedrängt wird.

Auffällig ist auch die unterschiedliche Höhe der Plateaus im Sättigungsbereich. Dem liegt nicht etwa eine unterschiedliche Verfügbarkeit von MHC Klasse II-Molekülen zugrunde, sondern das unterschiedliche Peptidrepertoire von T2.DR4.DM und T2.DR4: Das erstere enthält nämlich keine nennenswerten Mengen an CLIP und ist deshalb stabiler. Daraus läßt sich ableiten, daß T2.DR4 mehr DR4:Peptid-Komplexe bilden kann.

Bei dem nachfolgenden Experiment wurde der zeitliche Verlauf der Beladung untersucht. Dies ist von Interesse, da die Kinetik nicht nur Rückschlüsse auf eine Beteiligung des Katalysators zuläßt, sondern auch erste Hinweise auf den Ort des Geschehens gibt. Eine Beteili-



**Abb. 3.14: Beladung von exogenem Peptid bei den Zelllinien T2.DR4 und T2.DR4.DM**

(A) Titration der Peptidmenge T2.DR4 und T2.DR4.DM-Zellen wurden mit steigenden Mengen biotinyliertem HA-Peptid (Bio-HA) bei 37° C 3h inkubiert. Die Zellen wurden in 1% NP 40 lysiert, und DR4:HA(bio)-Komplexe im Lysat quantifiziert.

(B) Kinetik der Beladung T2.DR4 und T2.DR4.DM-Zellen wurden mit Bio-HA [15 (M) bei 37° C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Zellen wurden in 1% NP 40 lysiert, und DR4:HA(bio)-Komplexe im Lysat quantifiziert.

(C) Kinetik der Beladung Wiederholung von (B): Feinanalyse der ersten 15 min

gung von lysosomalem DM an der Beladung setzt nämlich die Endozytose und den Transport von exogenem Peptid zu den späten Endosomen oder Lysosomen voraus, ein Prozeß der mindestens 30 min in Anspruch nimmt. Dies müßte zwangsläufig zu einer anfänglichen Verzögerung der Beladung führen. Tatsächlich wurde aber bei beiden Zelllinien genau das Gegenteil beobachtet (Abb. 3.14 B). Bei den T2.DR4-Zellen ist die Beladung recht langsam. Die Anwesenheit von DM hingegen beschleunigt diesen Prozeß so erheblich, daß eine halbmaximale Beladung bereits nach 20 bis 25 Min erreicht wird. Auch eine anfängliche Verzögerung, selbst in den ersten 15 Minuten, kann nicht festgestellt werden (Abb. 3.14 C). Aus den Kinetiken der beiden Zelllinien ist daher zu ersehen, daß DM die Beladung von exogenen Peptiden katalysiert. Diese Beschleunigung tritt besonders in den ersten 30 min zutage und ist ein erster Hinweis dafür, daß DM von der Zelloberfläche an der Peptidbeladung beteiligt ist.

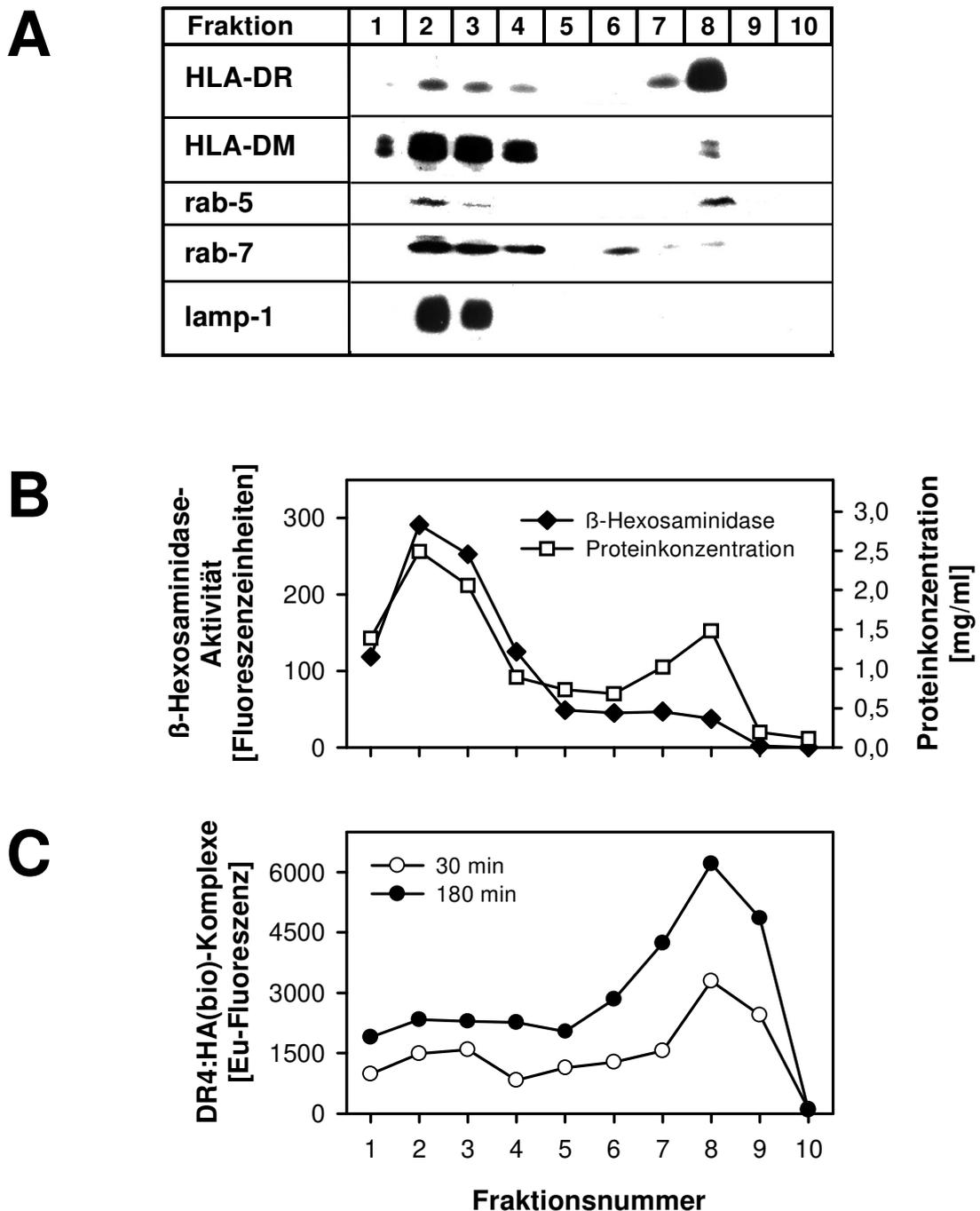
**Sowohl die Titration der Peptidmenge als auch die Kinetik weisen eine Beteiligung von DM am Beladungsprozeß nach. DM ermöglicht demnach die schnelle Beladung bei niedrigen Peptidkonzentrationen. Eine zeitliche Verzögerung bei der Katalyse des Beladungsprozesses, die bei einem Transport des endozytierten Peptids bis zum Lysosom zu erwarten wäre, ist nicht festzustellen. Dies ist daher ein Indiz, daß nicht das lysosomale DM, sondern das Oberflächen-DM bei der Beladung von DR mit exogenen Peptiden beteiligt ist.**

### 3.2.5 Subzelluläre Lokalisation der DM-vermittelten Katalyse

Die kinetischen Untersuchungen im vorangegangenen Abschnitt gaben bereits einen ersten Hinweis, daß Oberflächen-DM bei der DM-vermittelten Beladung involviert ist. Ziel der folgenden Untersuchungen ist es, diesen Befund weiter zu prüfen. Dazu soll mit Hilfe der subzellulären Fraktionierung gezeigt werden, welche Kompartimente an der DM-vermittelten Beladung beteiligt sind. Anschließend soll der Effekt eines DM-spezifischen Inhibitors auf die Beladung studiert werden. Da dieser Inhibitor nicht membrangängig ist, ist seine Wirkung auf die DM-Oberflächenpopulation beschränkt, und ermöglicht so die Unterscheidung von dem lysosomalen DM-Pool. Durch selektives Blockieren der Endozytose bzw. der Proteinbiosynthese sollen schließlich Hinweise auf die Beteiligung dieser beiden Prozesse an der Beladung gewonnen werden.

#### 3.2.5.1 Identifizierung von Beladungskompartimenten der DM-vermittelten Katalyse

Um weiter nachzuweisen, welcher DM-Pool an der Beladung exogener Peptide beteiligt ist, sollten die beteiligten Beladungskompartimente identifiziert werden. Dazu wurden T2.DR4.DM-Zellen erst mit HA-Peptid inkubiert, dann aufgeschlossen und schließlich über



**Abb. 3.15: Analyse der subzellulären Fraktionierung von beladenen T2.DR4.DM-Zellen**

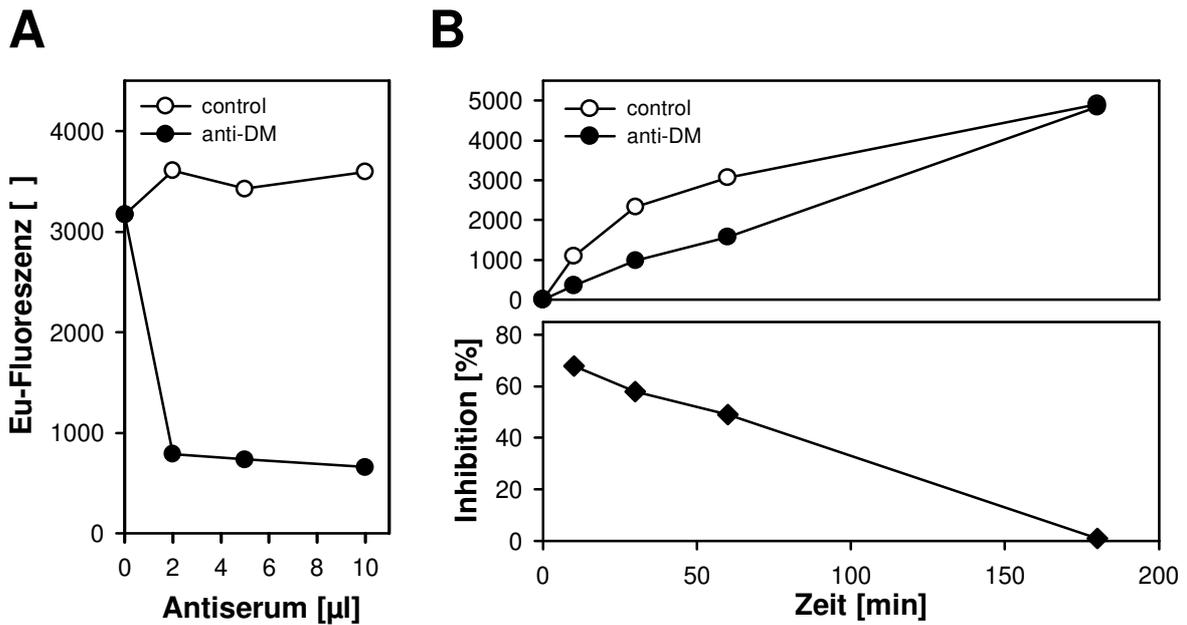
T2DR4.DM-Zellen wurden 30 min bzw. 3 Stunden mit HA(bio)-Peptid [15 $\mu$ M] bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert. Nach ihrem Aufschluß durch Homogenisieren wurden sie auf einem 20%-Percollgradienten getrennt. Anschließend wurden beide Gradienten in jeweils 10 Fraktionen getrennt.

- (A) Western Blot-Analyse: Verteilung der MHC Klasse II-Proteine HLA-DM und HLA-DR; Verteilung der Markerproteine rab-5 (spezifisch für frühe Endosomen), rab-7 (spezifisch für späte Endosomen) und lamp-1 (spezifisch für Lysosomen und späte Endosomen).
- (B) Verteilung der Enzymaktivität des lysosomalen Markers  $\beta$ -Hexosaminidase ( $\blacklozenge$ ) und Verteilung des Gesamtproteins ( $\square$ )
- (C) Verteilung der DR4:HA(bio)-Komplexe nach 30-minütiger ( $\circ$ ) oder nach 3-stündiger ( $\bullet$ ) Peptidinkubation

einen Percoll-Dichtegradienten subzellulär fraktioniert. Das Fraktionierungsprotokoll erlaubte es, die Organellen in zwei Gruppen zu teilen (Abb. 3.15 A und B): die Fraktionen 6 bis 9 enthalten die Kompartimente des Recyclingwegs, Plasmamembran und frühe Endosomen, wie sich aus der Verteilung des Markers für frühe Endosomen, rab-5, ableiten läßt. Die Fraktionen 1 bis 4 bestehen dagegen aus späten Endosomen und Lysosomen, da diese Fraktionen positiv für  $\beta$ -Hexosaminidaseaktivität sind, einem spät endosomal / lysosomalen Enzym, sowie positiv für das lysosomale Leitprotein lamp-1 und den Marker für späte Endosomen, rab-7 (Novick und Zerial, 1997). Wie erwartet, wird der Hauptteil von DM in den spät endosomal und lysosomalen Fraktionen gefunden, aber ein kleiner Teil kann auch in der Fraktion 8 nachgewiesen werden, die Plasmamembran und frühe Endosomen enthalten. Aus der Untersuchung auf DR4:HA-Peptidkomplexe mit Hilfe des Sandwichimmunoassays ergibt sich, daß der Hauptteil der neu beladenen Komplexe in den leichten Fraktionen 7 bis 9 fraktioniert (Abb. 3.15 C). Die Verlängerung der Inkubationszeit von 30 min auf 3 Stunden verdoppelte die Menge der DR4:HA-Komplexe, beeinflusste aber nicht deren Verteilung. Die DR4:HA-Komplexe kofraktionieren also mit dem Oberflächenpool von DM und nicht mit dem ungleich größeren DM-Pool aus den Lysosomen. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis, daß die Beladung durch DM von der Plasmamembran katalysiert wird.

### 3.2.5.2 Selektive Inhibition von Oberflächen-DM

Die physikalische Interaktion zwischen DM und DR ist eine notwendige Voraussetzung für die katalytische Aktivität von DM (Sloan et al., 1995, Sanderson et al., 1996, Kropshofer et al., 1996). Wird der direkte Kontakt zwischen den beiden Molekülen beispielsweise durch sterische Hinderung unterbunden, z.B. durch eine zusätzliche Glykosylierung an DR (Mellins et al., 1993) oder durch einen anti-CLIP Antikörper (Denzin et al., 1996) kann folglich keine Katalyse stattfinden. Diese Tatsache wurde ausgenutzt, um die Aktivität von DM zu inhibieren: Bei dem folgenden Experiment wurde die Beladung von T2.DR4.DM-Zellen mit exogenem Peptid in Gegenwart des polyklonalen anti-DM-Serums gemessen, das an DM spezifisch bindet (vgl. Abb. 3.10). Dabei wurde angenommen, daß die Bindung des Antiserums an DM zu der beabsichtigten sterischen Hinderung und damit zu einer Inhibition der DM-Aktivität führt. Tatsächlich trat genau dieser Fall ein: Die Beladung der T2.DR4.DM-Zellen wurde in Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Antiserums drastisch reduziert (Abb. 3.16 A). Diese Inhibition war spezifisch für DM: Ein irrelevantes Kaninchenantiserum, das als Negativkontrolle eingesetzt wurde, hatte keine Auswirkung auf die Beladung (Abb. 3.16 A). Umgekehrt hatte das DM-Antiserum ebenfalls keinen Einfluß auf die Beladung von T2.DR4-Zellen. Dieses Experiment lieferte neben dem Beweis der Spezifität auch einen Hinweis, daß nicht das lysosomale DM, sondern das Oberflächen-DM für die Beladung verantwortlich ist. Antikörper sind aufgrund ihrer Größe nicht plasmamembrangängig und können so intrazelluläre Moleküle nicht erreichen, d.h. ihre Bindung beschränkt sich auf Oberflächenmoleküle. Es ist jedoch möglich, vor allem bei 37 °C, daß die Antikörper z.B. via  $F_c$ -Rezeptoren internalisiert und zu den Lysosomen transportiert werden, wo sie dann ihre inhibitorische Wirkung entfalten könnten. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde ein Präinkubation mit dem Antise-



**Abb. 3.16: Selektive Inhibition von Oberflächen-DM**

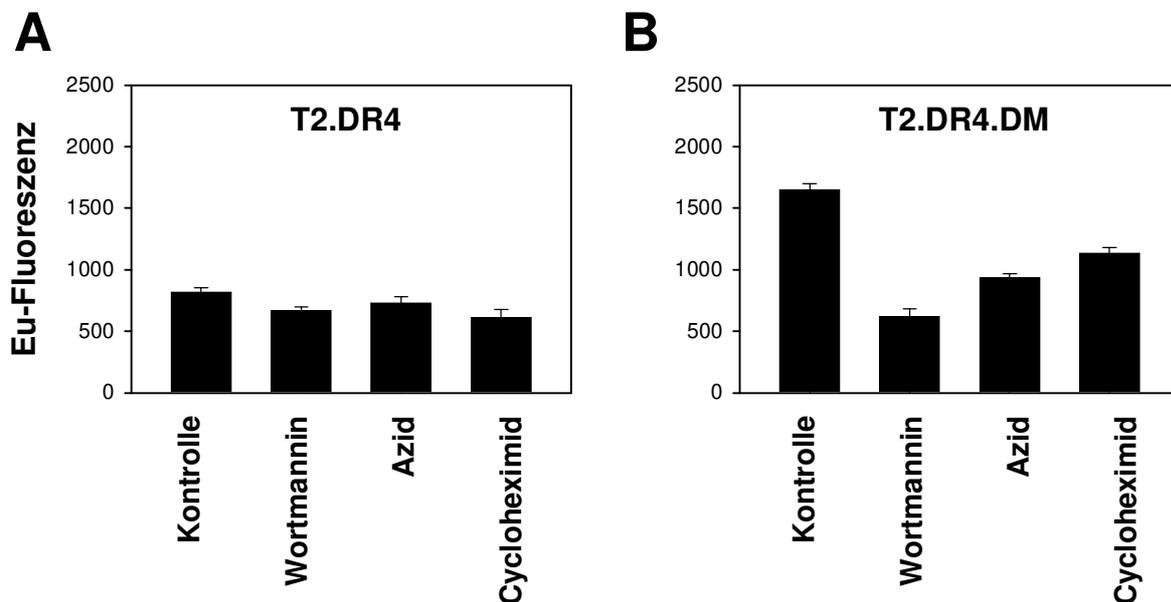
- (A) Die DM-vermittelte Beladung wird durch anti-DM-Serum inhibiert. T2.DR4.DM-Zellen wurden mit HA(bio)-Peptid [15 µM] und steigenden Mengen an DM-Antiserum 3 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Zellen wurden danach in 1% NP-40 lysiert, und DR4:HA(bio)-Komplexe wie beschrieben quantifiziert. Ein irrelevantes Kaninchenantiserum wurde als Kontrolle benutzt.
- (B) Anti-DM-Serum blockiert selektiv DM von der Zelloberfläche. T2.DR4.DM-Zellen wurden 30 min auf Eis mit dem DM-Antiserum oder einem Kontrollserum inkubiert. Das nicht gebundene Serum wurde nach der Inkubation durch Waschen der Zellen mit RPMI/FCS entfernt. Die Zellen dann mit HA(bio)-Peptid [15 µM] bei 37° C inkubiert und nach der jeweiligen Inkubationszeit in 1% NP-40 lysiert. DR4:HA(bio)-Komplexe wurden wie beschrieben quantifiziert. Die Inhibition für jeden Zeitpunkt errechnete sich aus der Beladung, die durch Vorbehandlung mit dem DM-Antiserum erhalten wurde, geteilt durch die Beladung des Kontrollansatzes.

rum durchgeführt und der zeitliche Verlauf der Inhibition betrachtet. T2.DR4.DM-Zellen wurden zunächst 30 min auf Eis mit Antiserum vorinkubiert, dann wurde durch Waschen das ungebundene Antiserum entfernt und anschließend eine Beladungskinetik durchgeführt. Bei dieser Versuchsdurchführung ist eine Internalisierung während der Vorinkubation auf Grund der niedrigen Temperatur ausgeschlossen. Wenn die Beladung durch lysosomales DM katalysiert würde, müßte folglich die Inhibition in der ersten halbe Stunde erst noch ansteigen, da die Antikörper diese Zeit bräuchten, bis sie den lysosomalen Pool überhaupt erreichten. Gemessen wurde allerdings, daß die Inhibition am Anfang maximal ist und mit der Zeit nachläßt. Das schnelle Eintreten der Wirkung ist nur damit zu erklären, daß das Antiserum DM in Kompartimenten hemmt, zu denen es einen direkten Zugang hat. Folglich ist für die DM-vermittelte Katalyse Plasmamembran-ständiges und nicht lysosomales DM entscheidend.

### 3.2.5.3 Einfluß von Endozytose und Proteinbiosynthese

Mit den vorherigen Experimenten ist die Beteiligung von Oberflächen-DM an der Beladung exogener Peptide nachgewiesen worden. Damit ist jedoch die Frage, welche Kompartimente an der Beladung beteiligt sind, bzw. wo die Beladung stattfindet, noch nicht beantwortet. Bekanntlich wird ständig ein Teil der DR-Oberflächenpopulation in frühe Endosomen internalisiert, um dann anschließend auf die Plasmamembran zurücktransportiert zu werden (Reid und Watts, 1990). Neben der direkten Beladung auf der Plasmamembran ist daher auch eine Beladung in den frühen Endosomen im Zuge des Recyclingwegs denkbar. Dazu müßte allerdings DM von der Oberfläche internalisiert werden, um dann in den frühen Endosomen die Beladung von DR-Molekülen zu katalysieren. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Einfluß von Endozytose-Inhibitoren auf die Beladung sowohl der DM-negativen als auch der DM-positiven Transfektante untersucht.

Dazu wurden T2.DR4 und T2.DR4.DM-Zellen 30 min bei 37° C mit Wortmannin, Natriumazid oder Cycloheximid behandelt. Danach wurde HA-Peptid zugegeben, und die Zellen wurden weitere 30 min inkubiert. Wortmannin ist ein sehr spezifischer und sehr potenter Inhibitor von Phosphatidylinositol-3-Kinasen und hemmt sowohl die Flüssigphasen- als auch die Rezeptor-vermittelte Endozytose (Li et al., 1995). Wie aus Abb. 3.17 A hervorgeht, hat Wortmannin keine signifikante Auswirkungen auf die Beladung von T2.DR4-Zellen. Dies deutet darauf hin, daß die Beladung bei dieser Zelllinie direkt auf der Oberfläche und deshalb Endozytose-unabhängig abläuft. Bei der DM-positiven Transfektante reduziert dieser Inhibitor jedoch die



**Abb. 3.17: Einfluß von Inhibitoren der Endozytose oder der Proteinbiosynthese**

T2.DR4 (A) und T2.DR4.DM-Zellen (B) wurden 30 min bei 37° C in der Abwesenheit (Kontrolle) oder in der Anwesenheit von Wortmannin (5 µM), Azid (20 mM) oder Cycloheximid (10 µg/ml) vorbehandelt. Danach wurde HA(bio)-Peptid (15 µM) zugefügt. Die Zellen wurden weitere 30 min bei 37° C inkubiert und schließlich mit 1% NP-40 lysiert. DR4:HA(bio)-Komplexe wurden wie beschrieben quantifiziert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von drei Meßwerten.

Beladung um ca. 60% (Abb. 3.17 B). Eine etwas schwächere Inhibition verursacht Azid, das allerdings auch nur die Rezeptor-vermittelte Endozytose unterbindet. Keiner der Endozytose-Inhibitoren vermochte es jedoch die Beladung in dem gleichen Umfang zu reduzieren wie das DM-Antiserum. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die DM-vermittelte Beladung zumindestens partiell von der Endozytose abhängt. Zum Vergleich wurden beide Transfektanten mit Cycloheximid behandelt, einem Inhibitor der Proteinbiosynthese. Die DM-negative Transfektante bleibt wieder unbeeinflusst (Abb. 3.17 A), während T2.DR4.DM deutlich schlechter beladen wird. Vermutlich sind bei der Beladung der DM-positiven Zelllinie teilweise Komponenten involviert, die von der Proteinbiosynthese abhängen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß die DM-vermittelte Beladung zu einem beträchtlichen Teil von der Endozytose abhängt und zu einem geringeren Teil auch von der Proteinbiosynthese. Andererseits ist mit den vorherigen Experimenten ein größerer Einfluß des lysosomalen DMs ausgeschlossen worden. Dies läßt darauf schließen, daß die DM-vermittelte Beladung teilweise direkt an der Oberfläche, aber auch in frühen Endosomen abläuft.

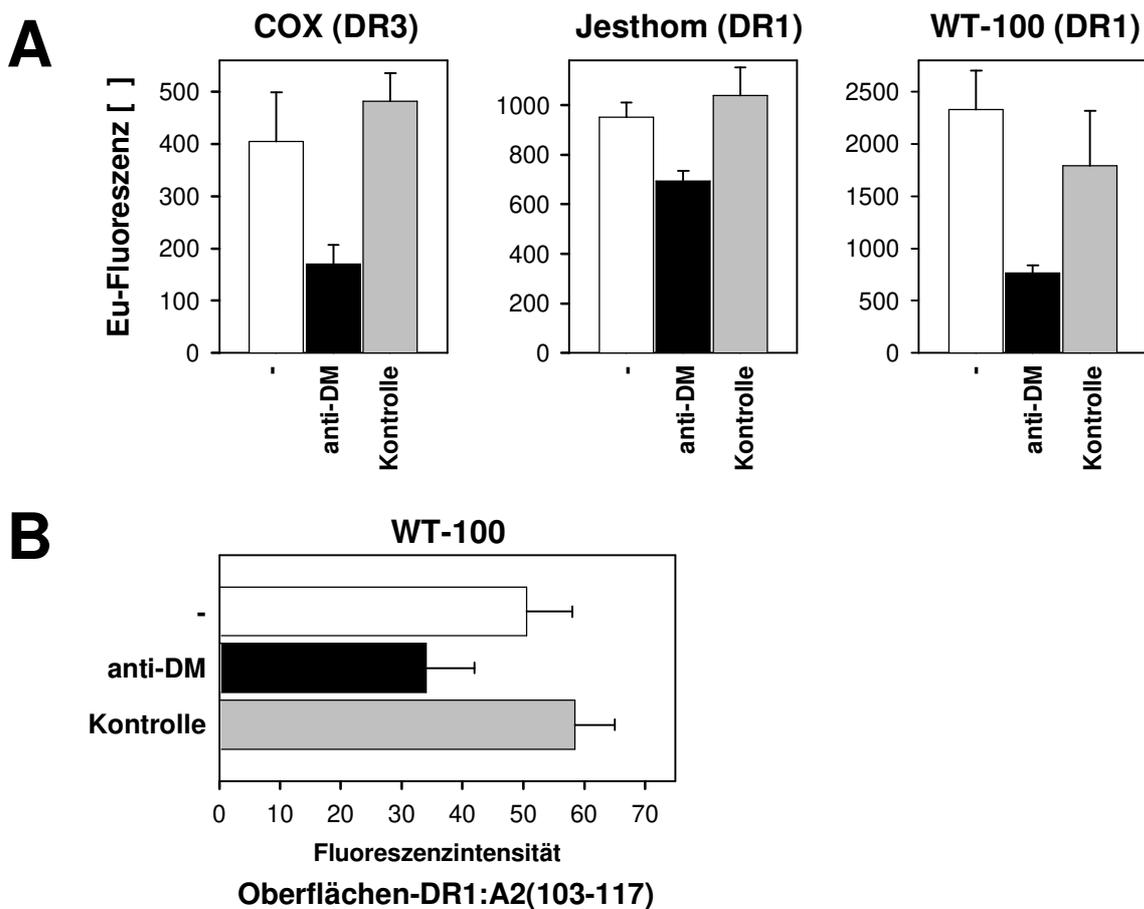
**Eine Beteiligung von Oberflächen-DM an der Beladung exogener Peptide wurde nachgewiesen: Bei der subzellulären Fraktionierung wurden die neu beladenen DR:Peptid-Komplexe nicht in Lysosomen, sondern in den leichten, Plasmamembran-haltigen Fraktionen detektiert. Einen eindeutigen Beweis lieferte die selektive Inhibition von Oberflächen-DM: Mit dieser Methode konnte die Beladung drastisch reduziert werden. Dennoch findet die DM-vermittelte Beladung auch intrazellulär statt, da Endozytose-Inhibitoren einen beträchtlichen Einfluß auf diese Art der Beladung hatten. Damit fällt der Ort der DM-vermittelten Beladung mit dem Beladungsort des Recyclingwegs zusammen.**

### **3.2.6 DM-vermittelte Katalyse im Kontext verschiedener Klasse II-Allele**

Im Folgenden war von Interesse, ob es sich bei der hier beobachteten DM-vermittelten Beladung um einen allgemeinen Prozeß handelt, der bei unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen und verschiedenen MHC Klasse II-Allelen auftritt. Dazu wurde die Inhibition, die durch das DM-Antiserum verursacht wurde (vgl. 3.2.5.2), bei den EBV-transformierten B-Zelllinien COX (DR3), Jesthom (DR1) und WT-100 (DR1) gemessen und miteinander verglichen. Bei der Zelllinie COX wird die Beladung durch die Anwesenheit des Antiserums um 60%, bei Jesthom um ca. 30% reduziert (Abb. 3.18 A). Die Abnahme der Beladung liegt bei WT-100 je nach Peptid, HA(bio) oder A2(bio), bei 30% bzw. 60%. Vergleichbare Resultate wurden erzielt, als die tatsächliche Beladung von DR-Molekülen auf der Zelloberflächen gemessen wurde. Dazu wurden WT-100 Zellen in An- oder Abwesenheit des DM-Antiserums mit A2-Peptid inkubiert, und die beladenen Komplexe flußzytometrisch mit dem monoklonalen Antikörper UL-5A1 detektiert. Dieser Antikörper erkennt ausschließlich DR1-Moleküle, die mit dem Selbstpeptid A2(103-120) aus HLA-A2 assoziiert sind (Wölpl et al, 1998). Nach der Be-

handlung mit dem DM-Antiserum ist die Beladung auf der Oberfläche um rund 30-40% vermindert (Abb. 3.18 B).

Die Untersuchungen wurden auf einen weiteren Typ von Antigen-präsentierenden Zellen ausgedehnt, nämlich auf dendritische Zellen (DCs). Diese wurden durch 6-tägiges Kultivieren von CD14<sup>+</sup> Monozyten in GM-CSF/IL-4 generiert, die aus dem Blut eines DR2-positiven Spenders isoliert wurden. Die flußzytometrische Analyse bestätigte, daß die so gewonnene Zellpopulation ein DC-typisches Expressionsmuster aufweist, wie z.B. CD1a, CD11c und



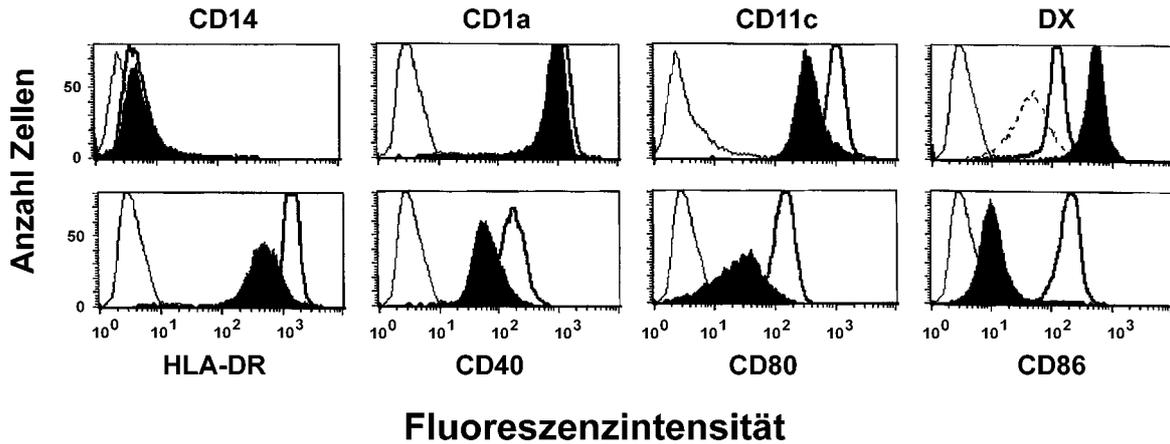
**Abb. 3.18: Selektive Inhibition von Oberflächen-DM bei verschiedenen MHC-Allelen**

(A) Selektive Inhibition bei B-Zellen

Die Zelllinien COX(DR3), Jesthom (DR1) und WT-100 (DR1) wurden in An- oder Abwesenheit des DM-Antiserums (3 µl) mit biotinyliertem Peptid [15 µM] bei 37° C 3h inkubiert. Als Peptide wurden bei COX ApoB100 bei Jesthom HA und WT-100 HA- respektive A2-Peptid verwendet. Anschließend wurden die Zellen in 1% NP-40 lysiert, und DR:Peptid(bio)-Komplexe im Lysat quantifiziert. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei Messungen.

(B) DM-Antiserum reduziert auch die Oberflächenbeladung

WT-100 Zellen wurden in An- oder Abwesenheit des DM-Antiserums (5 µl) auf Eis vorinkubiert. Danach wurde A2-Peptid [10 µM] zugefügt, und die Zellen 30 min bei 37° C inkubiert. Ein irrelevantes Kaninchenantiserum wurde als Kontrolle benutzt. DR1:A2-Komplexe wurden flußzytometrisch mit dem biotinylierten Antikörper UL-5A1 detektiert, der spezifisch dieses komplexe Epitop erkennt. Die Färbung wurde mit Streptavidin-R-PE durchgeführt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus drei Messungen. Dieses Experiment wurde vollständig von Frau Pozies durchgeführt.

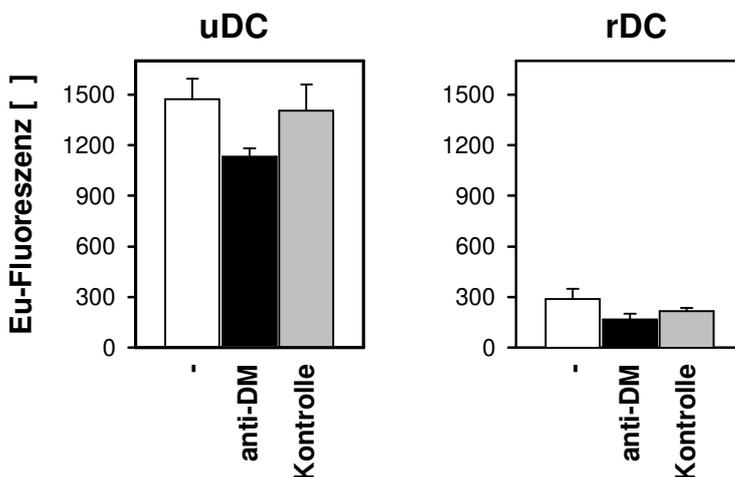


**Abb. 3.19: Charakterisierung der isolierten Dendritischen Zellen**

Die Expression der Oberflächenmarker wurde durch Flußzytometrie ermittelt. Die Fluoreszenzintensitäten der unreifen Dendritischen Zellen sind in schwarz dargestellt, die der reifen Dendritischen Zellen in weiß, während die Kontrollfärbung durch eine dünne Linie repräsentiert wird. Die spezifische Bindung von Dextran-FITC (DC) an den Mannose-Rezeptor wurde nach Inkubation der DCs auf Eis gemessen (gestrichelte Linie), so daß keine Aufnahme durch Endozytose stattfinden konnte.

HLA-DR (Abb. 3.19). Zusätzliches Kultivieren dieser DCs in LPS für 6 Tage hatte einen Anstieg der Oberflächenexpression von DR sowie der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 zur Folge, während gleichzeitig die Aufnahme von FITC-Dextran als Indikator der Endozytose abnahm. Die FACS-Ergebnisse belegen, daß es sich bei den generierten DCs vor der LPS-Stimulation um unreife DCs handelt, die dann durch die LPS-Behandlung reifen.

Bei der Inkubation in Anwesenheit des DM-Antiserums stellte sich heraus, daß Oberflächen-DM auch bei der Beladung unreifer DCs mit exogenem Peptid beteiligt ist: Die Beladung wird durch das Antiserum um etwa 25% gesenkt (Abb. 3.20); dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Jesthom oder WT-100. Bei LPS-stimulierten reifen DCs kann nur geringe Beladung gemessen werden kann. Dieses Ergebnis ist mit dem reifen Stadium der DCs zu erklären, in dem sie ihre Maschinerie zur Antigenaufnahme und -verarbeitung herunterreguliert haben und den Schwerpunkt auf die Präsentation von Antigenen legen (Cella et al, 1997; Pierre et al., 1997).



**Abb. 3.20: Selektive Inhibition von Oberflächen-DM bei dendritischen Zellen**

Unreife (uDC) und reife (rDC) dendritische Zellen (Haplotyp DR2Dw2 / DR2Dw12) wurden in An- oder Abwesenheit des DM-Antiserums (3 µl) auf Eis vorinkubiert. Danach wurde HA(bio)-Peptid [10 µM] zugefügt, und die DCs 30 min bei 37° C inkubiert. Weitere Durchführung wie in Abb. 3.18 A.

Diese Ergebnisse demonstrieren, daß die durch Oberflächen-DM vermittelte Beladung ein genereller Prozeß ist, der bei mehreren MHC-Allelen nachgewiesen wurde. Auch ist diese Art der Beladung nicht auf eine Transfektante beschränkt, sondern kommt sowohl bei B-Zellen als auch bei unreifen dendritische Zellen vor. Allerdings haben offensichtlich sowohl die Zellart, das MHC-Allel als auch das zu beladene Peptid einen Einfluß auf das Ausmaß der DM-vermittelten Beladung.

### 3.2.7 DM erleichtert den Austausch von Peptiden

Ursprünglich ist postuliert worden, daß die Beladung von "recycling"-MHC-Molekülen durch Peptidaustausch zustande kommt (Adorini et al., 1989). Ferner belegen *in vitro*-Daten, daß HLA-DM den Austausch von Peptiden katalysieren kann (Kropshofer et al., 1996). Da sich der hier verwendete *in vivo*-Beladungsassay in den typischen "recycling"-Kompartimenten Plasmamembran und frühe Endosomen abspielt, sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich der DM-vermittelte Peptidaustausch unter *in vivo*-Bedingungen nachweisen läßt. Der experimentelle Ansatz bestand in der Nachahmung einer Situation, in der ein antigenisches Peptid auf einen bereits gebildeten MHC:Peptid-Komplex trifft.

#### 3.2.7.1 Kinetik des Peptidaustauschs

Das erste Experiment beleuchtete den zeitlichen Verlauf und den Einfluß der Konzentration eines Kompetitors. Nach einer 30-minütigen Vorbeladung der beiden Transfektanten mit biotinyliertem HA-Peptid wurde entweder kein Peptid oder unmarkiertes HA-Peptid in stöchiometrischer Konzentration oder in dreifachem molaren Überschuss zugefügt. Die Zellen wurden danach weiter bei 37°C inkubiert und nach den angegebenen Zeitpunkten mit 1% NP-40 lysiert. DR4:HA(bio)-Komplexe wurden wie beschrieben quantifiziert.

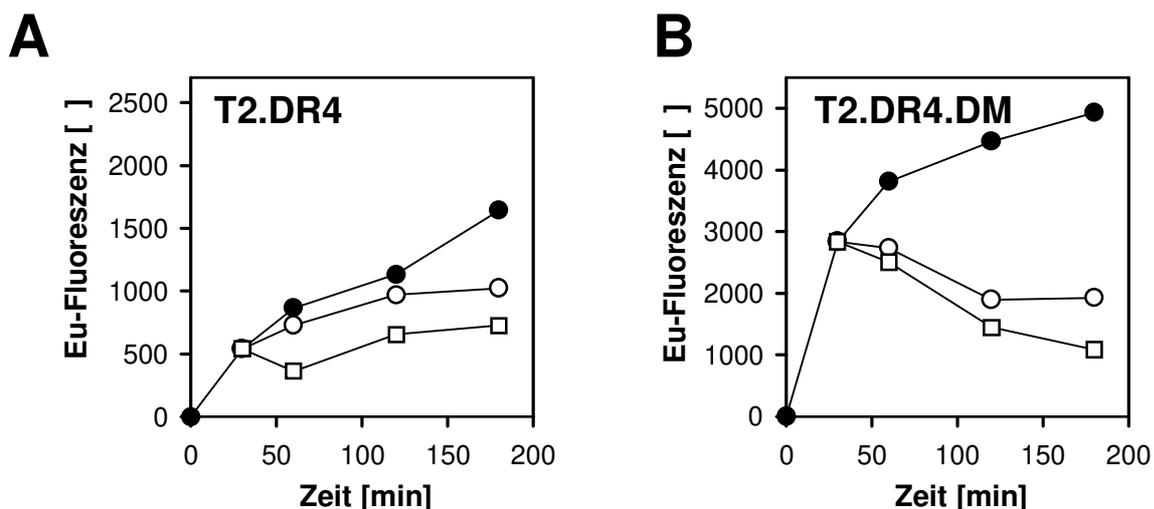


Abb. 3.21: Kinetik der Konkurrenz durch unmarkiertes Peptid

T2.DR4 (A) und T2.DR4.DM-Zellen (B) wurden 30 min bei 37°C mit HA(bio)-Peptid [15 µM] inkubiert. Danach wurde entweder kein Peptid ( $\lambda$ ) oder nicht biotinyliertes HA-Peptid in stöchiometrischer Konzentration ( $\gamma$ ) bzw. in dreifachem molaren Überschuss ( $\circ$ ) zugefügt. Die Zellen wurden danach weiter bei 37°C inkubiert und nach den angegebenen Zeitpunkten mit 1% NP-40 lysiert. DR4:HA(bio)-Komplexe wurden wie beschrieben quantifiziert.

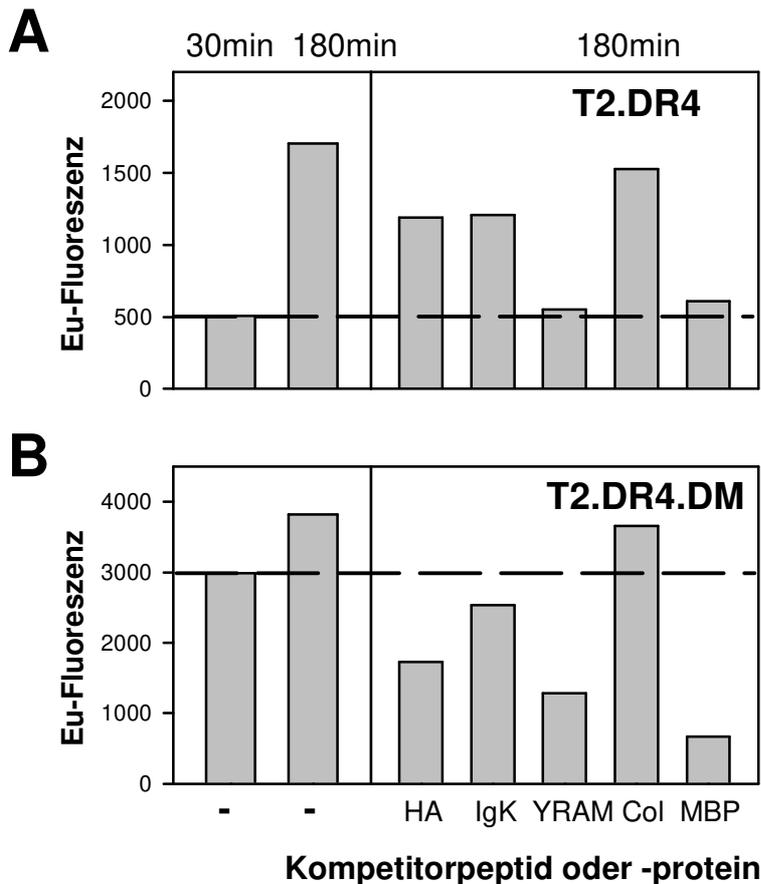
metrischer Konzentration oder in dreifachem molaren Überschuß zugegeben. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Menge der DR4:HA(bio)-Komplexe quantifiziert (Abb. 3.21). In diesem Experiment konkurriert der unmarkierte Kompetitor nicht nur mit freiem HA(bio)-Peptid, sondern auch mit bereits gebundenem HA(bio)-Peptid um die Bindungsstellen. Aus dem Vergleich mit der Beladung, die bereits nach einer halben Stunde gemessen wird, kann daher abgelesen werden, ob es zum Peptidaustausch gekommen ist.

Bei T2.DR4-Zellen beobachtet man eine Reduzierung der Beladung, wobei die Höhe der Reduzierung von der Konkretorkonzentration abhängt (Abb 3.21 A). Die Beladung fällt allerdings nie signifikant unter den ursprünglichen Wert, der nach 30 min gemessen wird. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß das ursprünglich gebundene HA(bio)-Peptid nicht - zumindestens nicht in einem größeren Umfang - durch anderes Peptid ersetzt worden ist. Die DM-positive Transfektante verhielt sich in diesem Punkt deutlich anders: Bereits stöchiometrische Konzentrationen des Konkretorpeptids reichten aus, um die Beladung mit biotinyliertem Peptid unter das 30 min-Niveau zu verringern (3.21 B). Die Erhöhung der Konkretorkonzentration änderte nichts am prinzipiellen Ausgang, sie verstärkte nur das Ausmaß. Dies belegt eindeutig, daß vorher beladenes HA(bio)-Peptid gegen unmarkiertes Peptid ausgetauscht worden ist. Da dies bei der DM-negativen Zelllinie T2.DR4 nicht beobachtet wird, muß dieser Vorgang der Aktivität von DM zugeschrieben werden.

### 3.2.7.2 Einfluß der Art des Konkretors auf den Peptidaustausch

Im zweiten Experiment wurde der Einfluß der Bindungsstabilität verschiedener Konkretoren studiert, die in stöchiometrischen Konzentrationen eingesetzt wurden (Abb. 3.22). Dadurch sollte überprüft werden, ob der beobachtete Ligandenaustausch denselben Regeln folgt, die *in vitro* für DM beobachtet wurden (Weber et al., 1996; Kropshofer et al., 1996). Das I $\kappa$ -Peptid, das nur mit moderater Stabilität an DR4 bindet, wird in einem geringeren Ausmaß ausgetauscht als das HA-Peptid. Die höchste Verdrängung verursacht ein Peptid namens YRAM, das auf möglichst stabile Bindung an DR4 hin optimiert wurde (Hammer et al., 1994; Kropshofer et al., 1996). Bei den Ergebnissen fällt auf, daß sämtliche dieser stabil bindenden Peptide es nur in Anwesenheit von DM vermögen, die bereits beladenen Komplexe zu ersetzen. Dagegen wird in Abwesenheit von DM bei den gleichen Peptiden zwar Konkurrenz, aber kein Austausch mehr beobachtet. Gänzlich anderer Natur ist das DR4-restringierte Col-Peptid, das bei der rheumatoiden Arthritis als Autoepitop diskutiert wird und sehr instabil an DR4 bindet (Raddrizzani et al., 1999). Dieses Peptid kann bei keiner der beiden Transfektanten in Konkurrenz zu dem markierten HA-Peptid treten, geschweige denn das vorbeladene Peptid austauschen. Daraus läßt sich ableiten, daß je stabiler das konkurrierende Peptid bindet, desto einfacher kann dieses Peptid gegen ein bereits gebundenes Peptid mittlerer Stabilität (hier: HA(bio)) durch DM ausgetauscht werden.

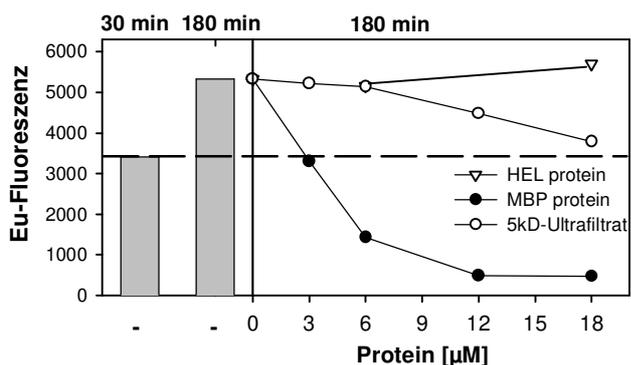
Dieser DM-abhängige Peptidaustausch wird auch beobachtet, wenn ein intaktes Protein, nämlich gereinigtes basisches Myelinprotein (MBP) als Konkretor verwendet wird. MBP ist



**Abb. 3.22: Konkurrenz durch unmarkierte Peptide bzw. Proteine**

T2.DR4 (A) und T2.DR4.DM-Zellen (B) wurden 30 min bei 37° C mit HA(bio)-Peptid [15 µM] inkubiert. Danach wurde entweder kein Peptid (-) oder nicht biotinylierte Kompetitoren in stöchiometrischer Konzentration zugefügt. Dabei handelte es sich um HA(307-319), Igκ(188-202), YRAM oder Col(260-274). Zusätzlich wurde gereinigtes basisches Myelinprotein (MBP) [15 µM] als Kompetitor verwendet. Die Zellen wurden danach bei 37° C für weitere 150 min inkubiert und mit 1% NP-40 lysiert. DR4:HA(bio)-Komplexe wurden wie beschrieben quantifiziert.

ein Kandidaten-Autoantigen bei der Multiplen Sklerose (MS) (Martin et al., 1992), das in seiner lipidgebundenen Form im alternativen Weg beladen wird (Pinet et al., 1995). Stöchiometrische Mengen MBP führen zu einer drastischen Abnahme bereits beladener DR4:HA(bio)-Komplexe bei T2.DR4.DM-Zellen, während es in T2.DR4-Zellen nur die weitere Beladung kompetitiv zurückdrängt (Abb 3.22). Dieser Peptidaustausch ist für MBP spezifisch (Abb. 3.23): Irrelevante Proteine, wie zum Beispiel HEL, beeinflussen die Beladung nicht. Auch proteolytische Fragmente oder andere niedermolekulare Bestandteile, die möglicherweise in der MBP-Präparation enthalten sein mögen, scheiden als Ursache aus, wie das 5kD-Ultrafiltrat des MBP-Isolat beweist. Offensichtlich ist Oberflächen-DM daher auch an der Beladung exogener Proteine beteiligt.



**Abb. 3.23: Konkurrenz durch unmarkierte Proteine: Nachweis der Spezifität von MBP**

T2.DR4.DM-Zellen wurden 30 min bei 37° C mit HA(bio)-Peptid [7,5 µM] inkubiert. Danach wurde entweder kein Protein (-) oder die folgenden Kompetitoren zugefügt: MBP, HEL oder ein 5kD-Ultrafiltrat der identischen MBP-Lösung. Die Zellen wurden danach bei 37° C für weitere 150 min inkubiert und mit 1% NP-40 lysiert. DR4:HA(bio)-Komplexe wurden wie beschrieben quantifiziert.

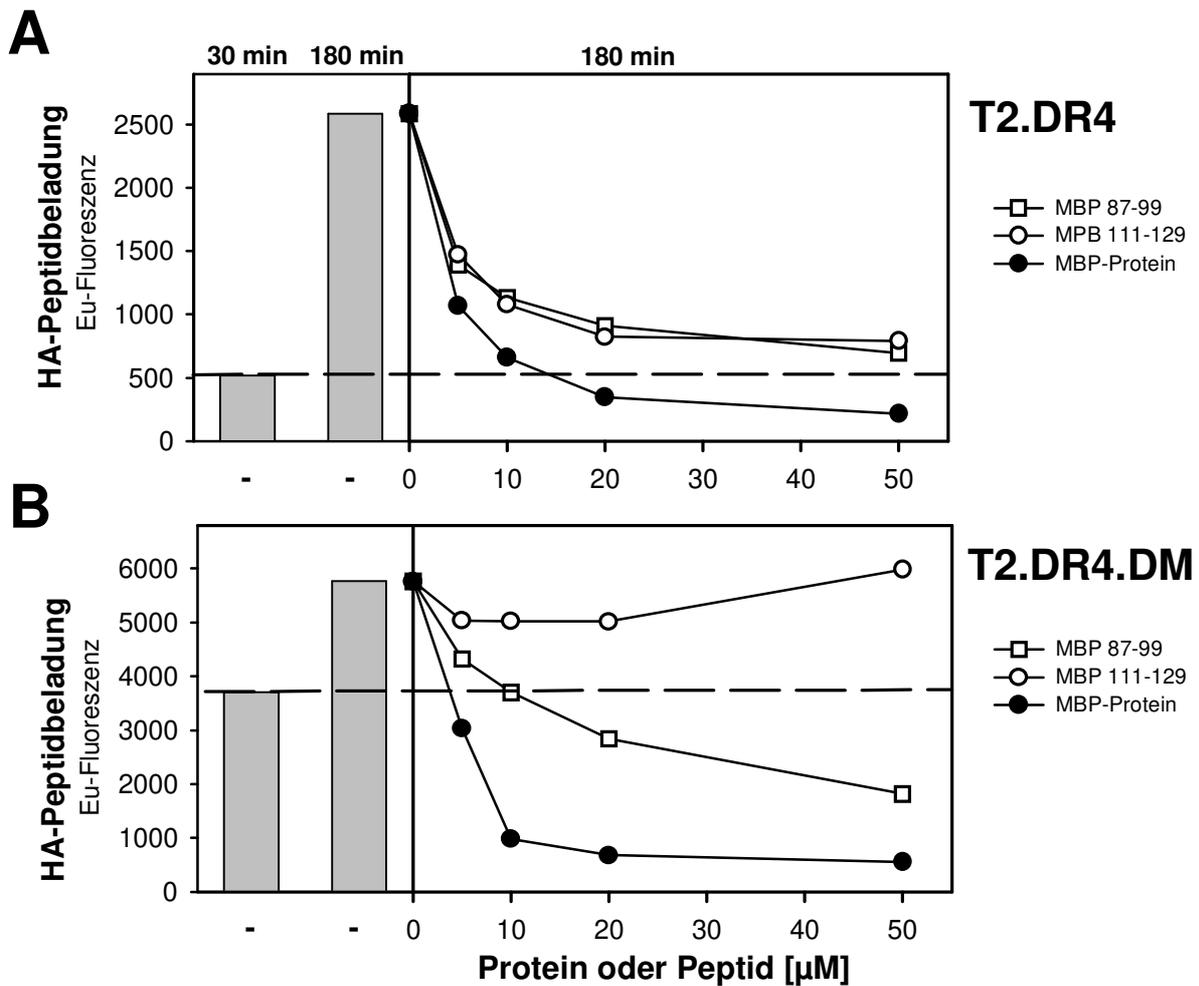
Die Experimente legen nahe, daß zwei Voraussetzungen für erfolgreichen Peptid austausch gegeben sein müssen: Die erste besteht in der Anwesenheit von DM, die zweite ist die hohe Stabilität, mit der das Kompetitorpeptid an MHC-Moleküle bindet. Damit folgt der Ligandenaustausch den Regeln, die für DM aus *in vitro*-Daten abgeleitet wurden. Interessanterweise funktioniert der Ligandenaustausch nicht nur mit Peptiden, der vorprozessierten Form eines Antigens, sondern auch mit exogenen Proteinen.

### 3.2.8 Einfluß von DM auf die Beladung und Präsentation von MBP und seinen immundominanten Epitopen

Die Fähigkeit von MBP, in Gegenwart von DM hervorragend zu kompetieren, war der Grund, dieses Protein und seine beiden häufigsten MS-assoziierten Epitope im DR4-Kontext genauer unter die Lupe zu nehmen. Dabei handelte es sich um MBP(111-129), das immundominante Epitop im Kontext von DR4 (DRB1\*0401), und um MBP(87-99), gegen das seltener T-Zellen gebildet werden, das aber stabiler als das erste Peptid an DR4 bindet (Muraro et al., 1997). Die Messungen sollten die Fragen klären, ob diese Antigene in An- bzw. Abwesenheit von DM beladen werden und ob es dann unter den jeweiligen Bedingungen auch zur Präsentation in Form von T-Zellepitopen kommt. Der erste Teil dieser Fragestellung wurde mit dem *in vivo*-Beladungsassay angegangen, für den zweiten Teil wurden analog beladene Zellen mit Hilfe eines Proliferationsassays im Labor von Dr. R. Martin, NIH, Bethesda, USA untersucht. Bei dem Vergleich der beiden Datensätze ergeben sich interessante Unterschiede, die Rückschlüsse über die Prozessierung und die Präsentation von MBP-Epitopen zulassen.

#### 3.2.8.1 Beladung von MBP und seinen immundominanten Epitopen

Die DM-positive und die DM-negative Transfektante wurden wie beschrieben mit HA(bio)-Peptid vorbeladen. Nach einer halben Stunde wurde entweder MBP-Protein oder die beiden Epitope, die sich aus der Sequenz des MBP ableiten, zugefügt (Abb. 3.24). In T2.DR4-Zellen zeigen beide Peptide das typische Bindungsverhalten eines mäßig affinen Peptids: Die weitere Beladung des markierten HA-Peptids wird dosisabhängig kompetitiv inhibiert, ein Peptid austausch ist jedoch nicht nachweisbar. Gereinigtes MBP ist ein noch besserer Kompetitor, der bei mehrfachem molaren Überschuß sogar einen Peptid austausch verursacht. In T2.DR4.DM-Zellen sieht die Situation ganz anderes aus: Zwar inhibiert MBP(87-89) noch die Beladung von HA(bio), aber die Inhibition fällt durch den Einfluß von DM schon schwächer aus, wie an Hand der Verschiebung des  $IC_{50}$ -Wertes ersichtlich ist. MBP(111-129) ist so DM-sensitiv, daß selbst bei mehrfachem molaren Überschuß keine erwähnenswerte Konkurrenz stattfindet. Dagegen tauscht das intakte MBP-Protein, wie bereits gezeigt, in Anwesenheit von DM bereits beladene Peptide aus; hierfür sind substöchiometrische Mengen ausreichend. Diese Daten sind als Hinweis zu werten, daß die Beladung von intaktem MBP durch



**Abb. 3.24: Kinetik der Konkurrenz durch unmarkiertes Peptid**

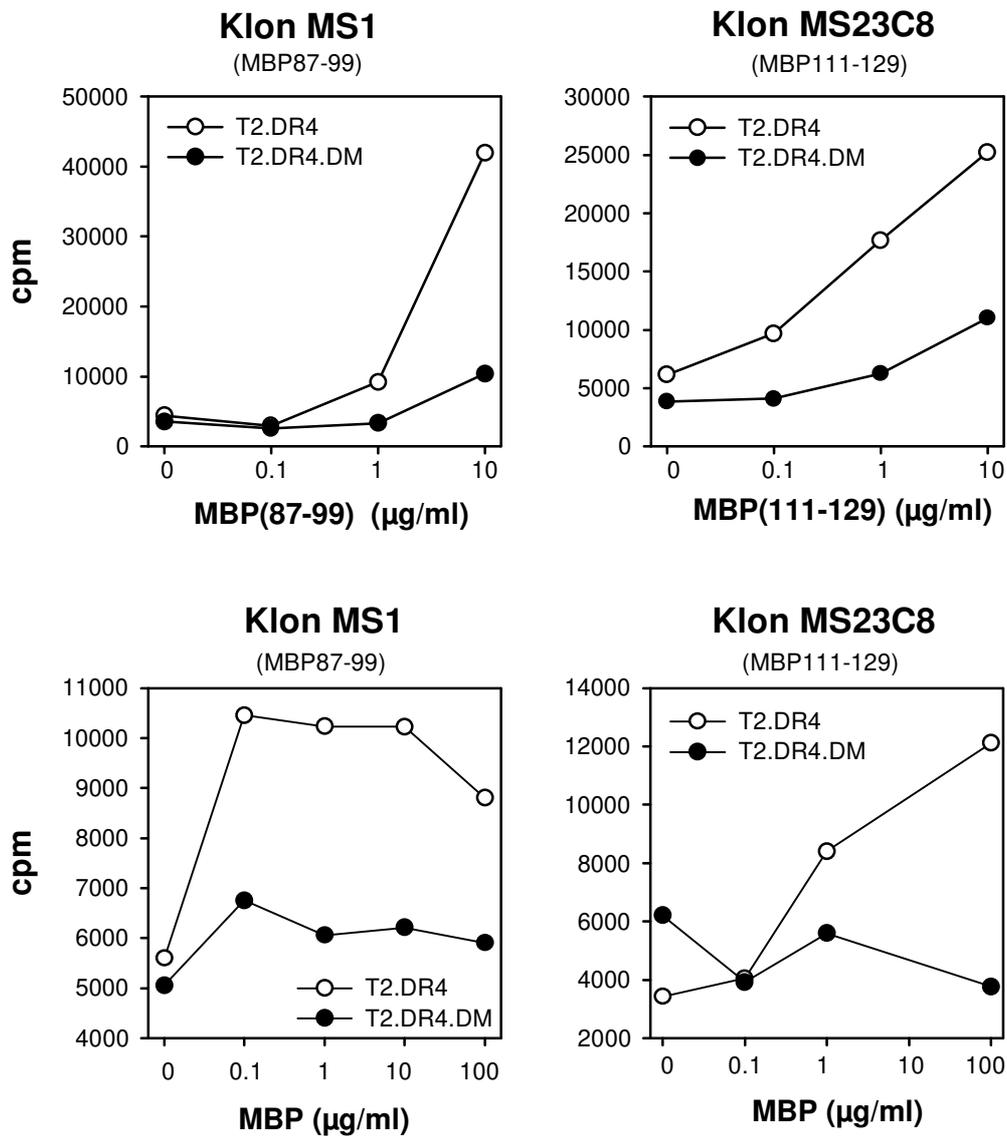
T2.DR4 (A) und T2.DR4.DM-Zellen (B) wurden 30 min bei 37° C mit HA(bio)-Peptid [10 µM] inkubiert. Danach wurde entweder kein Protein (-) oder die folgenden Kompetitoren in verschiedenen Konzentrationen zugefügt: intaktes MBP-Protein( $\lambda$ ), MBP(87-99)-Peptid ( $\circ$ ) oder MBP(111-129)-Peptid ( $\gamma$ ). Die Zellen wurden danach bei 37° C für weitere 150 min inkubiert und mit 1% NP-40 lysiert. DR4:HA(bio)-Komplexe wurden wie beschrieben quantifiziert.

die Anwesenheit von DM begünstigt wird, während die Bindung der immundominanten Peptide eher erschwert wird, wie das Beispiel des MBP(111-129) veranschaulicht.

### 3.2.8.2 Präsentation von MBP und seinen immundominanten Epitopen

Anders als Peptide müssen Proteine in der Regel noch prozessiert, d.h. proteolytisch verdaut, werden bevor sie von T-Zellen im MHC-Kontext erkannt werden können. Die Proteolyse von Antigenen kann entweder vor oder nach der Bindung an die MHC-Moleküle erfolgen; deshalb ist die Bindung eines Antigens alleine noch keine hinreichende Voraussetzung für die T-Zellerkennung. Beim Proliferationsassay wird daher die Präsentation eines Epitops gemessen, das nicht nur an ein MHC-Molekül binden, sondern auch von der spezifischen T-Zelle erkannt werden muß.

Die beiden Transfektanten wurden entweder mit MBP(111-129), MBP(87-99) oder intaktem MBP inkubiert. Anschließend wurden sie auf ihre Fähigkeit überprüft, die T-Zellklone MS23C8 oder MS1 zu stimulieren, die die Epitope 111-129 respektive 87-99 DR4-restringiert erkennen (Murano et al., 1997). Die Messungen, in denen die T2-Transfektanten mit Peptid beladen wurden, bestätigen die Ergebnisse des kompetitiven Beladungsassays (Abb. 3.25): Die DM-negativen Zellen wurden gut mit Peptid beladen (Abb. 3.24) und stimulieren folglich ihre jeweiligen T-Zellen relativ gut. T2.DR4.DM-Zellen lösen selbst bei der höchsten Peptidkonzentration nur eine schwache Proliferation, wenn überhaupt, bei beiden Epitopen aus. Diese korreliert gut mit der Beladung im Fall von MBP(111-129), nur für das MBP(87-99)-



**Abb. 3.25: Nachweis der Präsentation von MBP-Autoepitopen mit Hilfe von T-Zellassays**

T2.DR4 ( $\gamma$ ) und T2.DR4.DM-Zellen ( $\lambda$ ) wurden mit steigenden Mengen MBP-Peptid (obere Reihe) oder MBP-Protein (untere Reihe) inkubiert. Danach wurde der Klon MS1, der MBP(87-99) erkennt, oder der Klon MS23C8, der MBP(111-129) im Kontext von DR4 erkennt, zugefügt. Die T-Zellproliferation wurde durch [ $^3$ H]-Thymidin-Inkorporation quantifiziert. Diese Experimente wurden vollständig im Labor von Dr. R. Martin, NIH, Bethesda durchgeführt.

Peptid ergibt sich eine Abweichung. Wurden die Transfektanten hingegen mit gereinigtem MBP inkubiert, weichen die Ergebnisse von denen des Beladungsassays ab (Abb. 3.25): Beide T-Zelllinien proliferieren in der Anwesenheit von T2.DR4, im Kontext der DM-positiven Transfektante T2.DR4.DM ist die Proliferation jedoch fast auf Null-Level reduziert. Daraus folgt, daß DM zwar die Beladung von MBP-Protein stark fördert, wohl aber die Präsentation in Form von T-Zellepitopen verhindert.

**Aus dem *in vivo*-Beladungsassay geht hervor, daß die beiden immundominanten Epitope MBP(111-129) und MBP (87-99) bevorzugt in der Abwesenheit von DM beladen werden, während intaktes MBP in Ab- und vor allem in Anwesenheit von DM beladen wird. Der T-Zellproliferationsassay bestätigt das Beladungsverhalten der beiden Peptide, zeichnet aber mit MBP-Protein ein anderes Bild: DM verhindert die Präsentation beider immundominanter Epitope, so daß sie ausschließlich in Abwesenheit von DM erfolgt.**

## 4. Diskussion

### 4.1 Subzelluläre Lokalisation der Beladung von MHC Klasse II-Molekülen

Mehrere Arbeiten aus dem Jahr 1994 gingen der Frage nach, in welchen Kompartimenten die Beladung von MHC Klasse II-Molekülen abläuft. Sie bedienten sich dabei verschiedener Methoden subzellulärer Fraktionierung und beschrieben, daß neusynthetisierte Klasse II-Moleküle in endozytischen Vesikeln akkumulierten, die sich aber an Hand von Leitproteinen nicht genau frühen Endosomen, späten Endosomen oder Lysosomen zuordnen ließen (Amigorena et al., 1994; Qui et al., 1994; Tulp et al., 1994; West et al., 1994; Rudensky et al., 1994). In diesen Vesikeln, je nach Autor CIIV oder MIIC genannt, sollten zudem peptid-beladene MHC Klasse II-Moleküle vor ihrem Erscheinen auf der Plasmamembran akkumulieren. Alle Autoren kamen daher zu dem Schluß, daß antigenpräsentierende Zellen ein spezialisiertes Beladungskompartiment besitzen, das sich von den klassischen endozytischen Organellen unterscheidet. Allerdings wichen die jeweiligen spezifischen Merkmale dieses Beladungskompartiments in den einzelnen Studien erheblich voneinander ab: Im Fall der murinen B-Zelllinie A20 schien das Kompartiment recht früh im endosomalen Weg angesiedelt zu sein, da es eine Anreicherung des Transferrin-Rezeptors enthielt und endozytierten Proteinen einen schnellen Zugang gestattete (Amigorena et al., 1994). Im Gegensatz dazu zeichnete sich das Beladungskompartiment einer Melanomzelllinie und humaner B-Zelllinien durch die Anwesenheit von lamp-1 und die Abwesenheit von frühen endosomalen Markern aus (Qui et al., 1994; Tulp et al., 1994; West et al., 1994). In Hinblick auf die spätendosomalen und lysosomalen Marker  $\beta$ -Hexosaminidase, CI-MMR sowie die Internalisierungskinetik von Endozytose-Indikatoren gingen die Meinungen ebenso auseinander.

Die Identifizierung der Beladungskompartimente erfolgte bei den oben zitierten Arbeiten entweder über das Auftreten von SDS-stabilen Dimeren (Amigorena et al., 1994; Qui et al., 1994; Tulp et al., 1994) oder über das Auftreten von spezifischen Antigen:MHC II-Komplexen (West et al., 1994; Rudensky et al., 1994) nachgewiesen wurde. Mit beiden Methoden wird aber nur das Akkumulieren beladener MHC Klasse II-Moleküle gezeigt, nicht aber der Beladungsprozeß selber. Folglich ist mit diesen Methoden nicht auszuschließen, daß die Beladung noch in zusätzlichen Kompartimenten stattfindet, die beladenen MHC II-Moleküle aber vor dem Export auf die Plasmamembran in einem bestimmten Kompartiment akkumulieren. Außerdem haben beide Methoden den Nachteil, daß nur Subpopulationen beladener MHC Klasse II-Moleküle nachgewiesen werden: Die SDS-Stabilität wird zwar ausschließlich bei beladenen Klasse II-Moleküle beobachtet, aber nicht alle MHC Klasse II:Peptid-Komplexe weisen diesen Phänotyp auf (Riberdy et al., 1992), auch existiert keine Korrelation zwischen der Affinität des gebundenen Peptids und dem Auftreten der SDS-Stabilität (Verreck et al.,

1996). Bei der anderen Methode, dem Nachweis von spezifischen Antigen:MHC II-Komplexen, wurden entweder ein markiertes Antigen (West et al., 1994) oder ein Antikörper verwendet, der ein komplexes Epitop aus endogenem Peptid und MHC-Molekül erkennt (Rudensky et al., 1994). Dadurch wurde die nachgewiesene Beladung von vornherein auf ein bestimmtes Antigen beschränkt. Die Aussagen über den Beladungsort beschränken sich daher bei diesen beiden Veröffentlichungen auf das jeweilige Antigen, eine Verallgemeinerung ist aber wegen der unterschiedlichen Proteolyse-Empfindlichkeit von Antigenen nicht möglich.

Die Abweichungen in der Charakterisierung des Beladungskompartiments warfen die Frage auf, ob die Beladung von MHC Klasse II-Molekülen tatsächlich in einem einzigen distinkten Beladungskompartiment stattfindet oder in verschiedenartigen Kompartimenten erfolgt. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit Zellen der humanen B-Zelllinie WT-100 zunächst mit Hilfe eines Percoll-Dichtegradienten subzellulär fraktioniert. Um Einschränkungen bei der Identifizierung der Beladungskompartimente zu umgehen, wurden diese nicht nur über den Beladungskatalysator DM und das Produkt, beladene MHC Klasse II-Moleküle, sondern auch über die direkte Vorstufe der Beladung identifiziert: Ausgangspunkt für diesen Ansatz waren die Beobachtungen, daß MHC Klasse II:CLIP-Komplexe das primäre Substrat für DM sind (Denzin et al., 1996), und daß DM die Beladung katalysiert (Sloan et al., 1995). Folglich können MHC Klasse II:CLIP-Komplexe als direkte Vorstufe des beladenen MHC Klasse II-Moleküls angesehen werden. Organellen, die sowohl die Beladungsvorstufe, MHC Klasse II:CLIP-Komplexe, als auch den Beladungskatalysator DM enthalten, erfüllen die Voraussetzungen, die Beladungskompartimente erfüllen sollten.

Mit Hilfe der quantitativen Western Blot-Analyse wurde gezeigt, daß DM in jeder Fraktion vorkam und mit Ausnahme der Randfraktionen relativ gleichmäßig über den Gradienten verteilt war. Dieses Ergebnis wurde in einer Studie von Pierre et al. bestätigt (1996). DR-assoziiertes CLIP hingegen, das massenspektrometrisch sehr sensitiv detektiert werden konnte, wurde in den spätendosomal Fraktionen (Abb. 3.6, #9 bis 12) und in den lysosomalen Fraktionen geringer Dichte (Abb. 3.5, #5 bis 8) gefunden. In den lysosomalen Fraktionen hoher Dichte (Abb. 3.5, #1 bis 4) konnte zwar kein CLIP identifiziert werden, doch enthalten Lysosomen leere DR:DM-Komplexe, die funktionell aktiv, d.h. beladbar sind (Kropshofer et al., 1997). Daraus läßt sich ableiten, daß auch in diesen Fraktionen, obwohl sie kein CLIP enthalten, Beladung stattfinden kann. Zusätzlich zu den CLIP-Peaks wiesen sämtliche Massenprofile eine Vielzahl von Signalen im Bereich von 1400 bis 2500 Da auf. Diese konnten zwar nicht im einzelnen identifiziert werden, jedoch ergibt sich aus der durchgehenden Verteilung und der Vielfalt, daß sich höchstens ein kleiner Teil von CLIP ableiten kann, während wohl der überwiegende Teil von prozessierten und beladenen Peptiden stammt. Dieser Befund ist daher als starker Hinweis zu werten, daß späte Endosomen und Lysosomen unterschiedlicher Dichte neben der Beladungsvorstufe und dem Beladungskatalysator auch bereits beladene MHC Klasse II-Komplexe enthalten.

Beim Beladungsprozeß wird ein relativ instabiles CLIP-Peptid gegen ein stabileres antigenisches Peptid getauscht. Dies wird dadurch bewerkstelligt, daß einerseits die DM-vermittelte Beladung einen übergeordneten Einfluß auf das gesamte Peptidrepertoire hat (Denzin et al., 1994; Martin et al., 1996; Miyazaki et al., 1996) und daß andererseits der Beladungskatalysator DM Peptidliganden nach ihrer Stabilität selektiert (Kropshofer et al., 1996; van Ham et al., 1996). Die Stabilität des DR-assoziierten Peptidrepertoires sollte daher als relativer Indikator dienen können, ob das jeweilige Kompartiment eher am Anfang oder am Ende des Beladungsprozesses steht. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, daß die MHC Klasse

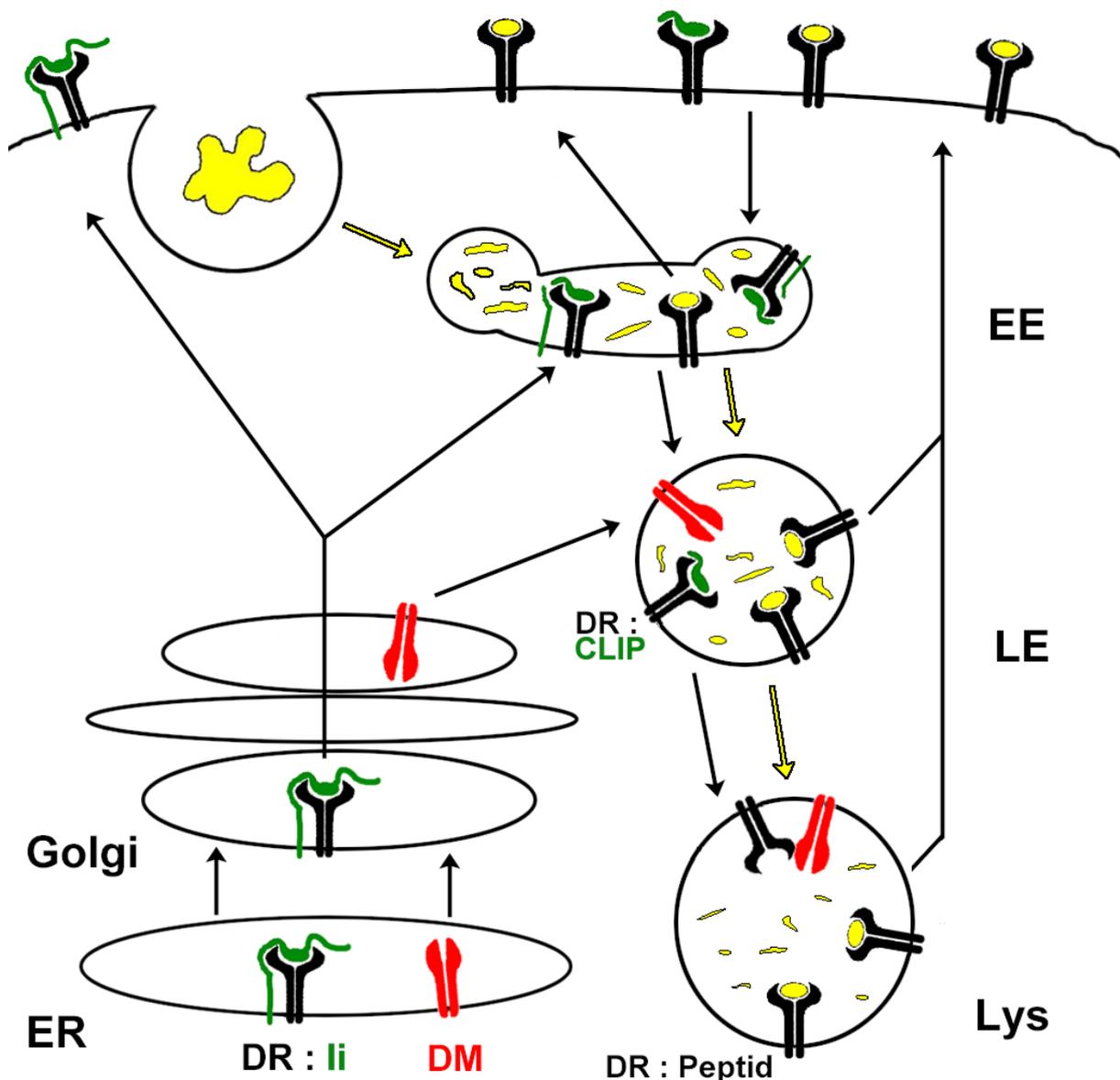


Abb. 4.1: Beladung von MHC-Klasse II (Modell)

Im ER assoziieren DR-Proteine (schwarz) mit der  $Ii$  (grün) und gelangen in den Golgi-Apparat. Von dort werden sie entweder direkt oder über die Plasmamembran in endosomal / lysosomale Kompartimente transportiert. Auf dem Weg von den frühen Endosomen zu den Lysosomen wird die  $Ii$  durch Proteasen schrittweise zu den  $Ii$ -Fragmenten  $CLIP$  abgebaut. Diese können in endosomalen wie lysosomalen Kompartimenten durch die Katalyse von  $DM$  (rot) gegen antigenische Fragmente (gelb) ausgetauscht werden. Schließlich werden die beladenen  $DR : Peptid$ -Komplexe zur Plasmamembran transportiert.

II:Peptid-Komplexe aus den lysosomalen Fraktionen und aus der plasmamembranhaltigen Mischfraktion etwas stabiler waren als die Klasse II-Komplexe aus den spät endosomalen Fraktionen (Abb. 3.7). Dies könnte ein Hinweis sein, daß der Beladungsprozeß in den späten Endosomen noch eher am Anfang steht; jedoch waren die Unterschiede zu gering, als daß sie eindeutige Rückschlüsse auf den Beladungsfortschritt zuließen. Die Größenordnung der Stabilitätsdifferenz wurde auch durch Versuche bestätigt, bei denen intrazelluläres DR direkt mit Plasmamembran-DR verglichen wurde (Abb. 3.9). Auch bei diesen Messungen lagen die Differenzen der Neubeladung bei bestenfalls 10%.

Mehrere Gründe kommen in Betracht, warum keine markanteren Stabilitätsunterschiede beobachtet wurden: Zunächst hängt die Stabilitätsdifferenz von der Konzentration der MHC II:CLIP-Komplexe im Fließgleichgewicht ab. Je schneller die CLIP-Komplexe nach ihrer Generierung beladen werden, desto geringer ist ihre intrazelluläre Konzentration und desto weniger werden sie zur Stabilitätsdifferenz beitragen. Auf der anderen Seite hängt die Differenz auch von der Stabilität und der Verfügbarkeit der zu beladenen Peptide ab: Bei einem Mangel von stabil-bindenden Peptiden in den intrazellulären Beladungskompartimenten müßten zwangsläufig auch instabilere Peptide geladen werden, was zur Nivellierung der Stabilität beitrüge. Dies würde auch erklären, warum sämtliche MHC II-Isolate eine auffallend hohe Neubeladungsrate, sprich niedrige Stabilität, aufweisen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung von leeren DR:DM-Komplexen in den Lysosomen, die in Anwesenheit von genügend stabil-bindenden Peptiden nicht existieren dürften (Kropshofer et al., 1997).

**Zusammenfassend kann aus diesen Untersuchungen der Schluß gezogen werden, daß sowohl in späten Endosomen als auch Lysosomen geringer wie hoher Dichte Beladung von MHC Klasse II-Molekülen stattfindet. Die Existenz eines spezialisierten Beladungskompartiments, das charakteristisch für APCs ist und in dem der Beladungsprozeß ausschließlich abläuft, konnte nicht verifiziert werden. Abb. 4.1 stellt modellhaft dar, wie die Beladung unter Berücksichtigung der hier vorgestellten Daten sowie von Literaturdaten in antigenpräsentierenden Zellen abläuft.**

In den letzten Jahren hat sich ein Wechsel in der Sichtweise hinsichtlich der Frage nach dem oder den Beladungskompartiment(en) vollzogen: Bis heute hat niemand überzeugend darlegen können, warum es sich bei dem Beladungskompartiment oder MHC um ein eigenständiges Kompartiment im zellbiologischen Sinn handeln soll. Auch wurde immer häufiger beobachtet, daß MHC Klasse II-Moleküle in mehr als nur einem Kompartiment beladen werden. Castellino & Germain waren die ersten, die an Hand von isolierten, murinen B-Zellen zeigten, daß die Beladung nicht in einem spezialisierten Beladungskompartiment geschieht, sondern in den klassischen endozytischen Organellen, wie späten Endosomen und Lysosomen (1995). In der Zwischenzeit haben sich viele Gruppen der Meinung angeschlossen, daß ein spezielles Beladungskompartiment offenbar doch nicht existiert (Pierre et al., 1996; Brachet

---

et al., 1997). Schließlich wurde in einer aufwendigen Studie, die sich hauptsächlich der Immu­nelektronenmikroskopie bediente, dargestellt, daß es sich bei den Beladungskompartimen­ten um konventionelle, endozytische Kompartimente handelt (Kleijmeer et al., 1997). Folgerichtig werden daher die Beladungskompartimente als Gruppe von normalen endozyti­schen Vesikeln aufgefaßt (Neefjes, 1999).

## 4.2 Peptid-Selektion durch Peptidaustausch

Bereits in der ersten Arbeit über die Funktion von DM wurde gezeigt, daß dieses Protein nicht nur die Dissoziation von CLIP, sondern auch die eines anderen Peptids beschleunigen kann (Sloan et al., 1995). Es lag daher auf der Hand, daß bei der Erhöhung der Dissoziationsrate durch DM nicht spezifische Eigenheiten von CLIP ausschlaggebend waren, sondern andere Charakteristika. Durch den Vergleich mehrerer Peptide und durch Aminosäureaustausch an Ankerpositionen wurde gefunden, daß es die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des jeweiligen Peptids selber ist, die darüber bestimmt, ob es DM-sensitiv oder DM-insensitiv ist (Kropshofer et al., 1996; Weber et al., 1996): Peptide, die ohnehin nur mit schlechter Stabilität an MHC Klasse II binden, werden durch DM freigesetzt, während stabil-bindende Peptide durch DM unbeeinflusst bleiben. Faktoren, die die Stabilität eines Peptids beeinflussen, sind in erster Linie seine Ankeramino-säuren, aber auch die Peptidlänge kann über Wasserstoffbrückenbindungen dazu beitragen. Die Unterscheidung zwischen Beladung und Peptidaustausch („Editing“) beruht also nicht auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen, sondern auf der zeitlichen Abfolge: Wird bei einem neusynthetisierten Klasse II-Molekül CLIP gegen ein antigenisches Peptid ausgetauscht, so spricht man von Beladung. Kommt es im Anschluß an die Beladung zur Entfernung zu Gunsten eines anderen Peptids, wird dieser Vorgang „Peptidaustausch“ oder „Editing“ genannt (Abb. 4.2).

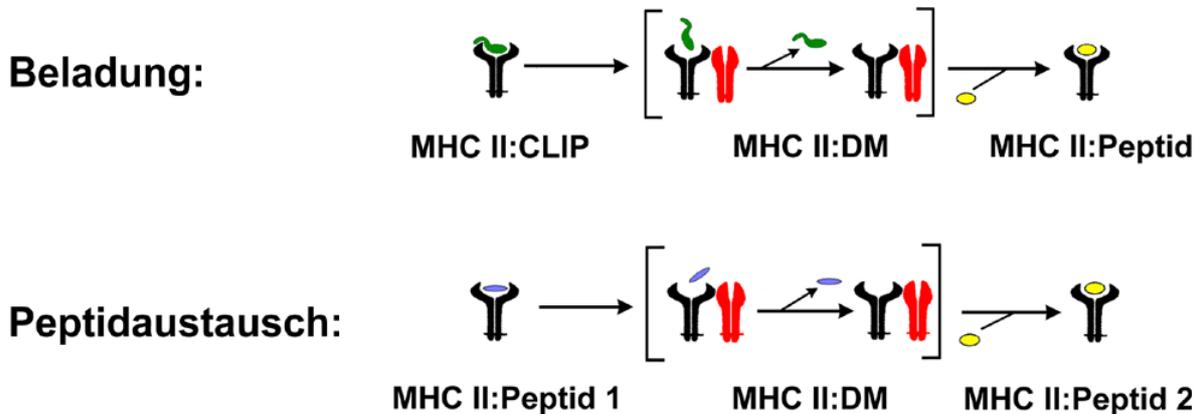


Abb. 4.2: Unterschied zwischen Beladung und Peptidaustausch

Erwartungsgemäß selektiert DM unter *in vitro*-Bedingungen, unter denen es über die Bindung verschiedener Peptide entscheiden kann, auf möglichst stabil-bindende Peptide (Kropshofer et al., 1996; Kropshofer et al., 1997b). Dabei spielt es keine Rolle, ob das Ausgangsmaterial aus DR:CLIP-Komplexen besteht oder ob andere DM-sensitive Peptide an DR assoziiert sind. Die biologische Relevanz dieses Selektionsprozesses liegt auf der Hand: In der Zelle würde dieser Vorgang dazu führen, daß DM das Peptidrepertoire im Anschluß an die Beladung einer Art Qualitätskontrolle unterwirft und auf möglichst stabil-bindende Peptide hin selektiert. Die Frage, ob dies auch tatsächlich unter *in vivo*-Bedingungen stattfindet, blieb bislang unbeantwortet. In den bisherigen Arbeiten, die sich mit Einfluß von DM auf das Pep-

tidrepertoire beschäftigten, wurde demonstriert, daß durch die Transfektion von DM die Expression von Klasse II:CLIP-Komplexen auf der Oberfläche reduziert wurde (Denzin et al., 1994) und daß die Reduzierung mit dem Ausmaß der DM-Expression korrelierte (Ramachandra et al., 1996). Eine aufwendige Studie, die den Einfluß der DM-Expression auf 35 verschiedene T-Zellepitope untersuchte, konnte zeigen, daß bedingt durch die DM-Transfektion viele Epitope überhaupt erst präsentiert wurden, während andere schlechter oder gar nicht mehr präsentiert wurden (Katz et al., 1996). Zwar folgerten die Autoren aus diesen Ergebnissen, daß hierfür ein DM-vermittelter Selektionsprozeß verantwortlich sei. Dieser Schluß ist aber nicht zwingend, da sich die DM-Transfektion sowohl auf den Beladungsprozeß als auch den Selektionsprozeß auswirkt und daher zwischen den beiden nicht unterschieden werden kann: die Beschleunigung des Beladungsvorgangs könnte auch dazu führen, daß nun die Beladung in anderen Kompartimenten mit einem anderen Antigenespektrum abläuft.

In dieser Arbeit sollte der Nachweis erbracht werden, daß auch im Anschluß an die Beladung ein Peptidaustausch stattfindet. Dazu ist HLA-DR isoliert worden, das ausschließlich von Zelloberfläche stammt, und mit DR verglichen worden, das aus intrazellulären Kompartimenten derselben Zellen kommt (Abb. 3.8). Würde nach der Beladung kein Peptid mehr ausgetauscht, müßten beide Repertoire eine starke Ähnlichkeit aufweisen, da das Oberflächenrepertoire nur Peptide enthalten dürfte, die auch schon in dem intrazellulären Repertoire vorhanden sind. Tatsächlich unterscheiden sich aber die beiden Repertoire der Zelllinie Jutthom deutlich voneinander: Die intrazellulären Peptide sind sehr divers und umfassen Molekulargewichte von 1400 bis 2300 Da (entsprechend 12 bis 20 Aminosäuren). Bei den beiden dominanten Peptidspezies handelt es sich um das 14- und das 15-mer Selbstpeptid aus HLA-A2, die bereits bei früheren Analysen identifiziert wurden (Chicz et al., 1992). Das Oberflächenrepertoire ist längst nicht so vielfältig und besteht überwiegend aus größeren Längenvarianten des Selbstpeptids HLA-A2(103-117). Der abgedeckte Massenbereich reicht von 1600 Da bis 2700 Da, was einer Länge von ungefähr 14 bis 24 Aminosäuren entspricht. Folglich enthält das Oberflächenrepertoire zum Teil andere Peptide, die im intrazellulären Repertoire nicht nachgewiesen wurden. Auch sind die Peptide von der Plasmamembran im Durchschnitt um zwei bis drei Aminosäuren länger.

Mit den Unterschieden in den Peptidspezies sind auch Stabilitätsunterschiede verbunden: Messungen, die mit DR-Isolaten aus zwei verschiedenen Zelllinien und mit zwei unterschiedlichen Reporterpeptiden durchgeführt wurden, zeigten, daß in allen Fällen das Oberflächenrepertoire im Vergleich zu dem intrazellulären Repertoire etwas stabiler ist (Abb 3.9). Formal können die Stabilitätsmessungen zwar nicht zwischen Beladungen und Peptidaustausch unterscheiden. Da die intrazellulären Peptidrepertoire der Zelllinien Jutthom und Jesthom aber kaum CLIP-Peptide aufweisen, können die Zuwächse in der Stabilität überwiegend dem Austauschprozeß nach der Beladung zugeschrieben werden.

Diese Selektion nach Peptidlänge und Stabilität korreliert mit dem Selektionsverhalten von DM. Man kann daher spekulieren, ob DM für den Austausch instabiler Selbstpeptide gegen die A2-Verkürzungsvarianten verantwortlich ist. Dafür spricht auch der Befund, daß zellei-

gene Membranproteine, wie das MHC Klasse I-Molekül HLA-A2, in der Regel in DM-positiven Kompartimenten, in späten Endosomen und in Lysosomen, proteolytisch abgebaut werden (Rudensky et al., 1994; Watts, 1997).

**Diese Ergebnisse demonstrieren, daß nach dem Beladungsprozeß ein Peptidaustausch stattfindet: Die Peptide des Oberflächenrepertoires sind länger und stabiler als die Klasse II-assoziierten, intrazellulären Peptide. Eine Beteiligung von DM an dem Selektionsvorgang wurde zwar nicht nachgewiesen, erscheint aber plausibel.**

Der letzte Punkt, die Beteiligung von DM am Selektionsprozeß, konnte mit einem anderen Versuchsaufbau *in vivo* bewiesen werden. In einem Konkurrenzexperiment (Abb. 3.21) wurden Zellen zunächst mit dem mittelmäßig stabilen HA-Peptid vorbeladen (Hammer et al., 1994) und nach 30 Minuten Kompetitorpeptide unterschiedlicher Stabilität zugefügt. Dieser Versuchsablauf erlaubte es zwischen 3 verschiedenen Fällen zu unterscheiden: Von einem schlechten Kompetitor würde erwartet, daß er die Beladung nicht wesentlich beeinflusst. Ein stabil-bindendes Peptid hingegen würde entweder nur die zusätzliche Beladung - bezogen auf das 30 Minuten-Niveau - kompetieren oder möglicherweise bereits beladenes Peptid austauschen und so den Endwert unter den 30 Minuten-Wert reduzieren. Genau in diesem Punkt unterschied sich die DM-positive Transfektante von ihrer DM-negativen Schwesterzelllinie: In Abwesenheit von DM kompetierten die stabil-bindenden Peptide zwar die weitere Beladung, aber nur bei der DM-positiven Zelllinie wurde ein Peptidaustausch nachgewiesen. Dabei ließ sich eine Korrelation zwischen dem Ausmaß des Peptidaustauschs und der Stabilität des verwendeten Peptids feststellen. **Diese Resultate zeigen, daß HLA-DM *in vivo* im Anschluß an die Beladung das Peptidrepertoire einem Selektionsprozeß unterwirft, bei dem instabile Peptide gegen Peptide mit höherer Stabilität ausgetauscht werden.**

## 4.3 HLA-DM im alternativen Beladungsweg

### 4.3.1 Nachweis von DM im alternativen Beladungsweg

Der klassische Beladungsweg bedient sich neusynthetisierter MHC Klasse II-Moleküle und der Invarianten Kette. In sauren Kompartimenten, wie späten Endosomen oder Lysosomen, wird letztere proteolytisch verdaut und macht so den Weg frei für den Beladungsvorgang. Antigene, die beispielsweise über Endozytose ebenfalls diese Organellen erreicht haben, werden dort entfaltet und in Polypeptide oder Peptide gespalten und können nun auf Klasse II-Dimere beladen werden (Wolf & Ploegh, 1995). Wenn dies allerdings der einzige Weg wäre, wie Selbst- oder Fremdanigene prozessiert und beladen werden, hätten antigenpräsentierende Zellen keine Möglichkeit, labile Epitope zu präsentieren, die durch die harschen Bedingungen in Lysosomen-ähnlichen Kompartimenten zerstört würden. Als Folge würden diese Epitope der Erkennung durch das Immunsystem entzogen.

Bereits Anfang dieses Jahrzehnts gab es Hinweise, die für die Existenz eines weiteren Beladungsweges sprechen. Während die Präsentation bestimmter Epitope dem klassischen Beladungsweg folgte und von der Expression der Ii abhing, wurden andere Epitope auch in Abwesenheit von Ii präsentiert (Nadimi et al., 1991; Momburg et al., 1993). Schließlich wurde der Nachweis erbracht, daß ein alternativer Beladungsweg existiert. Dieser benutzt MHC Klasse II-Moleküle von der Plasmamembran, die in frühe oder „Recycling“-Endosomen internalisiert, dort beladen und dann auf die Plasmamembran zurückgeschickt werden (Pinet et al., 1995; Pinet & Long, 1998). Inzwischen gibt es mehrere Beispiele für MHC Klasse II-restringierte Antigene, die in „leichten“ Kompartimenten prozessiert und über den alternativen Beladungsweg präsentiert werden. Dazu gehören Ribonuklease A (Nadimi et al., 1991, Griffin et al., 1997); Hämagglutinin (HA) des Influenza-Virus (Pinet et al., 1994) und basisches Myelinprotein (MBP) (Pinet et al., 1995). Viele dieser Arbeiten wurden auch mit DM-negativen Zellen durchgeführt. Außerdem ging man davon aus, daß DM in endosomalen und lysosomalen Kompartimenten anzutreffen sei, nicht aber in den „recycling“-Kompartimenten. Daher entstand der Eindruck, daß der alternative Beladungsweg generell DM-unabhängig sei. Niemand hat sich aber gütlich mit dem Einfluß von DM im alternativen Beladungsweg beschäftigt.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal demonstriert, daß eine Subpopulation von DM auf der Zelloberfläche von B-Zellen lokalisiert ist. Diese Aussage widerspricht Arbeiten, die vor einiger Zeit publiziert wurden (Denzin et al., 1994; Sanderson et al., 1994; Karlsson et al., 1994). Warum DM in diesen Veröffentlichungen nicht auch auf der Plasmamembran gefunden wurde, bleibt unklar. Möglicherweise führte ein sehr niedriges DM-Expressionsniveau der benutzten Zellen oder mangelnde Sensitivität der verwendeten Methoden zu diesem Schluß. Die Lokalisation von DM auf der Oberfläche ist jedoch unstrittig angesichts von 3 unabhängigen Nachweismethoden: Präzipitation von Oberflächenproteinen (Tab. 3.1), Präzipitation von

DR-Oberflächenmolekülen (Abb. 3.11) und FACS-Analyse (Abb. 3.10). Zwischenzeitig wurde DM auch auf der Oberfläche von Langerhanszellen beschrieben (Andersson et al., 1998).

Aus dieser Beobachtung wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, daß das auf der Oberfläche beobachtete DM die Beladung im alternativen Beladungsweg sowie die Präsentation von immundominanten Epitopen beeinflussen könnte. Dazu wurde zunächst in einem neuentwickelten zellulären Beladungsassay gezeigt, daß DM an der Beladung von exogenen Peptiden beteiligt ist: bei der DM-positiven Zelllinie T2.DR4.DM war für das Erreichen der halbmaximalen Sättigung weniger als ein Zehntel HA-Peptid nötig im Vergleich zu der DM-negativen Schwesterzelllinie T2.DR4 (Abb. 3.14 A), außerdem wurde die Beladung durch DM stark beschleunigt (Abb. 3.14 B). Diese Messungen sind auch mit Daten konsistent, die mit Hilfe von DM-Knockout-Mäusen gewonnen wurden: APCs der DM-positiven Kontrollmäuse präsentierten ebenfalls exogene Peptide wesentlich besser als die APCs der DM-Knock-out-Mäuse (Martin et al., 1996; Miyazaki et al., 1996; Tourne et al., 1997).

Die Titration und die Kinetik beweisen zwar die Beteiligung von DM an der Beladung von exogenen Peptiden, beide Experimente lassen aber offen, aus welchem Kompartiment das DM stammt, das für die Katalyse verantwortlich ist. Daher wurden weitere Experimente durchgeführt, um nachzuweisen, daß die Beladung nicht durch lysosomales DM, sondern durch Oberflächen-DM oder DM im Recycling-Weg vermittelt wird:

1. Erste Hinweise lieferte die Beladungskinetik: Die Feinanalyse während der ersten 15 Minuten zeigt, daß die Beladung sofort und ohne Verzögerung einsetzt (Abb. 3.14 C). Eine Katalyse durch lysosomales DM hätte vorausgesetzt, daß das Peptid zunächst endozytiert und in Lysosomen transportiert wird, was eine anfängliche Verzögerung zur Folge haben müßte.
2. Ein weiterer Hinweis wurde durch die subzelluläre Fraktionierung von Zellen nach exogener Peptidbeladung erbracht (Abb. 3.15). Die Fraktionierung trennte die Zellkompartimente in einen spät-endosomalen / lysosomalen Teil und in eine Mischfraktion, die aus Plasmamembran, frühen Endosomen, Golgi und ER bestand, wie sich aus der Markernalyse ablesen ließ. Der weitaus größte Teil von DM (ca. 80 - 90%) befand sich in der spät endosomalen / lysosomalen Hälfte, während die beladenen DR4:HA-Komplexe überwiegend in den Mischfraktionen nachgewiesen wurden, die nur 10 - 20% des Gesamt-DM enthielen.
3. Die Beteiligung von Oberflächen-DM wurde schließlich durch die Inhibition mit einem anti-DM-Serum bewiesen (Abb. 3.16 A). Dieses Antiserum bewirkte bei der DM-positiven Zelllinie (T2.DR4.DM) einen Rückgang der Beladung um 80%, wobei durch eine Inhibitionskinetik (Abb. 3.16 B) gezeigt werden konnte, daß es initial die Beladung am stärksten inhibiert und nicht erst nach endozytischer Aufnahme.

Diese drei Punkte zeigen eindeutig, daß unter den vorliegenden Bedingungen ein Großteil der Beladung (ca. 80%) durch Oberflächen-DM vermittelt wird. Die verbleibenden 20% der Beladung finden vermutlich ohne Beteiligung von DM statt, wie dies bei der DM-negativen Zelllinie ausschließlich der Fall ist.

Diese Ergebnisse beweisen nicht nur eine Beteiligung von Oberflächen-DM an der Beladung, sie argumentieren auch für einen Beladungsprozeß, der entweder auf der Oberfläche direkt oder in der Nähe der Oberfläche stattfindet. Als Beladungsort kommen neben der Plasmamembran frühe Endosomen und sogenannte „Recycling“-Endosomen in Frage, während späte Endosomen oder Lysosomen allenfalls eine untergeordnete Rolle spielen. Nur frühe Endosomen sind für MHC Klasse II-Moleküle über Endozytose in kurzer Zeit (5 min) zugänglich und damit mit der beschriebenen raschen Beladungskinetik vereinbar. Auch wurden bei der subzellulären Fraktionierung die beladenen Komplexe hauptsächlich in

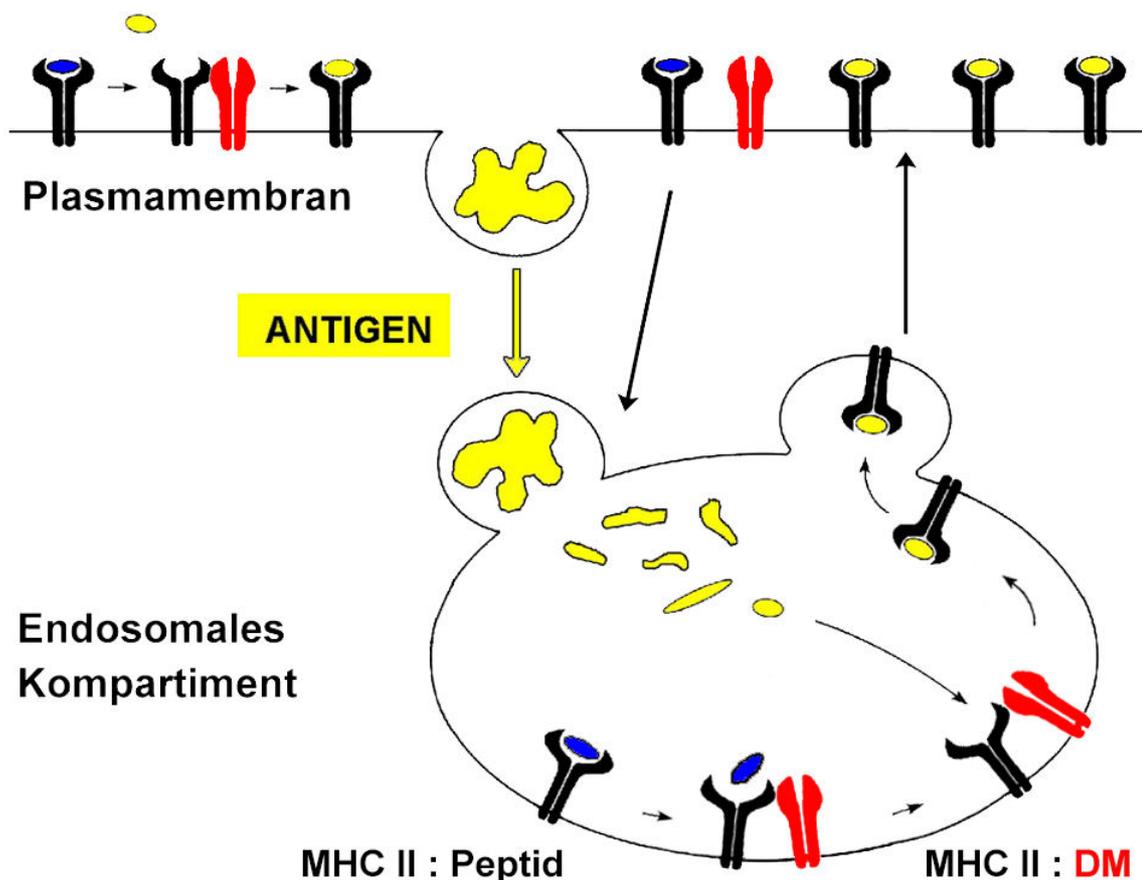


Abb. 4.3: Modell zur Oberflächen-DM-vermittelten Beladung von MHC Klasse II-Proteinen

Die Beladung von exogenen Peptiden kann auf zwei Arten durch Oberflächen-DM katalysiert werden: Die eine Möglichkeit besteht in der direkten Beladung auf der Oberfläche und ist deshalb Endozytose-unabhängig. Die zweite Möglichkeit, die vor allem genutzt wird, bedient sich des alternativen Beladungsweges: Reife MHC Klasse II-Moleküle werden im Zuge des konstitutiven Recyclings internalisiert. Dort wird durch internalisiertes DM ein Peptidaustausch vermittelt und das neu beladene Klasse II-Molekül wandert wieder zur Oberfläche.

Fraktionen entdeckt, die Plasmamembran und frühe Endosomen enthielten. Tatsächlich scheinen beide Kompartimente bei der Beladung mit exogenem Peptid beteiligt zu sein, wie die Verwendung von Endozytosehemmern zeigt (Abb. 3.17): durch die Behandlung mit Wortmannin oder mit Azid wird die Beladung in DM-positiven Zellen um bis zu 60% verringert. Auch andere Inhibitoren, die den sauren pH in den Endosomen neutralisieren, wie Concanamycin A oder Chloroquin, führen zu einer Halbierung der Beladung. Eine Reduzierung der Beladung in der gleichen Größenordnung wie bei dem Inhibitionsexperiment mit dem DM-Antiserum wird jedoch weder bei einer Verlängerung der Beladungszeit noch bei einer Erhöhung der InhibitorKonzentration beobachtet (Daten nicht gezeigt). Daraus kann man folgern: Der Großteil (bis zu 60%) der Beladung findet intrazellulär in frühen Endosomen und in Abhängigkeit von Oberflächen-DM statt. Weitere 20% der Gesamtbeladung verlaufen DM-unabhängig, wie aus den Inhibitionsexperiment hervorgeht; dieser Teil vollzieht sich vermutlich direkt auf der Plasmamembran. Dafür spricht, daß die Beladung der DM-negativen Transfektante ebenfalls ohne Endozytose auskommt. Die restliche Beladung, mindestens 20%, kann folglich nur in Abhängigkeit von Oberflächen-DM, aber Endozytose-unabhängig, d.h. direkt auf der Plasmamembran, ablaufen. Diese Folgerung wird durch die Beobachtung unterstützt, daß DM auf der Oberfläche in Form von DR:DM-Komplexen nachgewiesen wurde (Abb. 3.11). Da die DR-Bindungsfurche von DR:DM-Komplexen - zumindest in Lysosomen - leer ist (Kropshofer et al., 1997), sind diese DR-Moleküle für eine rasche Antigenbindung prädestiniert. Die hier beobachteten Beladungswege weisen einige Parallelen zu dem Bindungsverhalten von partiell denaturiertem Hühnereiweiß-Lysozym (HEL) auf (Lindener & Unanue, 1996): Für dieses Antigen ist gezeigt worden, daß es sowohl direkt auf der Plasmamembran als auch nach Endozytose bindet.

**Zusammenfassend kann man feststellen, daß ein Großteil der Beladung, die durch Oberflächen-DM vermittelt wird, auf Endozytose angewiesen ist und in frühen respektive „recycling“ Endosomen stattfindet. Damit ist DM an der Beladung im alternativen Beladungsweg beteiligt. Daneben wird ein kleinerer Teil der Beladung direkt auf der Plasmamembran durch DM katalysiert.**

Die Größenordnung der Beladung, die direkt auf der Plasmamembran stattfindet, kann mit Hilfe der Quantifizierungsdaten theoretisch abgeschätzt werden. Im Fließgleichgewicht befinden sich ca. 10 bis 15% aller DM-Moleküle auf der Oberfläche (Tab. 3.1). Da eine B-Zelle ungefähr  $10^6$  DR-Moleküle exprimiert und das zelluläre DR:DM Verhältnis 20:1 beträgt (Schafer et al., 1996; Kropshofer et al., 1997), befinden sich demnach etwa 5000 DM-Moleküle auf der B-Zelloberfläche. Dies ist eine ziemlich große Zahl, wenn man bedenkt, daß DM auch bei neutralem pH katalytisch aktiv ist (H. Kropshofer, persönl. Mitteilung) und angenommen wird, daß 100 bis 300 Klasse II-Moleküle für eine T-Zellaktivierung ausreichend sind (Valitutti et al., 1995). Ausgehend von einer 1:1 Stöchiometrie könnten bis zu 0,5% aller Oberflächen-MHC Klasse II-Moleküle mit DM komplexiert sein, die ohne Umwege direkt beladen werden könnten. In Übereinstimmung mit dieser Abschätzung wurde berichtet, daß un-

gefähr 1% aller DR-Oberflächenmoleküle in B-Zellen mit exogenem HA-Peptid beladen werden konnten (Busch et al., 1990).

Es drängt sich die Frage auf, auf welchem Wege DM die Oberfläche erreicht. Aus dem bisherigen Wissen über intrazelluläre Transportprozesse ergeben sich zwei verschiedene Möglichkeiten: DM könnte einerseits durch die Fusion von Beladungskompartimenten oder daraus abgeleiteten Transportvesikeln mit der Plasmamembran dorthin gelangt sein. Dieser Transportweg ist für MHC Klasse II-Moleküle bereits durch Immunfluoreszenzmikroskopie respektive Immunelektronenmikroskopie gezeigt worden (Wubboltz et al., 1996; Raposo et al., 1996). Andererseits könnte DM die Oberfläche erreichen, wenn ein Teil der neusynthetisierten Molekülen auf direktem Weg vom Trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran transportiert werden würde, wie dies bereits für mehrere lysosomale Proteine beobachtet wurde (Lippincott-Schwarz & Fambrough, 1987; Braun et al., 1989). Tatsächlich wird eine Reduzierung der Beladung um etwa 30% beobachtet, wenn DM-positiven Zellen vor und während der Beladung mit dem Proteinbiosynthese-Inhibitor Cycloheximid behandelt werden. Dies spricht für eine Beteiligung von neusynthetisiertem DM, da im alternativen Weg bereits existierende Klasse II-Moleküle benützt werden, während neusynthetisierte Klasse II-Moleküle keine Rolle spielen. Dennoch scheint dies nicht der einzige Weg zu sein, da die Reduzierung um 30% noch erheblich unter dem Anteil der DM-vermittelten Beladung von 80% liegt. Auch ein verlängerter Beladungszeitraum oder die Verwendung eines anderen Proteinbiosyntheseinhibitors (Emitin) führten nicht zu einer signifikanten Veränderung (Daten nicht gezeigt). Es kann daher angenommen werden, daß auch DM-Moleküle an der Beladung beteiligt sind, die auf dem ersten Weg auf die Plasmamembran gelangt sind und sich möglicherweise zwischen den Beladungskompartimenten und der Oberfläche hin und zurück bewegen. Dafür spricht auch die relativ breite Verteilung von DM im endozytischen System, das vor allem in Lysosomen und späten Endosomen, aber auch in früh endosomalen Vesikeln beobachtet wurde (Pierre et al., 1996).

### **4.3.2 Einfluß von HLA-DM auf die Antigenpräsentation im alternativen Beladungsweg**

Exogene Peptide haben offensichtlich nicht die Möglichkeit, weit in das endozytische System einzudringen und so in größerem Maße mit neusynthetisierten MHC Klasse II-Molekülen in Kontakt zu treten. Wahrscheinlich werden sie durch die Proteasen der späten Endosomen und Lysosomen rasch gespalten. Auch wird angenommen, daß sie nach der Aufnahme schnell exozytiert werden, wie dies von Monji & Pious vorgeschlagen wurde (1997). Dennoch spielen nicht nur Protein-Antigene, sondern auch Peptide eine Rolle bei der Antigenpräsentation: So wurde gezeigt, daß ein immunogenes Epitop des Hepatitis D-Virus durch extrazelluläres Prozessieren mit Hilfe von Serumproteasen entsteht, das anschließend CD4<sup>+</sup>-T-Zellen präsentiert wird (Accapezzato et al., 1998). Ferner besitzen Dendritische Zellen auf ihrer Oberfläche Ektoproteasen, die zu der extrazellulären Generierung von Peptiden

beitragen könnten (Amoscato et al., 1998). Auch erscheint die Entstehung von Peptiden bei Entzündungs- oder nekrotischen Prozessen plausibel: Bei diesen Vorgängen werden Proteine freigesetzt und mit hohem Umsatz durch ebenso freigesetzte Proteasen abgebaut; es wäre daher nicht weiter verwunderlich, wenn Peptide als Intermediärprodukte entstünden. Antigenpräsentierende Zellen, die an diesen Prozessen beteiligt sind, wie z.B. Makrophagen, könnten diese Peptide einfangen und über den alternativen Beladungsweg präsentieren. Beispielsweise könnte dieses Szenario bei Autoimmunerkrankungen, wie Multipler Sklerose, von Relevanz sein. Bei dieser Erkrankung wird angenommen, daß die Präsentation von Autoantigenen, die von den Entzündungsherden an den Myelinscheiden herrühren, für ihre Progression verantwortlich ist.

Wie in Kapitel 4.2 ausgeführt wurde, ist DM für die Selektion des Peptidrepertoires verantwortlich, bei dem Peptide mit geringer kinetischer Stabilität gegen stabilere ausgetauscht werden. Dieser Selektionsprozeß hat wahrscheinlich auch Auswirkungen auf die Präsentation von Epitopen, die mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht werden, da diese in der Regel nur mit schlechter bis mittlerer Stabilität an MHC Klasse II binden (Liu et al., 1995). Dies gilt für das Kollagenepitop Col(260-270), das vermutlich an der rheumatoiden Arthritis beteiligt ist, oder das acetylierte MBP(1-9), das die experimentelle allergische Encephalomyelitis (EAE) in Mäusen auslöst (Fairchild et al., 1993; Mason & McConnell; 1994). Ein anderes Beispiel ist das immundominante Epitop MBP(111-129): Dieses bindet an DR4 mit sehr niedriger Affinität, wie *in vitro*-Bindungsstudien zeigten, während MBP(87-99) mit höherer Affinität bindet. In MS-Patienten werden aber CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die für DR4:MBP(111-129) spezifisch sind, viel häufiger beobachtet als solche, die DR4:MBP(87-99) erkennen (Murano et al., 1997). Dieser Befund befindet sich in Übereinstimmung mit der differentiellen Aviditätshypothese von Ashton-Rickardt und Tonegawa (1994): stabile MHC II:Peptid-Komplexe werden in einer höheren Dichte auf thymalen APCs präsentiert, was zu einer negativen Selektion der entsprechenden T-Zellen führt, während autoaggressive T-Zellen, die ein instabiles Epitop erkennen, der klonalen Deletion entkommen und in die Peripherie gelangen.

Die Untersuchungen bezüglich des Einflusses von DM wurden in dieser Arbeit auf das potentielle Autoantigen MBP sowie zwei seiner immundominanten Epitope ausgedehnt. Dabei wurden zwei unterschiedliche Untersuchungsmethoden angewendet: Während der zelluläre Kompetitionsassay Aussagen über das Bindungsverhalten zuläßt (Abb. 3.24), macht der T-Zell-Proliferationsassay Angaben über die Präsentation in Form von T-Zellepitopen (Abb. 3.25). Zunächst wurden die beiden angesprochenen Epitope MBP(111-129) und MBP(87-99) untersucht, gegen die in MS-Patienten am häufigsten T-Zellen gebildet werden (Murano et al., 1997). Erwartungsgemäß können beide Peptide in Abwesenheit von DM gleichermaßen gut an DR4 binden, während sie in Anwesenheit von DM nicht oder schlechter binden. Dies gilt vor allem für das immundominante Autoepitop MBP(111-129), das durch DM negativ selektioniert wird. Da Peptide, nachdem sie beladen worden sind, auch von den entsprechenden T-Zellen erkannt werden, spiegelt der Proliferationsassay das Ergebnis des Kom-

petitionsassays wieder: Ausschließlich in Abwesenheit von DM kommt es zur Präsentation der beiden Peptide.

Im Vergleich zu Peptiden sieht die Sachlage bei Proteinen anders aus. Es ist allgemein akzeptiert, daß Proteine erst prozessiert werden müssen, bevor sie durch spezifische T-Zellen erkannt werden können. Auch ein Bericht, in dem eine spezifische T-Zellerkennung ohne vorherige Internalisierung des Antigens nachgewiesen wurde, stellt keine Ausnahme dar (Vergelli et al., 1997). Die Autoren betonten ausdrücklich, daß auch ohne Internalisierung eine Antigenprozessierung stattgefunden haben könnte, zumal es sich um ein proteolyseempfindliches Antigen handelte. Durch die Prozessierung können aber T-Zellepitope zerstört oder ihr Verhalten gegenüber DM geändert werden. Für die vorliegende Untersuchung bedeutet dies, daß man von der Bindung eines Antigens nicht zwangsläufig auf seine Präsentation schließen kann. Genau dies wird im Fall des MBP beobachtet: In Anwesenheit von DM bindet MBP zwar sehr gut an DR4, zu einer Präsentation in Form von T-Zellepitopen kommt es aber nicht. Die DM-negative Zelllinie bindet MBP jedoch nicht nur, sie präsentiert auch die beiden MBP-Epitope.

Der Grund, warum MBP-Protein in Ab- und in Anwesenheit von DM die Bindung anderer Antigene kompetiert, aber seine immundominanten Epitope nur in Abwesenheit von DM präsentiert werden, muß in dem zeitlichen Fenster zwischen Prozessierung und Präsentation liegen. Eine Zerstörung der untersuchten MBP-Epitope im Zuge der Antigenprozessierung scheidet als Grund aus, da sie von der DM-negativen Zelllinie präsentiert werden. Naheliegender ist es, den Einfluß der Prozessierung auf die DM-Selektion von MBP-Epitopen zu hinterfragen: Wie Abb. 3.24 zeigt, bindet MBP in An- und in Abwesenheit von DM als intaktes Protein und kompetiert so die Bindung anderer Antigene. Möglicherweise entstehen bei der anschließenden Prozessierung in erster Linie DM-sensitive Epitope, wie MBP(111-129), die dann als solche von DM entfernt würden (Abb 3.23 & 3.24). Dafür spricht auch, daß die Zellen beim T-Zell-Assay aufgrund der experimentellen Umstände viel mehr Zeit haben (3 Tage statt 3 Stunden), MBP zu prozessieren.

**Mit Hilfe von MBP, einem Autoantigen, das im alternativen Weg beladen wird, wurde explizit nachgewiesen, daß DM die Präsentation bekannter T-Zellepitope verhindert. Die Daten legen den Schluß nahe, daß dies auf negativer Selektion durch DM beruht.**

Diese Ergebnisse haben unter Umständen eine Bedeutung für die Autoimmunerkrankung MS. Sollte sich herausstellen, daß basisches Myelinprotein tatsächlich das Autoantigen ist, das für die Progression der Erkrankung verantwortlich ist, ergeben sich einige interessante Fragen. Wie ist es möglich, daß instabil-bindende Peptide, wie MBP(111-129), aktivierte T-Zellen hervorrufen, wo doch DM eigentlich ihre Präsentation verhindern müßte? Möglicherweise spielt hier Epitop-Mimikry eine Rolle, d.h. die Aufrechterhaltung der Aktivierung autoreaktiver MBP-spezifischer T-Zellen wird durch Nicht-MBP-Epitope bewerkstelligt. Eine an-

dere Erklärungsmöglichkeit liegt in einer stark reduzierten Aktivität von DM im alternativen Beladungsweg. Dies könnte durch eine Reduzierung der DM-Expression auf Transkriptionsebene, durch einen geänderten Transport oder durch eine geänderte Expression von DM-Regulatoren, wie z.B. HLA-DO (Denzin et al., 1997; A.B. Vogt, persönl. Mitteilung), verursacht werden. Es wäre daher in Zukunft interessant, bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen die Expression und Aktivität von DM in krankheitsrelevanten APCs zu untersuchen.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluß der Katalysator HLA-DM auf die Beladung von MHC Klasse II-Molekülen in verschiedenen subzellulären Kompartimenten und auf der Plasmamembran ausübt.

Zu Beginn dieser Dissertation zeigten mehrere Veröffentlichungen, daß MHC Klasse II-Moleküle in einem speziellen Kompartiment beladen werden. Der Vergleich dieser Arbeiten ergab aber, daß sich die beschriebenen Beladungskompartimente voneinander unterschieden und zogen die Aussage, daß MHC Klasse II-Moleküle in nur einem Kompartiment beladen werden, in Zweifel. Um dieser Frage nachzugehen, wurden B-Zellen zunächst einer präparativen Dichtegradientenzentrifugation unterworfen, die die Zellkompartimente in drei Gruppen auftrennte: in Lysosomen unterschiedlicher Dichte, in späte Endosomen und in eine Mischfraktion, die aus frühen Endosomen, Plasmamembranvesikeln, ER und Golgi bestand. Sowohl die lysosomalen als auch die spät endosomalen Fraktionen wiesen im Verhältnis zu DR vergleichsweise viel DM auf, sie enthielten DR:CLIP-Komplexe und sie beinhalten zusätzlich andere DR:Peptid-Komplexe, die mit hoher Sicherheit beladene Klasse II-Komplexe darstellen. **Das Akkumulieren des Beladungskatalysators DM, die Anwesenheit seiner bona fide Substrate, DR:CLIP-Komplexe, und das Vorkommen der Reaktionsprodukte legen den Schluß nahe, daß sowohl in späten Endosomen als auch in Lysosomen unterschiedlicher Dichte MHC Klasse II-Moleküle beladen werden.**

Aus der Literatur ist bekannt, daß auch MHC Klasse II:Peptid-Komplexe *in vitro* als Substrate für HLA-DM dienen können, sofern das Peptid instabil gebunden ist. Dies sollte unter *in vivo*-Bedingungen zu einem der Beladung nachgeschalteten Selektionsprozeß führen. Durch die Fraktionierung von B-Zellen in Plasmamembranvesikel und intrazelluläre Kompartimente wurde gezeigt, daß sich die jeweiligen Klasse II-assoziierten Peptidrepertoire voneinander unterscheiden: Das Repertoire auf der Zelloberfläche ist im Durchschnitt zwei bis drei Aminosäuren länger, umfaßt andere Peptidspezies und bindet stabiler an MHC Klasse II-Moleküle. Diese Beobachtungen sind mit der Annahme eines DM-vermittelten Selektionsprozesses vereinbar, dem Klasse II-Moleküle auf dem Weg zur Plasmamembran unterworfen werden. Die Beteiligung von DM an einem Selektionsprozeß *in vivo* ist für den Fall exogener Peptide nachgewiesen worden: In Abwesenheit von DM kann ein später zugegebener Kompetitor die zusätzliche Beladung ab der Zugabe inhibieren. In Anwesenheit von DM hingegen wird bereits beladenes Peptid gegen den Kompetitor ausgetauscht, wobei eine Korrelation zwischen der Austauscheffizienz und der Stabilität des Kompetitors besteht. **Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß DM *in vivo* an einem Selektionsprozeß des Peptidrepertoires beteiligt ist.**

HLA-DM konnte nicht nur intrazellulär, wie dies in der Literatur beschrieben ist, sondern zu einem kleinen Teil auch auf der Plasmamembran nachgewiesen werden. Der Vergleich einer DM-positiven Zelllinie mit ihrer DM-negativen Schwesterzelllinie ergab, daß DM an der schnelleren Beladung von exogenen Peptiden bei niedrigen Antigenkonzentrationen beteiligt ist. Das sofortige Einsetzen der Beladung ohne Verzögerung und das Vorkommen eines Großteils der beladenen MHC Klasse II-Moleküle in leichten, nicht-lysosomalen Kompartimenten sprechen für eine Beladung, die durch Oberflächen-DM katalysiert wird. Dieser Nachweis wurde schließlich mit einem DM-Antiserum erbracht, das aufgrund seines Molekulargewichts nicht membrangängig ist, aber in der Lage war, die Beladung exogener Peptide fast vollständig zu blockieren. Ein Großteil der durch Oberflächen-DM katalysierten Beladung findet jedoch nicht direkt auf der Oberfläche statt, da diese gleichzeitig Endozytose-abhängig ist. Dies ist als starker Hinweis zu werten, daß Klasse II-Moleküle vor allem in dem Kompartiment des alternativen Beladungsweges, in frühen Endosomen, durch Oberflächen-DM beladen werden. **Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß Oberflächen-DM die Beladung exogener Antigene katalysiert.**

HLA-DM beeinflusst jedoch nicht nur die Beladung von exogenen Peptiden, sondern auch die Präsentation von Proteinen, wie am Beispiel des basischen Myelinproteins (MBP) gezeigt wurde: Aus dem Kompetitionsassay ist ersichtlich, daß MBP in Anwesenheit von DM der bessere Kompetitor ist und folglich verstärkt beladen wird.

Das Beispiel des MBP hat außerdem interessante Implikationen im Kontext der Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose (MS), bei der dieses Protein als potentielles Autoantigen diskutiert wird. Zwar wird die Beladung von intaktem MBP durch die Anwesenheit von DM erhöht, die Präsentation bekannter T-Zellepitope aus MBP wird hingegen durch DM verhindert. Die Beobachtung, daß peptidische MBP-Epitope ebenfalls bevorzugt in Abwesenheit von DM beladen werden, läßt darauf schließen, daß das MBP-Protein nach der Prozessierung möglicherweise DM-sensitiv wird und daher von DM gegen andere Antigene ausgetauscht wird. **Dies ist der erste Hinweis, daß die Präsentation von Autoantigenen durch DM unterdrückt werden kann.**

## 6. Literaturverzeichnis

Accapezzato, D., Nisini, R., Paroli, M., Bruno, G., Bonino, F., Houghton, M. & Barnaba, V. 1998.

Generation of an MHC class II-restricted T cell epitope by extracellular processing of hepatitis delta antigen. *J. Immunol.* **160**, 5262-5266.

Adams, T.E., Bodmer, J.G. & Bodmer, W.F. 1983.

Production and characterization of monoclonal antibodies recognizing the a-chain subunits of human Ia alloantigens. *Immunology* **50**, 613-624.

Adorini, L., Appella, E., Doria, G., Cardinaux, F. & Nagy, Z.A. 1989.

Competition for antigen presentation in living cells involves exchange of peptides bound by class II MHC molecules. *Nature* **342**, 800-803.

Adorini, L. Moreno, J., Momburg, F., Hämmerling, G.J., Guery, J.C., Valli, A. & Fuchs, S. 1991.

Exogenous peptides compete for the presentation of endogenous antigens to major histocompatibility complex class II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* **174**, 945-948.

Amoscato, A.A, Prenovitz, D.A. & Lotze, M.T. 1998.

Rapid extracellular degradation of synthetic class I peptides by human dendritic cells. *J. Immunol.* **161**, 4023-4032.

Amigorena, S., Drake, J.R., Webster, P. & Mellman, I. 1994.

Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* **369**, 112-120.

Amigorena, S., Webster, P, Drake, J., Newcomb, J., Cresswell, P. & Mellman, I. 1995.

Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles. *J. Exp. Med.* **181**, 1729-1741.

Anderson, M.S. & Miller, J. 1992.

Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2282-2286.

Anderson & Cresswell, 1994.

A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J.* **13**, 675-82

Andersson, T., Patwardhan, A., Emilson, A., Carlsson, K. & Scheynius, A. 1998.

HLA-DM is expressed on the cell surface and colocalizes with HLA-DR and invariant chain in human Langerhans cells. *Arch. Dermatol. Res.* **290**, 674-680.

Arndt, S.O., Vogt, A.B., Hämmerling, G.J. & Kropshofer, H. 1997.

Selection of the MHC Class II-associated peptide repertoire by HLA-DM. *Immunol. Res.* **16**, 261-272.

- Arndt, S.O., Vogt, A.B., Hämmerling, G.J. & Kropshofer, H. 1999.  
HLA-DM controls antigenic peptide loading in the alternative pathway.  
Manuskript eingereicht
- Ashton-Rickardt, P.G. & Tonegawa, S. 1994.  
*Immunol. Today* **15**, 362-366.
- Avva, R.R. & Cresswell, P. 1994.  
In vivo and in vitro formation and dissoziation of HLA-DR complexes with invariant chain-derived peptides. *Immunity* **1**, 763-774.
- Babbit, B.P., Allen, P., Matsueda, G., Haber, G. & Unanue, E.R. 1985.  
Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* **317**, 359-360.
- Bakke, O. & Dobberstein, B. 1990.  
MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* **63**, 707-716.
- Barnes, K.A. & Mitchel, R.N. 1995.  
Detection of functional class II-associated antigen: role of a low density endosomal compartment in antigen processing. *J. Exp. Med.* **181**, 1715-1727.
- Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Feytmans, E., Thinès-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. & Berthet, J. 1974.  
Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver.  
*J. Cell Biol.* **61**, 188-200
- Beron, W. , Colombo, M.I., Mayorga, L.S. & Stahl, P.D. 1995.  
In vitro reconstitution of phagosome-endosome fusion: evidence for regulation by heterotrimeric GTPases. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 337-42
- Bijlmakers, M.-J.E., Benaroch, P. & Ploegh, H.L. 1994.  
Assembly of HLA DR1 molecules translated *in vitro*: binding of peptide in the endoplasmic reticulum precludes association with invariant chain. *EMBO J.* **13**, 2699-2707.
- Bikoff, E.K., Huang, L.Y., Episkopou, V., van Meerwijk, J., Germain, R.N. & Robertson, E.J. 1993.  
Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression.  
*J. Exp. Med.* **177**, 1699-1712.
- Blum, J.S. & Cresswell, P. 1988.  
Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3975-3979
- Bomsel, M. & Mostov, K. 1991.  
Sorting of plasma membrane proteins in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 647-653

- Bonnerot, C., Lankar, D., Hanau, D., Spehner, D., Davoust, J., Salamero, J. & Fridman, W.H. 1995.  
Role of B cell receptor Ig alpha and Ig beta subunits in MHC class II-restricted antigen presentation. *Immunity* **3**, 335-347.
- Brachet, V., Raposo, G., Amigorena, S. & Mellman, I. 1997.  
Ii chain controls the transport of major histocompatibility complex class II molecules to and from lysosomes. *J. Cell Biol.* **137**, 51-65.
- Braciale, T.J., Morrison, L.A., Sweetser, M.T., Sambrook, J., Gething, M.J. & Braciale, V.L. 1987.  
Antigen presentation pathways to class-I and class-II MHC-restricted T-lymphocytes. *Immunol. Rev.* **98**, 95-121
- Braun, M., Waheed, A. & von Figura, K. 1989.  
Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface. *EMBO J.* **8**, 3633-3640.
- Brightwell, R. & Tappel, A.L. 1968.  
Subcellular distributions and properties of rat liver phosphodiesterases. *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 325-332.
- Brown, M.G., Driscoll, J. & Monaco, J.J. 1991.  
Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* **353**, 355-357.
- Brown, J. H., Jardetsky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. & Wiley, D. C. 1993.  
Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364**, 33-39.
- Brown, W.J., DeWald, D.B., Emur, S.D., Plutner, H., & Balch, W.E. 1995.  
Role for phosphatidylinositol 3 kinase in the sorting and transport of newly synthesized lysosomal enzymes in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **130**, 781-796.
- Burgoyne, R.D. & Morgan, A. 1993.  
Regulated endocytosis. *Biochem. J.* **293**, 305-316.
- Burnet, F.M. 1959.  
The clonal selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press, London.
- Busch, R., Strang, G., Howland, K., & Rothbard, J.B. 1990.  
Degenerate binding of immunogenic peptides to HLA-DR proteins on B cell surfaces. *Int. Immunol.* **2**, 443-451.
- Busch, R., Hill, C.M., Hayball, J.D., Lamb, J.R. & Rothbard, J.B. 1991.  
Effect of natural polymorphism at residue 86 of the HLA-DR beta chain on peptide binding. *J. Immunol.* **147**, 1292-8.

- Busch, R., Cloutier, I., Sékaly, R.-P. & Hämmerling, G.J. 1996.  
Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **15**, 418-428.
- Busch, R. & Mellins, E.D. 1996.  
Developing and shedding inhibitions: how MHC class II molecules reach maturity. *Curr.Opin. Immunol.* **8**, 51-8
- Busch, R., Doebele, R.C., von Scheven, E., Fahrni, J., & Mellins, E.D. 1998a.  
Aberrant intermolecular disulfide bonding in a mutant HLA-DM molecule: Implications for assembly, maturation, and function. *J. Immunol.* **160**, 734-743.
- Busch, R., Reich, Z., Zaller, D.M., Sloan, V. & Mellins, E.D. 1998b.  
Secondary structure composition and pH-dependent conformational changes of soluble recombinant HLA-DM. *J. Cell Biol.* **273**, 27557-27564.
- Buus, S., Sette, A., Colon, S.M., Jenis, D.M. & Grey, H.M. 1986.  
Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition. *Cell* **47**, 1071-1077.
- Campbell, R.D. & Trowsdale, J. 1993.  
Map of the human MHC. *Immunol. Today* **14**, 349-352.
- Carlsson, S.R., Roth, J., Piller, F. & Fukuda, M. 1988.  
Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylectosaminoglycan. *J. Biol. Chem.* **263**, 18911-18919
- Castellino, F. & Germain, R.N. 1995.  
Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity* **2**, 73-88.
- Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K. & Zerial, M. 1990.  
Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**, 317-329
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. & Lanzavecchia, A. 1997.  
Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**, 782-787.
- Ceman, S., Rudersdorf, R., Long, E.O. & DeMars, R. 1992.  
MHC class II deletion mutant express normal levels of transgene encoded class II molecules that have abnormal conformation and impaired antigen presentation ability. *J. Immunol.* **149**, 754-761.
- Chang, M.P., Mallet, W.G., Mostov, K.E. & Brodsky, F.M. 1993.  
Adaptor self-aggregation, adaptor receptor recognition and binding of  $\alpha$ -adaptin subunits to the plasma membrane contribute to recruitment of adaptor (AP2) components of clathrin-coated pits. *EMBO J.* **12**, 2169-2180.

- Chang, C.-H., Guerder, S., Hong, S.C., von Ewijk, W. & Flavell, R.A. 1996.  
Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression. *Immunity* **4**, 167-178.
- Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K. & Zerial, M. 1990.  
Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**, 317-329.
- Chervonsky, A.V., Gordon, L. & Sant, A.J. 1994.  
A segment of the MHC class II beta chain plays a critical role in targeting class II molecules to the endocytic pathway. *Int. Immunol.* **6**, 973-82.
- Chicz, R.M., Urban, R.G., Lane, W.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Vignali, D.A. & Strominger, J.L. 1992.  
Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* **358**, 764-768.
- Chicz, R.M., Urban, R.G., Gorga, J.C., Vignali, D.A., Lane, W.S. & Strominger, J.L. 1993.  
Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* **178**, 27-47.
- Cho, S., Attaya, M. & Monaco, J.J. 1991.  
New class II-like genes in the murine MHC. *Nature* **353**, 573-576.
- Claesson-Welsh, L. & Peterson, P.A. 1985.  
Implications of the invariant gamma-chain on the intracellular transport of class II histocompatibility antigens. *J. Immunol.* **135**, 3551-3557.
- Collins, D.S., Unanue, E.R. & Harding, C.V. 1991.  
Reduction of disulfide bonds within lysosomes is a key step in antigen processing. *J. Immunol.* **147**, 4054-4059.
- Davidson, H.W., Reid, P.A., Lanzavecchia, A. & Watts, C. 1991.  
Processed antigen binds to newly synthesized MHC class II molecules in antigen-specific B lymphocytes. *Cell* **67**, 105-16.
- Davidson, H.W. 1995.  
Wortmannin causes mistargeting of procathepsin D. Evidence for the involvement of a phosphatidylinositol 3 kinase in vesicular transport to lysosomes. *J. Cell Biol.* **130**, 797-805.
- Davis, M.M. & Bjorkman, P.J. 1988.  
T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**, 395-402.
- Denzin, L.K., Robbins, N.F., Carboy-Newcomb, C. & Cresswell, P. 1994.  
Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* **1**, 595-606.

- Denzin, L.K. & Cresswell, P. 1995.  
HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II ab dimers and facilitates peptide loading. *Cell* **82**, 155-165.
- Denzin, L.K., Hammond, C. & Cresswell, P. 1996.  
HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J. Exp. Med.* **184**, 2153-2165.
- Denzin, L.K., Sant'Angelo, D.B., Hammond, C., Surman, M.J. & Cresswell, P. 1997.  
Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. *Science* **278**, 106-109.
- Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G. & Griffiths, G. 1994.  
Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J. Cell. Biol.* **124**, 667-688.
- Devaux, B., Wilson, K.J., Aguilar, B., Jorgensen, B. & Rothbard, J.B. 1995.  
Differential stability of HLA-DR alleles independent of endogenous peptides. *J. Immunol.* **155**, 1921-1928.
- Diment, S. 1990.  
Different roles for thiol and aspartyl proteases in antigen presentation of ovalbumin. *J. Immunol.* **145**, 417-22.
- Douek, D.C. & Altmann, D.M. 1997.  
HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *Int. Immunol.* **9**, 355-364.
- Dunn, K.W. & Maxfield, F.R. 1992.  
Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J. Cell. Biol.* **117**, 301-310.
- de Duve, C. 1971.  
Tissue Fractionation - past and present. *J. Cell Biol.* **30**, 20D-50D.
- Escola, J.M., Grivel, J.C., Chavrier, P. & Gorvel, J.P. 1995.  
Different endocytic compartments are involved in the tight association of class II molecules with processed hen egg lysozyme and ribonuclease A in B cells. *J. Cell Sci.* **108**, 2337-2345.
- Fairchild, P.J., Wildgoose, R., Atherton, E., Webb, S. & Wraith, D.C. 1993.  
An autoantigenic T cell epitope forms unstable complexes with class II MHC: a novel route for escape from tolerance induction. *Int. Immunol.* **5**, 1151-1158.
- Von Figura, K. 1991.  
Molecular recognition and targeting of lysosomal proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 642-646.
- Fling, S.P., Arp, B. & Pious, D. 1994.  
HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* **368**, 554-558.

- Freisewinkel, I.M., Schenck, K. & Koch, N. 1993.  
The segment of invariant chain that is critical for association with MHC class II molecules contains the sequence of a peptide eluted from class II polypeptides.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9703-9706.
- Fung-Leung, W.-P., Surh, C.D., Liljedahl, M., Pang, J., Leturcq, D., Peterson, P.A., Webb, S.R. & Karlsson, L. 1996.  
Antigen presentation and T cell development in H2-M deficient mice.  
*Science* **271**, 1278-1281.
- Germain, R. & Hendrix, L.R. 1991.  
MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding. *Nature* **353**, 134-139.
- Germain, R. & Rinker Jr., A.G. 1993.  
Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes selective cell surface expression of occupied molecules. *Nature* **363**, 725-728.
- Germain, R.N. 1994.  
MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**, 287-299.
- Geuze, H.J., Slot, J.W., Strous, G.J., Hasilik, A. & von Figura, K. 1984.  
Ultrastructural localization of the mannose 6-phosphate receptor in rat liver.  
*J. Cell Biol.* **98**, 2047-2054
- Ghosh, P., Amaya, M., Mellins, E. & Wiley, D.C. 1995.  
The structure of HLA-DR3 complexed with CLIP, an intermediate in peptide loading.  
*Nature* **387**, 457-462.
- Glynne, R., Powis, S.H., Beck, S., Kelly, A., Kerr, L.A. & Trowsdale, J. 1991.  
A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* **353**, 357-360.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G.W., Russell, D.W. & Schneider, W.J. 1985.  
Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system.  
*Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 1-39.
- Gorga, J.C., Horejsi, V., Johnson, D.R., Raghupathy, R. & Strominger, J.L. 1987.  
Purification and characterization of class II histocompatibility antigens from a homozygous human B cell line. *J. Biol. Chem.* **262**, 16087-16094
- Green, J.M., DeMars, R., Xu, X. & Pierce, S.K. 1995.  
The intracellular transport of MHC class II molecules in the absence of HLA-DM.  
*J. Immunol.* **155**, 3759-3768.
- Griffin, J.P., Chu, R. & Harding, C.V. 1997.  
Early endosomes and a late endocytic compartment generate different peptide-class II MHC complexes via distinct processing mechanisms. *J. Immunol.* **158**, 1523-1532.

- Guagliardi, L.E., Koppelman, B., Blum, J.S., Marks, M.S., Cresswell, P. & Brodsky, F.M. 1990.  
Co-localization of molecules involved in antigen processing and presentation in an early endocytic compartment. *Nature* **343**, 133-139.
- Gustafsson, K., Widmark, E., Jonsson, A.K., Serenius, B., Sachs, D.H., Larhammar, D., Rask, L. & Peterson, P.A. 1987.  
Class II genes of the human major histocompatibility complex. Evolution of the DP region as deduced from nucleotide sequences of the four genes. *J. Biol. Chem.* **262**, 8778-8786.
- van Ham, S.M., Grüneberg, U., Malcharek, G., Bröker, I., Melms, A. & Trowsdale, J. 1996.  
Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs. *J. Exp. Med.* **184**, 2019-2024.
- van Ham, S.M., Tijn, E.P.M., Lillemeier, B.F., Grüneberg, U., van Meijgaarden, K.E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D., Ottenhoff, T.H.M., Pappin, D.J.C., Trowsdale, J. & Neefjes, J. 1997.  
HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM mediated MHC class II peptide loading. *Curr. Biol.* **7**, 950-957.
- Hammer, J., Belunis, C., Bolin, D., Papadopoulos, J., Walsky, R., Higelin, J., Danho, W., Sinigaglia, F. & Nagy, Z. 1994.  
High-affinity binding of short peptides to major histocompatibility complex class II molecules by anchor combinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4456-4460.
- Harding, C.V. & Unanue, E.R. 1989.  
Antigen processing and intracellular Ia. Possible roles of endocytosis and protein synthesis in Ia function. *J. Immunol.* **142**, 12-19.
- Harding, C.V. & Geuze, H.J. 1993.  
Immunogenic peptides bind to class II MHC molecules in an early lysosomal compartment. *J. Immunol.* **151**, 3988-3998
- Harding, C.V. 1995.  
Intracellular organelles involved in antigen processing and the binding of peptides to class II MHC molecules. *Semin. Immunol.* **7**, 355-60
- Hedley, M.L., Urban, R.G. & Strominger, J.L. 1994.  
Assembly and peptide binding of major histocompatibility complex class II heterodimers in an in vitro translation system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10479-10483.
- Helenius, A., Mellman, I., Wall, D. & Hubbard, A. 1983.  
Endosomes. *Trends Biochem. Sci.* **8**, 245-250.
- Hewitt, E.W., Treumann, A., Morrice, N., Tatnell, P.J., Kay, J. & Watts, C. 1997.  
Natural processing sites for human cathepsin E and cathepsin D in tetanus toxin: implications for T cell epitope generation. *J. Immunol.* **159**, 4693-4699.

- Hunt, D.F., Michel, H., Dickinson, T.A., Shabanowitz, J., Cox, A.L., Sakaguchi, K., Appella, E., Grey, H.M. & Sette, A. 1992.  
Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science* **256**, 1817-1820.
- Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Busch, R., Rothbard, J., Strominger, J.L. & Wiley, D.C. 1990.  
Peptide binding to HLA-DR1: a peptide with most residues substituted to alanine retains MHC binding. *EMBO J.* **9**, 1797-1803.
- Jensen, P.E. 1991.  
Reduction of disulfide bonds during antigen processing: evidence from a thiol-dependent insulin determinant. *J. Exp. Med.* **174**, 1121-1130.
- Thayer, W.P., Ignatowicz, L., Weber, D.A. & Jensen, P.E. 1999.  
Class II-associated invariant chain peptide-independent binding of invariant chain to class II MHC molecules. *J. Immunol.* **162**, 1502-9
- Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M. & Nussenzweig, M.C. 1995.  
The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**, 151-155.
- Jonsson, A.K., Hyldig-Nielsen, J.J., Serenius, B., Larhammar, D., Andersson, G., Jorgensen, F., Peterson, P.A. & Rask, L. 1987.  
Class II genes of the human major histocompatibility complex. Comparisons of the DQ and DX alpha and beta genes. *J. Biol. Chem.* **262**, 8767-8777.
- Jonsson, A.-K. & Rask, L. 1989.  
Human class II DNA and DOB genes display a low sequence variability. *Immunogenetics* **29**, 411-413.
- Kalbacher, H. & Kropshofer, H. 1991.  
Non-radioactive detection of MHC class II-peptide antigen complexes in the sub-picomole range by high-performance size-exclusion chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* **548**, 343-350.
- Karlsson, L., Surh, C.D., Sprent, J. & Peterson, P.A. 1991.  
A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* **351**, 485-8
- Karlsson, L., Peleraux, A., Lindstedt, R., Liljedahl, M. & Peterson, P.A. 1994.  
Reconstitution of an operational MHC class II compartment in nonantigen-presenting cells. *Science* **266**, 1569-1573.
- Katz, J.F., Stebbins, C., Appella, E. & Sant, A.J. 1996.  
Invariant Chain and DM edit self-peptide presentation by major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. *J. Exp. Med.* **184**, 1747-1753.

- Kaufman, J.F., Auffray, C., Korman, A.J., Shackelford, D.A. & Strominger, J. 1984.  
The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex.  
*Cell* **36**, 1-13.
- Kawai, J., Ando, A., Sato, T., Nakatsuji, T., Tsuji, K. & Inoko, H. 1989.  
Analysis of gene structure and antigen determinants of DR2 antigens using DR gene transfer  
into mouse L cells. *J. Immunol.* **142**, 312-317.
- Kelly, A., Powis, S.H., Glynne, R., Radley, E., Beck, S. & Trowsdale, J. 1991a.  
Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* **353**, 667-668.
- Kelly, A.P., Monaco, J.J., Cho, S., & Trowsdale, J. 1991b.  
A new human HLA class II-related locus. *Nature* **353**, 571-573.
- Kirschke, H. & Barrett, A.J. 1987.  
Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown.  
Glaumann, H. & Ballard, F.J., editors. Academic Press, Inc., Orlando, FL..
- Kleijmeer, M.J., Morkowski, S., Griffith, J.M., Rudensky, A.Y. & Geuze, H.J. 1997.  
Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts  
represent conventional endocytic compartments. *J. Cell Biol.* **139**, 639-649.
- Klein, J. 1991.  
Immunologie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Kornfeld, S. 1992.  
Structure and function of the mannose-6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors.  
*Annu. Rev. Biochem.* **61**, 307-330.
- Kovats, S., Grubin, C.E., Eastman, E., deRoos, P., Dongre, A., Van Kaer, L., & Rudensky, A.Y. 1998.  
Invariant chain-independent function of H-2M in the formation of endogenous peptide-major  
histocompatibility complex class II complexes in vivo. *J. Exp. Med.* **187**, 245-251.
- Kropshofer, H., Bohlinger, I., Max, H. & Kalbacher, H. 1991. Self and foreign peptides  
interact with intact and disassembled MHC class II antigen HLA-DR1 via Trp pockets.  
*Biochemistry* **30**, 9177-9187.
- Kropshofer, H., Max, H., Muller, C.A., Hesse, F., Stevanovic, S., Jung, G. & Kalbacher, H.  
1992.  
Self-peptide released from class II HLA-DR1 exhibits a hydrophobic two-residue contact  
motif. *J. Exp. Med.* **175**, 1799-1803.
- Kropshofer, H., Vogt, A.B. & Hammerling, G.J. 1995a.  
Structural features of the invariant chain fragment CLIP controlling rapid release from HLA-  
DR molecules and inhibition of peptide binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8313-8317.
- Kropshofer, H., Vogt, A.B., Stern, L.J. & Hämmerling, G.J. 1995b.  
Self-release of CLIP in peptide loading of HLA-DR molecules. *Science* **270**, 1357-1359.

- Kropshofer, H., Vogt, A.B., Moldenhauer, G., Hammer, J., Blum, J.S., & Hämmerling, G.J. 1996.  
Editing of the HLA-DR peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J.* **15**, 6144-6154.
- Kropshofer, H., Arndt, S.O., Moldenhauer, G., Hämmerling, G.J. & Vogt, A.B. 1997a.  
HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* **6**, 293-302.
- Kropshofer, H., Hämmerling, G.J. & Vogt, A.B. 1997b.  
How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: survival of the fittest ?  
*Immunol. Today* **18**, 77-82.
- Kropshofer, H., Vogt, A.B., Thery, C., Armandola, E.A., Li, B.-C., Moldenhauer, G., Amigorena, S. & Hämmerling, G.J. 1998.  
A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.* **17**, 2971-2981.
- Laemmli, U.K. 1970.  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature* **227**, 680-685.
- Lampson, L.A. & Levy, R. 1980.  
Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J. Immunol.* **125**, 293-299.
- Lanzavecchia, A. 1985.  
Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* **314**, 537-9
- Lanzavecchia, A. 1990.  
Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 773-793.
- Lanzavecchia, A., Reid, P.A. & Watts, C. 1992.  
Irreversible association of peptides with class II MHC molecules in living cells.  
*Nature* **357**, 249-252.
- Larhammar, D., Serenius, B., Rask, L. & Peterson, P.A. 1985.  
Characterization of an HLA DR beta pseudogene.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1475-1479.
- Lawrence, B.P. & Brown, W.J. 1992.  
Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes.  
*J. Cell Sci.* **102**, 515-526.
- Li, G., D'Souza-Schorey, C., Barbieri, M.A., Roberts, R.L., Klippel, A., Williams, L.T. & Stahl, P.D. 1995.  
Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10207-10211.

- Liang, M.N., Beeson, C., Mason, C. & McConnell, H.M. 1995.  
Kinetics of the reaction between the invariant chain (85-99) peptide and proteins of the murine class II MHC. *Int. Immunol.* **7**, 1397-1404.
- Liljedahl, M., Kuwana, T., Fung-Leung, W.-P., Jackson, M.R., Peterson, P.A. & Karlsson, L. 1996.  
HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* **15**, 4817-4824.
- Liljedahl, M., Winqvist, O., Surh, C.D., Wong, P., Ngo, K., Teyton, L., Peterson, P.A., Brunmark, A., Rudensky, A.Y., Fung-Leung, W.-P. & Karlsson, L. 1998.  
Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* **8**, 233-243.
- Lindner, R. & Unanue, E.R. 1996.  
Distinct antigen MHC class II complexes generated by separate processing pathways. *EMBO J.* **15**, 6910-6920.
- Lindstedt, R., Liljedahl, M., Péléraux, A., Peterson, P.A. & Karlsson, L. 1995.  
The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif. *Immunity* **3**, 561-572.
- Lippincott-Schwartz, J. & Fambrough, D.M. 1987.  
Cycling of the integral membrane glycoprotein, LEP100, between plasma membrane and lysosomes: kinetic and morphological analysis. *Cell* **49**, 669-677.
- Liu, G.Y. & Wraith, D.C. 1995.  
Affinity for class II MHC determines the extent to which soluble peptides tolerize autoreactive T cells in naive and primed adult mice--implications for autoimmunity. *Int. Immunol.* **7**, 1255-1263.
- Liu, S.-H., Marks, M.S. & Brodsky, F.M. 1998.  
A dominant-negative clathrin mutant differentially affects trafficking of molecules with distinct sorting motifs in the class II major histocompatibility complex (MHC) pathway. *J. Cell Biol.* **140**, 1023-1037.
- Lotteau, V., Teyton, L., Burroughs, D. & Charron, D. 1987.  
A novel HLA class II molecule (DR alpha-DQ beta) created by mismatched isotype pairing. *Nature* **329**, 339-341.
- Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S.L., Quaranta, V. & Peterson, P.A. 1990.  
Intracellular transport of class II MHC molecules directed by the invariant chain. *Nature* **348**, 600-605.
- Machy, P., Bizozzero, J.P., Reggio, H. & Leserman, L. 1990.  
Endocytosis and recycling of MHC-encoded class II molecules by mouse B lymphocytes. *J. Immunol.* **145**, 1350-1355.

- Malcherek, G., Gnau, V., Jung, G., Rammensee, H.G. & Melms, A. 1995.  
Supermotifs enable natural invariant chain-derived peptides to interact with many major histocompatibility complex-class II molecules. *J. Exp. Med.* **181**, 527-536.
- Manca, F., Fenoglio, D., Li-Pira, G., Kunkl, A. & Celada, F. 1991.  
Effect of antigen/antibody ratio on macrophage uptake, processing, and presentation to T cells of antigen complexed with polyclonal antibodies. *J. Exp. Med.* **173**, 37-48.
- Mane, S.M., Marzella, L., Bainton, D.F., Holt, V.K., Cha, Y., Hildreth, J.E. & August, J.E. 1989.  
Purification and characterisation of human lysosomal membrane glycoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 360-378.
- Maric, M.A., Taylor, M.D. & Blum, J.S. 1994.  
Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2171-2175.
- Marks, M.S., Blum, J.S. & Cresswell, P. 1990.  
Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J. Cell. Biol.* **111**, 839-55.
- Marks, M.S., Roche, P.A., van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P.J. & Bonifacio, J.S. 1995.  
A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the b chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J. Cell Biol.* **131**, 351-369.
- Martin, R. McFarland, H.F. & McFarlin, D.E. 1992.  
Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 153-187.
- Martin, W.D., Hicks, G.G., Mendiratta, S.K., Leva, H.I., Ruley, H.E. & van Kaer, L. 1996.  
H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection. *Cell* **84**, 543-550.
- Martinez, C.K. & Monaco, J.J. 1991.  
Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature* **353**, 664-667.
- Mason, K. & McConnell, H.M. 1994.  
Short-lived complexes between myelin basic protein peptides and IAk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12463-12466.
- Matsuno, K., Ezaki, T., Kudo, S. & Uehara, Y. 1996.  
A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J. Exp. Med.* **183**, 1865-1878.
- Max, H., Halder, T., Kropshofer, H., Kalbus, M., Müller, C.A. & Kalbacher, H. 1993.  
Charakterisierung von Peptiden, die an extracelluläre und intracelluläre HLA-DR1-Moleküle binden. *Human Immunol.* **38**, 193-200.

- Mellins, E., Smith, L., Arp, B., Cotner, T., Celis, E. & Pious, D. 1990.  
Defective processing and presentation of exogenous antigens in mutants with normal HLA class II genes. *Nature* **343**, 71-74.
- Mellins, E., Kempin, S., Smith, L., Monji, T. & Pious, D. 1991.  
A gene required for class II-restricted antigen presentation maps to the major histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* **174**, 1607-1615.
- Mellins, E., Cameron, P., Amaya, M., Goodman, S., Pious, D., Smith, L. & Arp, B. 1994.  
A mutant human histocompatibility leukocyte antigen DR molecule associated with invariant chain peptides. *J. Exp. Med.* **179**, 541-549.
- Mellman, I., Pierre, P. & Amigorena, S. 1995.  
Lonely MHC molecules seeking immunogenic peptides for meaningful relationships. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 564-572.
- Metzelaar, M.J., Winjngaard, P.L.J., Peters, P.J., Sixma, J.J., Nieuwenhuis, H.K. & Clevers, H.C. 1991.  
CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 3239-3245.
- Mitchel, R.N., Barnes, K.A., Grupp, S.A., Sanchez, M., Misulovin, Z., Nussenzweig, M.C. & Abbas, A.K. 1995.  
Intracellular targeting of antigens internalized by membrane immunoglobulin in B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **181**, 1705-1714.
- Miyazaki, T., Wolf, P., Tourne, C., Waltzinger, C., Dierich, A., Barois, N., Ploegh, H., Benoist, C. & Mathis, D. 1996.  
Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* **84**, 531-542.
- Momburg, F., Fuchs, S., Drexler, J., Busch, R., Post, M., Hämmerling, G.J. & Adorini, L. 1993.  
Epitope-specific enhancement of antigen presentation by invariant chain. *J. Exp. Med.* **178**, 1453-8.
- Monaco, J.J., Cho, S. & Attaya, M. 1990.  
Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing. *Science* **250**, 1723-1726.
- Monji, T. & Pious, D. 1997.  
Exogenously provided peptides fail to complex with intracellular class II molecules for presentation by antigen-presenting cells. *J. Immunol.* **158**, 3155-3164.
- Morgan, D.O., Edman, J.C., Standring, D.N., Fried, V.A., Smith, M.C., Roth, R.A. & Rutter, W.J. 1987.  
Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* **329**, 301-307.

Morris, P., Shaman, J., Attaya, M., Amaya, M., Goodman, S., Bergman, C., Monaco, J.J. & Mellins, E. 1994.

An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* **368**, 551-554.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., & Coffman, R.L. 1986.

Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 2348-57.

Mosyak, L., Zaller, D.M. & Wiley D.C. 1998.

The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* **9**, 377-383.

Muraro, P.A., Vergelli, M., Kalbus, M., Banks, D.E., Nagle, J.W., Tranquill, L.R., Nepom, G.T., Biddison, W.E. McFarland, H.F. & Martin, R. 1997.

Immunodominance of a low-affinity major histocompatibility complex-binding myelin basic protein epitope (residues 111-129) in HLA-DR4 (B1\*0401) subjects is associated with a restricted T cell receptor repertoire. *J. Clin. Invest.* **100**, 339-349.

Nakagawa, T.Y., Brissette, W.H., Lira, P.D., Griffiths, R.J., Petrushova, N., Stock, J., McNeish, J.D., Eastman, S.E., Howard, E.D., Clarke, S.R.M., Rosloniec, E.F., Elliott, E.A. & Rudensky, A.Y. 1999.

Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* **10**, 207-217.

Nadimi, F., Moreno, J., Momburg, F., Heuser, A., Fuchs, S., Adorini, L. & Hämmerling, G.J. 1991.

Antigen presentation of hen egg-white lysozyme but not of ribonuclease A is augmented by the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain.

*Eur. J. Immunol.* **21**, 1255-1263.

Neefjes, J.J. & Ploegh, H.L. 1992.

Inhibition of endosomal proteolytic activity by leupeptin blocks surface expression of MHC class II molecules and their conversion to SDS resistance alpha beta heterodimers in endosomes. *EMBO J.* **11**, 411-416.

Neefjes, J.J. 1999.

CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading.

*Eur. J. Immunol.* **29**, 1421-1425.

Nelson, C.A., Petzold, S.J. & Unanue, E.R. 1993.

Identification of two distinct properties of class II major histocompatibility complex-associated peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1227-31.

Nelson, C.A., Petzold, S.J. & Unanue, E.R. 1994.

Peptides determine the lifespan of MHC class II molecules in the antigen-presenting cell.

*Nature* **371**, 250-252.

- Newcomb, J.R. & Cresswell, P. 1993.  
Structural analysis of proteolytic products of MHC class II-invariant chain complexes generated in vivo. *J. Immunol.* **151**, 4153-4163.
- van Noort, J.M., Boon, J., van der Drift, A.C., Wagenaar, J.P., Boots, A.M. & Boog, C.J. 1991.  
Antigen processing by endosomal proteases determines which sites of sperm-whale myoglobin are eventually recognized by T cells. *Eur. J. Immunol.* **21**, 1989-96
- van Noort, J.M. & Jacobs, M.J. 1994.  
Cathepsin D, but not cathepsin B, releases T cell stimulatory fragments from lysozyme that are functional in the context of multiple murine class II MHC molecules. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2175-80.
- Novick, P. & Zerial, M. 1997.  
The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 496-504.
- Oh, Y.-K. & Swanson, J.A. 1996.  
Different fates of phagocytosed particles after delivery into macrophage lysosomes. *J. Cell Biol.* **132**, 585-593.
- Ong, B., Willcox, N., Wordsworth, P., Beeson, D., Vincent, A., Altmann, V., Lanchbury, J.S.S., Harcourt, G.C., Bell, J.I. & Newsom-Davis, J. 1991.  
Critical role for the Val/Gly86 HLA-DR beta dimorphism in autoantigen presentation to human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7343-7347.
- Orci, L., Palmer, D.J., Amherdt, M. & Rothman, J.E. 1993.  
Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatamer and ARF proteins from the cytosol. *Nature* **364**, 732-734.
- Ortiz-Navarrete, V., Seelig, A., Gernod, M., Frentzel, S. Kloetzel, P.M. & Hämmerling, G.J. 1991.  
Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* **353**, 662-664.
- Parton, R.G., Schrotz, P., Bucci, C. & Gruenberg, J. 1992.  
Plasticity of early endosomes. *J. Cell Sci.* **103**, 335-348.
- Peters, P.J., Neefjes, J.J., Oorschot, V., Ploegh, H.L. & Geuze, H.J. 1991.  
Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* **349**, 669-676.
- Peters, C. & von Figura, K. 1994.  
Biogenesis of lysosomal membranes. *FEBS Letters* **346**, 108-114.
- Pierre, P., Denzin, L.K., Hammond, C., Drake, J.R., Amigorena, S., Cresswell, P. & Mellman, I. 1996.  
HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. *Immunity* **4**, 229-239.

- Pierre, P., Turley, S.J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R.M. & Mellman, I. 1997.  
Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells [see comments] *Nature* **388**, 787-792
- Pieters, J., Horstmann, H., Bakke, O., Griffiths, G. & Lipp, J. 1991.  
Intracellular transport and localization of major histocompatibility complex class II molecules and associated invariant chain. *J. Cell Biol.* **115**, 1213-1223.
- Pieters, J., Bakke, O. & Dobberstein, B. 1993.  
The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J. Cell Sci.* **106**, 831-846.
- Pinet, V., Malnati, M.S. & Long, E.O. 1994.  
Two processing pathways for the MHC class II-restricted presentation of exogenous influenza virus antigen. *J. Immunol.* **152**, 4852-4560.
- Pinet V., Vergelli M., Martin R., Bakke O. & Long E.O. 1995.  
Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature* **375**, 603-606.
- Pinet, V.M. & Long, E.O. 1998.  
Peptide loading onto recycling HLA-DR molecules occurs in early endosomes. *Eur. J. Immunol.* **28**, 799-804.
- Pond, L. & Watts, C. 1997.  
Characterization of transport of newly assembled, T cell-stimulatory MHC class II-peptide complexes from MHC class II compartments to the cell surface. *J. Immunol.* **159**, 543-553.
- Qiu, Y., Xu, X., Wandinger-Ness, A., Dalke, D.P. & Pierce, S.K. 1994.  
Separation of subcellular compartments containing distinct functional forms of MHC class II. *J. Cell Biol.* **125**, 595-605
- Radrizzani, L., Bono, E., Vogt, A.B., Kropshofer, H., Gallazzi, F., Sturniolo, T., Hämmerling, G.J., Sinigaglia, F. & Hammer, J. 1999.  
Identification of destabilizing residues in HLA class II-selected bacteriophage display libraries edited by HLA-DM. *Eur. J. Immunol.* **29**, 660-668.
- Ramachandra, L., Kovats, S., Eastman, A., & Rudensky, A.Y. 1996.  
Variation in HLA-DM expression influences conversion of MHC class II  $\alpha\beta$ :class II-associated invariant chain peptide complexes to mature peptide bound class II  $\alpha\beta$  dimers in a normal B cell line. *J. Immunol.* **156**, 2196-2204
- Rammensee, H.-G., Friede, T. & Stefanovic, S. 1995.  
MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* **41**, 178-228.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J. & Geuze, H.J. 1996.  
B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**, 1161-1169.

- Reid, P.A. & Watts, C. 1990.  
Cycling of cell-surface MHC glycoproteins through primaquine-sensitive intracellular compartments. *Nature* **346**, 655-657.
- Reid, P.A. & Watts, C. 1992.  
Constitutive endocytosis and recycling of major histocompatibility complex class II glycoproteins in human B-lymphoblastoid cells. *Immunology* **77**, 539-542.
- Reis e Sousa, C., Stahl, P.D. & Austyn, J.M. 1993.  
Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* **178**, 509-19.
- Riberdy, J.M., Newcomb, J.R., Surman, M.J., Barbosa, J.A. & Cresswell, P. 1992.  
HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* **360**, 474-7.
- Riberdy, J.M., Avva, R.R., Geuze, H.J. & Cresswell, P. 1994.  
Transport and intracellular distribution of MHC class II molecules and associated invariant chain in normal and antigen-processing mutant cell lines. *J. Cell Biol.* **125**, 1225-1237.
- Riese, R.J., Wolf, P.R., Brömme, D., Natkin, L.R., Villadangos, J.A., Ploegh, H.L. & Chapman, H.A. 1996.  
Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* **4**, 357-366.
- Roche, P.A. & Cresswell, P. 1990.  
Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* **345**, 615-618.
- Roche, P.A., Marks, M. S. & Cresswell, P. 1991.  
Formation of a nine subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* **354**, 392-394.
- Roche, P.A., Teletski, C.L., Karp, D.R., Pinet, V., Bakke, O. & Long, E.O. 1992.  
Stable surface expression of invariant chain prevents peptide presentation by HLA-DR. *EMBO J.* **11**, 2841-2847.
- Roche, P.A., Teletski, C.L., Stang, E., Bakke, O. & Long, E.O. 1993.  
Class II molecules are transported to endosomes via the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8581-8585
- Rock, K.L., Benacerraf, B. & Abbas, A.K. 1984.  
Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors. *J. Exp. Med.* **160**, 1102-1113.
- Rodriguez, G.M. & Diment, S. 1992.  
Role of cathepsin D in antigen presentation of ovalbumin. *J. Immunol.* **149**, 2894-8

Rodriguez, G.M. & Diment, S. 1995.

Destructive proteolysis by cysteine proteases in antigen presentation of ovalbumin. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1823-7

Rohrer, J., Schweizer, A., Russell, D. & Kornfeld, S. 1996.

The targeting of lamp 1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine motif relative to the membrane. *J. Cell Biol.* **132**, 565-576.

Romagnoli, P. & Germain, R.N. 1994.

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

Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A. & Janeway, C.A. Jr 1991.

Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* **353**, 622-627.

Rudensky, A.Y., Maric, M., Eastman, S., Shoemaker, L., DeRoos, P.C. & Blum, J.S. 1994.

Intracellular assembly and transport of endogenous peptide-MHC class II complexes. *Immunity* **1**, 585-94.

Sadegh-Nasseri, S. & Germain, R.N. 1991.

A role for peptide in determining MHC class II structure. *Nature* **353**, 167-170.

Sadegh-Nasseri, S. & Germain, R.N. 1992.

How MHC class II molecules work: peptide-dependent completion of protein folding. *Immunol. Today* **13**, 43-6.

Sadegh-Nasseri, S., Stern, L.J., Wiley, D.C. & Germain, R.N. 1994.

MHC class II function preserved by low-affinity peptide interactions preceding stable binding. *Nature* **370**, 647-650.

Salamero, J., Humbert, M., Cosson, P. & Davoust, J. 1990.

Mouse B lymphocyte specific endocytosis and recycling of MHC class II molecules. *EMBO J.* **9**, 3489-3496.

Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. 1994.

Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **179**, 1109-1118.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. 1995.

Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**, 389-400.

Sanderson, F., Kleijmeer, M.J., Kelly, A., Verwoerd, D., Tulp, A., Neefjes, J.J., Geuze, H.J., Trowsdale, J. 1994.

Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* **266**, 1566-1569.

- Sanderson, F., Thomas, C., Neefjes, J. & Trowsdale, J. 1996.  
Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo. *Immunity* **4**, 87-96.
- Sant, A.J., Hendrix, L.R., Coligan, J.E., Maloy, W.L. & Germain, R.N. 1991.  
Defective intracellular transport as a common mechanism limiting expression of inappropriately paired class II major histocompatibility complex alpha/beta chains. *J. Exp. Med.* **174**, 799-808.
- Schafer, P.H., Green, J.M., Malapati, S., Gu, L. & Pierce, S.K. 1996.  
HLA-DM is present in one-fifth the amount of HLA-DR in the class II peptide loading compartment where it associates with leupeptin-induced peptide (LIP)-HLA-DR complexes. *J. Immunol.* **157**, 5487-5495.
- Schaiff, W.T., Hruska Jr., K.A., McCourt, D.W., Green, M. & Schwartz, B.D. 1992.  
HLA-DR associates with specific stress proteins and is retained in the endoplasmic reticulum in invariant chain-negative cells. *J. Exp. Med.* **176**, 657-666.
- Schwartz-Albiez, R., Dorken, B., Monner, D.A. & Moldenhauer, G. 1991.  
CD22 antigen: biosynthesis, glycosylation and surface expression of a B lymphocyte protein involved in B cell activation and adhesion. *Int. Immunol.* **3**, 623-633.
- Servenius, B., Rask, L. & Peterson, P.A. 1987.  
Class II genes of the human major histocompatibility complex. The DOb gene is a divergent member of the class II b gene family. *J. Biol. Chem.* **262**, 8759-8766.
- Sette, A., Ceman, S., Kubo, R.T., Sakaguchi, K., Appella, E., Hunt, D.F., Davis, T.A., Michel, H., Shabanowitz, J., Rudersdorf, R., Grey, H.M. & DeMars, R. 1992.  
Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen-processing mutant. *Science* **258**, 1801-1804.
- Sette, A., Southwood, S., Miller, J. & Appella, E. 1995.  
Binding of major histocompatibility complex class II to the invariant chain-derived peptide, CLIP, is regulated by allelic polymorphism in class II. *J. Exp. Med.* **181**, 677-683.
- Shan, D. & Press, O.W. 1995.  
Constitutive Endocytosis and degradation of CD 22 by human B cells. *J. Immunol.* **154**, 4466-4475.
- Shaw, M.A. & Chain, B.M. 1989.  
A cell-free model system for the study of antigen processing. *Int. Immunol.* **1**, 619-23.
- Sherman, M.A., Weber, D.A. & Jensen, P.E. 1995  
DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* **3**, 197-205.
- Shi, G.-P., Villadangos, J.A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K.J., Riese, R., Ploegh, H.L. & Chapman, H.A. 1999.  
Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* **10**, 197-206.

- Sloan, V.S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E. & Zaller, D.M. 1995.  
Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* **375**, 802-806.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. 1985.  
Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Spies, T. & DeMars, R. 1991.  
Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature* **351**, 323-4
- Stam, N.J., Vroom, T.M., Peters, P.J., Pastoors, E.B. & Ploegh, H.L. 1990.  
HLA-A- and HLA-B-specific monoclonal antibodies reactive with free heavy chains in western blots, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections and in cryo-immuno-electron microscopy. *Int. Immunol.* **2**, 113-125.
- Stern, L.J. & Wiley, D.C. 1992.  
The human MHC class II protein HLA-DR1 assembles as empty  $\alpha\beta$ -heterodimers in the absence of antigenic peptide. *Cell* **68**, 465-477.
- Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L. & Wiley, D.C. 1994.  
Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* **368**, 215-221.
- Strubin, M., Berte, C. & Mach, B. 1986.  
Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* **5**, 3483-3488.
- Suzuki, K. 1987.  
Enzymatic diagnosis of sphingolipases.  
*Methods in Enzymology* **138**, 757-758 Complex Carbohydrates, Part E.  
V. Ginsburg, editor. Academic Press, Inc., Orlando, FL.
- Takahashi, H., Cease, K.B. & Berzofsky, J.A. 1989.  
Identification of proteases that process distinct epitopes on the same protein.  
*J. Immunol.* **142**, 2221-29.
- Teyton, L., O'Sullivan, D., Dickson, P.W., Lotteau, V., Sette, A., Fink, P. & Peterson, P.A. 1990.  
Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* **348**, 39-44.
- Tonegawa, S. 1983.  
Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575-581.

- Tonelle, C., DeMars, R. & Long, E.O. 1985.  
DOb: a new b chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression.  
*EMBO J.* **4**, 2839-2847.
- Tourne, S., Miyazaki, T., Wolf, P., Ploegh, H., Benoist, C., & Mathis, D. 1997.  
Functionality of major histocompatibility complex class II molecules in mice doubly deficient for invariant chain and H-2M complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9255-9260.
- Trowsdale, J. & Kelly, A. 1985.  
The human HLA class II alpha chain gene DZ alpha is distinct from gene in the DP, DQ and DR subregions. *EMBO J.* **4**, 2231-2237.
- Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A. & Kelly, A. 1990.  
Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* **348**, 741-4.
- Tulp, A., Verwoerd, D., Dobberstein, B., Ploegh, H.L. & Pieters, J. 1994.  
Isolation and characterisation of the intracellular MHC class II compartment.  
*Nature* **369**, 120-126.
- Urban, R.G., Chicz, R.M. & Strominger, J.L. 1994a.  
Selective release of some invariant chain-derived peptides from HLA-DR1 molecules at endosomal pH. *J. Exp. Med.* **180**, 751-755.
- Urban, R.G., Chicz, R.M., Lane, W.S., Strominger, J.L., Rehm, A., Kenter, M.J., UytdeHaag, F.G., Ploegh, H., Uchanska-Ziegler, B. & Ziegler, A. 1994b.  
A subset of HLA-B27 molecules contains peptides much longer than nonamers.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1534-1538.
- Vergelli, M., Pinet, V., Vogt, A.B., Kalbus, M., Malnati, M., Riccio, P., Long, E.O. & Martin, R. 1997.  
HLA-DR-restricted presentation of purified myelin basic protein is independent of intracellular processing. *Eur. J. Immunol.* **27**, 941-951.
- Verreck, F.A.W., Vermeulen, C., v.d.Poel, A., Jorritsma, P., Amons, R., Coligan, J.E., Drijfthout, J.W. & Koning, F. 1996.  
The generation of SDS-stable HLA-DR dimers is independent of efficient peptide binding.  
*Int. Immunol.* **8**, 397-404.
- Vidard, L., Rock, K.L. & Benacerraf, B. 1991.  
The generation of immunogenic peptides can be selectively increased or decreased by proteolytic enzyme inhibitors. *J. Immunol.* **147**, 1786-91.
- Viville, S., Neefjes, J., Lotteau, V., Dierich, A., Lemeur, M., Ploegh, H., Benoist, C., Mathis, D. 1993.  
Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* **72**, 635-648.

Vogt, A.B., Kropshofer, H., Kalbacher, H., Kalbus, M., Rammensee, H.G., Coligan, J.E., Martin, R. 1994.

Ligand motifs of HLA-DRB5\*0101 and DRB1\*1501 molecules delineated from self-peptides. *J. Immunol.* **153**, 1665-1673.

Vogt, A.B., Stern, L.J., Amshoff, C., Dobberstein, B., Hämmerling, G.J. & Kropshofer, H. 1995.

Interference of distinct invariant chain regions with superantigen contact area and antigenic peptide binding groove of HLA-DR. *J. Immunol.* **155**, 4757-4765.

Vogt, A.B., Kropshofer, H., Moldenhauer, G. & Hämmerling, G.J. 1996.

Kinetic analysis of peptide loading onto HLA-DR molecules mediated by HLA-DM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9724-9729.

Vogt, A.B. & Kropshofer, H. 1999.

HLA-DM - an endosomal and lysosomal chaperone for the immune system. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 150-154

Vogt, A. B., Arndt, S. O., Hämmerling, G. J. & Kropshofer, H. 1999.

Quality control of MHC class II - associated peptides by HLA-DM / H2-M.  
Manuskript eingereicht

Watts, C. 1997.

Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 821-850.

Weber, D.A., Evavold, B.D. & Jensen, P.E. 1996.

Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* **274**, 618-620.

West, M.A., Lucocq, J.M. & Watts, C. 1994.

Antigen processing and class II MHC peptide-loading compartments in human B-lymphoblastoid cells. *Nature* **369**, 147-151.

Wolf, P.R. & Ploegh, H.L. 1995.

How MHC class II molecules acquire peptide charge: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 267-306.

Wölpl, A., Halder, T., Kalbacher, H., Neumeyer, H., Siemoneit, K., Goldmann, S.F. & Eiermann, T.H. 1998.

Human monoclonal antibody with T-cell-like specificity recognizes MHC class I self-peptide presented by HLA-DR1 on activated cells. *Tissue Antigens* **51**, 258-269.

Wubbolts, R., Fernandez-Borja, M., Oomen, L., Verwoerd, D., Janssen, H., Calafat, J., Tulp, A., Dusseljee, S. & Neefjes, J. 1996.

Direct vesicular transport of MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface. *J. Cell Biol.* **135**, 611-622

Xu, M., Capraro, G.A., Daibata, M., Reyes, V.E & Humphreys, R.E. 1994.  
Cathepsin B cleavage and release of invariant chain from MHC class II molecules follow a staged pattern. *Mol. Immunol.* **31**, 723-731.

Zerial, M. & Stenmark, H. 1993.  
Rab GTPases in vesicular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 613-620.

Ziegler, K. & Unanue, E.R. 1982  
Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen-presentation to T cells.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 175-192.

Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.C. 1974.  
Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* **248**, 701-2.

# Lebenslauf

## ALLGEMEINE ANGABEN:

Name: Sven Oliver Arndt  
Geburtsdatum: 14. Juni 1970  
Geburtsort: Remscheid  
Familienstand: ledig

## SCHULE:

1980-89 Städtisches Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium (Remscheid)  
1986/87 Vollstipendium für einjähriges Austauschprogramm an der Northfield Mount Hermon School (eine private amerikanische Independent School im Bundesstaat Massachusetts) durch ASSIST, Köln  
5/1989 Allgemeine Hochschulreife, Auszeichnung durch den Fond der chemischen Industrie

## WEHRDIENST:

6/1989 - 8/1990 Wehrdienst bei der Luftwaffe in Rendsburg (Schleswig-Holstein)

## HOCHSCHULE:

10/1990 Beginn des Studiengangs Biochemie an der Universität Hannover  
1990 - 1995 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes  
9/1991 Vordiplom Teil A in den Fächern Physik und Biologie  
9/1992 Vordiplom Teil B in den Fächern Anorganische, Physikalische, Organische Chemie sowie Biochemie  
2/1994 - 4/1994 Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) für ein Praktikum am MIT, Cambridge  
6/1995 Diplomprüfungen in den Fächern Biochemie, Biophysikalische Chemie und Organische Chemie  
6/1995-1/1996 Diplomarbeit unter Betreuung durch Prof. Hämmerling (DKFZ, Heidelberg) sowie Prof. Resch (MH Hannover)  
Thema: *Natürliche Peptidliganden von MHC Klasse II - Molekülen in endosomal-lysosomalen B-Zell-Kompartimenten*

## PROMOTION:

2/1996 - 7/1999 Dissertation unter Betreuung von Prof. Hämmerling (DKFZ, Heidelberg) im Labor Dr. H. Kropshofer und Dr. A. B. Vogt  
Thema: *Einfluß der HLA-DM-vermittelten Katalyse auf die Peptidbeladung von MHC Klasse II-Molekülen in verschiedenen Subkompartimenten humaner B-Zellen*