

**Untersuchungen zum Mechanismus endogener MHC-  
Klasse-II-restringierter Antigenpräsentation**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Falk Nimmerjahn

München, 18. Dezember 2001

Angefertigt am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH  
Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik  
München

Teile dieser Arbeit werden wie folgt veröffentlicht:

Falk Nimmerjahn, Slavoljub Milosevic, Uta Behrends, Elizabeth M. Jaffee, Drew M. Pardoll, Georg W. Bornkamm, and Josef Mautner (2001). Major Histocompatibility Class II-restricted Presentation of a Cytosolic Antigen by Autophagy, zur Veröffentlichung eingereicht.

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Kurzvortrages auf dem 11<sup>th</sup> International Congress of Immunology 2001 in Stockholm vorgestellt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Eick

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Gutensohn

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2002

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die klassischen Antigenpräsentationswege	2
1.1.1 Der MHC-Klasse-I-Präsentationsweg	3
1.1.1.1 Herstellung von Peptiden zur Beladung auf MHC-Klasse-I	4
1.1.1.2 Transport der Peptide in das endoplasmatische Retikulum	5
1.1.1.3 Peptidbeladung von MHC-Klasse-I-Molekülen	6
1.1.2 Der MHC-Klasse-II-Präsentationsweg	6
1.1.2.1 Antigenaufnahme	8
1.1.2.2 Antigenprozessierung im endosomalen/lysosomalen System	8
1.1.2.3 Die Reifung und Beladung neu-synthetisierter MHC-Klasse-II-Moleküle	11
1.1.3 Die Dichotomie MHC-restringierter Antigenpräsentation	13
1.2 Alternative Antigenpräsentationswege	14
1.2.1 „Cross presentation“ im MHC-Klasse-I-Präsentationsweg	14
1.2.2 Präsentation endogener Proteine im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen	16
1.3 Endogene MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationswege sind die Basis wichtiger immunologischer Prozesse	17
1.4 Fragestellung der Arbeit	19
<b>2 Material</b>	<b>20</b>
2.1 Zelllinien	20
2.2 Bakterienstämme	20
2.3 Oligonukleotide	21
2.4 Expressionsplasmide	21
2.4.1 Zur Verfügung gestellte Expressionsplasmide	21
2.4.2 Eigene Expressionsplasmide	22
2.5 Antikörper	24
2.5.1 Western-Transfer	24
2.5.2 Immunfluoreszenz	24
2.5.3 FACS™-Analyse	24
2.6 Enzyme	24
2.7 Chemikalien	25

2.7.1 Antibiotika	25
2.7.2 Inhibitorstudien	25
2.7.3 Sonstige Chemikalien	25
2.8 Zellkultur	25
2.9 Bakterienkultur	25
2.10 DNA- und Proteinstandards	26
2.11 Software	26
2.12 Verbrauchsmaterial	26
2.13 Geräte	26
<b>3 Methoden</b>	<b>28</b>
3.1 Bakterienkultur	28
3.2 Herstellung elektrokompenter Bakterien zur Transformation	28
3.3 Transformation von Bakterien	29
3.4 Methoden der DNA-Analytik	29
3.4.1 Präparative Herstellung von Plasmid-DNA aus Bakterien	29
3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese	29
3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion	30
3.4.4 Reverse-Transkriptase-PCR-Analyse	30
3.5 Eukaryonte Zellkultur	30
3.5.1 Kultivierung der Zellen	30
3.5.2 Bestimmung der Lebendzellzahl und Ficoll-Aufreinigung lebender Zellen	31
3.5.3 Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff	31
3.6 Transiente und stabile Transfektionen	32
3.6.1 Elektroporation der LCL-Zelllinien	32
3.6.2 Transfektion mit LipofectAMIN™ und Calciumphosphat (293T und RCC 1.24)	32
3.7 FACST™-Analyse	33
3.8 Antigenpräsentationsstudien	33
3.8.1 LCL-Zelllinien	33
3.8.2 RCC 1.24-NeoR	34
3.8.3 GM-CSF ELISA	34
3.9 Zellfraktionierung	34
3.9.1 Grobaufreinigung der Endosomen/Lysosomen-Fraktion	34

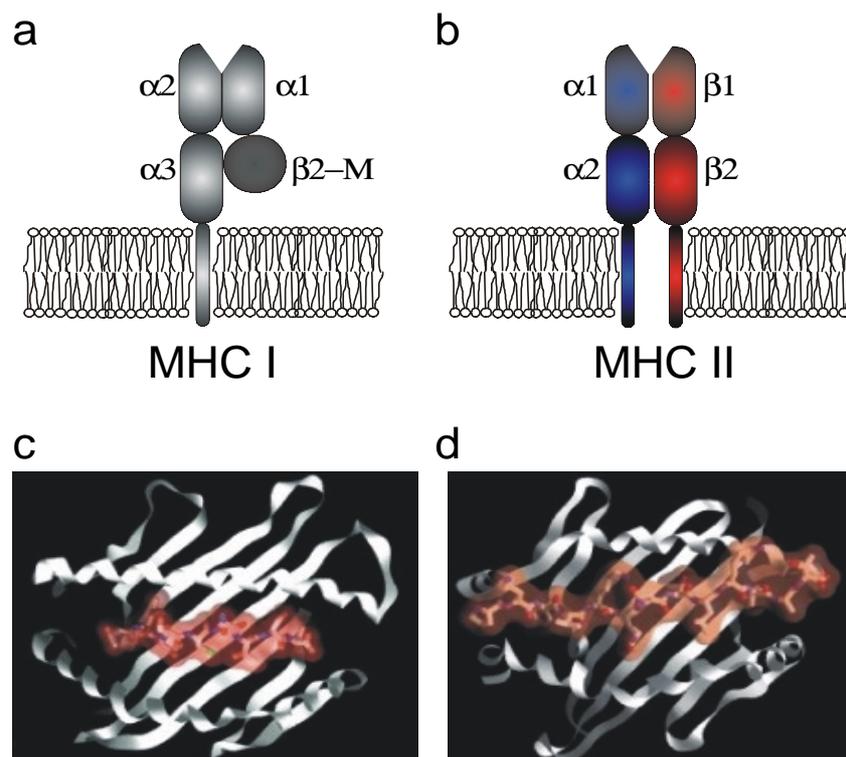
3.9.2 Feinfraktionierung der Endosomen und Lysosomen	35
3.9.3 Herstellung von Zellysaten von LCL-, 293T- und RCC 1.24-Zellen	36
3.10 Protein-Analytik	36
3.10.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford	36
3.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
3.10.3 Western-Transfer und Immunodetektion von Proteinen	37
3.11 Immunfluoreszenz	38
3.12 Fluoreszenzmikroskopie	38
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>39</b>
4.1 Etablierung eines neuen Modellsystems zur Untersuchung des endogenen MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweges	39
4.1.1 Das Modellantigen Neomycin-Phosphotransferase ist im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert	39
4.1.2 Endogene Präsentation von NeoR in der Nierenzellkarzinomzelllinie RCC 1.24-NeoR	41
4.1.3 Endogene Präsentation von NeoR in der lymphoblastoiden Zelllinie LCL 1.11	41
4.1.4 NeoR wird nicht in den Kulturüberstand sekretiert	44
4.2 Das experimentelle System zur Untersuchung endogener Antigenpräsentation	46
4.3 Charakterisierung des Prozessierungsortes	47
4.3.1 Beteiligung des Proteasoms und TPPII an der Präsentation von NeoR im Kontext von MHC-Klasse-II	48
4.3.2 Die Beteiligung des TAP-Transporters an der endogenen Präsentation von NeoR	50
4.3.3 Die Beladung von HLA-DP mit NeoR-Peptiden findet nicht im endoplasmatischen Retikulum statt	51
4.3.4 Späte endosomale/lysosomale Kompartimente sind an der Präsentation von endogenem und exogenem NeoR beteiligt	54
4.3.5 Die Prozessierung von NeoR ist abhängig von endosomalen/lysosomalen Proteasen	55
4.4 NeoR-GFP-Anreicherung in Kern-nahen Vesikeln unter Chloroquin- und Leupeptin-Behandlung	56
4.5 NeoR-Nachweis im endosomalen/lysosomalen System	58

4.5.1 Grob- und Feinreinigung der Endosomen und Lysosomen	60
4.5.2 Feinfraktionierung des endosomalen/lysosomalen Systems	62
4.5.3 Eintrittspunkt von NeoR in das endosomale/lysosomale System	63
4.6 Hsc70-vermittelter Protein- und Peptidimport in Lysosomen ist nicht für die MHC-Klasse-II-restringierte Präsentation von NeoR verantwortlich	65
4.7 Die Rolle von Autophagie in der MHC-Klasse-II-restringierten Präsentation von NeoR	66
4.7.1 Expression Autophagie-assoziiierter Proteine	67
4.7.2 NeoR wird durch Inhibition der Autophagie stabilisiert	68
4.7.3 Autophagie ist für die endogene Präsentation von NeoR notwendig	71
<b>5 Diskussion</b>	<b>74</b>
5.1 Experimentelle Systeme zur Charakterisierung des endogenen MHC-Klasse-II-Präsentationsweges	75
5.1.1 Modellantigene	75
5.1.2 Antigenpräsentierende Zellen	76
5.1.3 Infektions- und Transfektionsmodelle	77
5.2 Der endogene MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg	79
5.2.1 Beteiligung von Schlüsselkomponenten des MHC-Klasse-II-Präsentationsweges am endogenen MHC-Klasse-II-Beladungsweg	80
5.2.2 Konvergenz des endogenen und des klassischen MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweges im endosomalen System	81
5.3 Transport des Proteins in das endosomale/lysosomale System	82
5.4 Ausblick	85
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>7 Literatur</b>	<b>87</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>99</b>

---

## 1 Einleitung

T-Zellen erkennen Peptide, die von MHC-Molekülen (Major histocompatibility complex) auf der Zelloberfläche präsentiert werden. MHC-Moleküle sind eine Gruppe hochpolymorpher Proteine, die sich aufgrund ihrer Struktur in zwei Klassen einteilen lassen (Abb. 1a). MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer  $\alpha$ -Kette, an die nicht-kovalent ein  $\beta$ 2-Mikroglobulin Molekül gebunden ist. Die Antigenbindungstasche von MHC-I-Molekülen wird von der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domäne der  $\alpha$ -Kette gebildet und hat eine geschlossene Konformation (Abb. 1c), weshalb die Größe der gebundenen Peptide relativ konstant zwischen 8-10 Aminosäuren liegt (Übersicht bei Rammensee, 1993; Townsend, 1989). MHC-Klasse-I-Moleküle sind in variabler Menge auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert.



**Abbildung 1: Die Struktur der MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle**

Dargestellt ist die Domänenstruktur eines MHC-Klasse-I- (a) und MHC-Klasse-II-Moleküls (b). Das MHC-Klasse-I-Molekül besteht aus einer  $\alpha$ -Kette (hellgrau), welche die Antigenbindungstasche bildet und mit einem  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2-M; dunkelgrau) Molekül assoziiert ist. MHC-Klasse-II-Moleküle sind Heterodimere aus einer  $\alpha$ - (blau) und einer  $\beta$ -Kette (rot), die beide an der Ausbildung der Peptidbindungstasche beteiligt sind. Die Antigenbindungstasche der MHC-Klasse-I-Moleküle hat eine geschlossene Konfiguration (c), die der MHC-Klasse-II-Moleküle ist dagegen an den Enden offen (d). Dargestellt (c und d) ist jeweils die dreidimensionale Proteinstruktur mit gebundenem Peptid (rot); Quelle: Janeway et al., 1999. Abkürzungen: a)  $\alpha$ 1-3: Domänen der  $\alpha$ -Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls; b)  $\alpha$ 1-2 und  $\beta$ 1-2: Domänenstruktur des MHC-Klasse-II-Moleküls.

Im Gegensatz dazu bestehen MHC-Klasse-II-Moleküle aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, die beide zur Ausbildung der Antigenbindungstasche beitragen (Abb. 1b). Im Unterschied zu MHC-I-Molekülen besitzt die Antigenbindungstasche eine an den Enden offene Konfiguration (Abb. 1d), weshalb die Länge der gebundenen Peptide stärker variiert und bei 13-25 Aminosäuren liegt.

Weiterhin zeigen MHC-Klasse-II-Moleküle ein eingeschränktes Expressionsmuster. Eine konstitutive Expression findet man nur auf sogenannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, Makrophagen, aktivierten B-Zellen und epithelialen Zellen des Thymus. Darüber hinaus sind auch nicht-lymphoide Zelltypen, insbesondere endothelialer und parenchymaler Herkunft (Keratinocyten, Hepatozyten, etc.) in der Lage, nach Induktion mit inflammatorischen Zytokinen ( $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ), MHC-Klasse-II zu exprimieren. Da diese Zellen nur konditional MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren, werden sie nicht-professionelle antigenpräsentierende Zellen genannt.

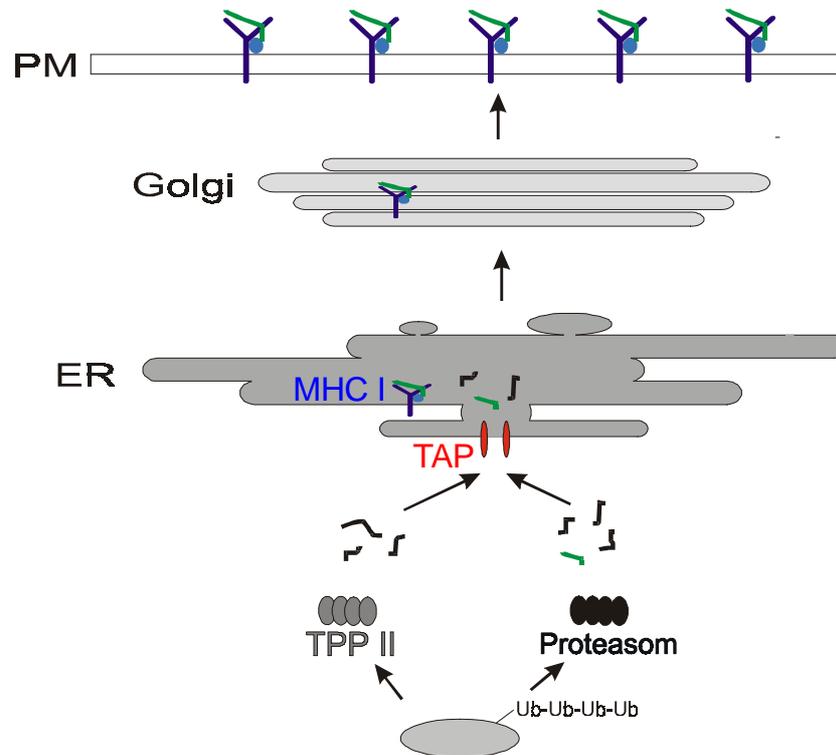
Die beiden Typen von MHC-Molekülen werden von funktionell verschiedenen Untergruppen von T-Zellen erkannt und erfüllen unterschiedliche Aufgaben während einer Immunantwort. Peptide im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen werden von zytotoxischen T-Zellen erkannt (Zinkernagel und Doherty, 1979), die den hierfür notwendigen Korezeptor CD8 tragen. MHC-Klasse-II-Moleküle werden hingegen von T-Helferzellen erkannt, die den CD4 Korezeptor exprimieren und zur Regulation und Koordination der Immunantwort notwendig sind.

### **1.1 Die klassischen Antigenpräsentationswege**

Die Herstellung antigener Peptide für die Beladung von MHC-Molekülen ist eng gekoppelt mit kontinuierlichen Proteinabbauvorgängen in der Zelle. Die beiden zellulären Kompartimente, in denen ein Großteil dieser Prozesse stattfindet, sind das Zytoplasma und das endosomale/lysosomale System. Ein aktuelles Modell der MHC-Klasse-I-, bzw. MHC-Klasse-II-restringierten Antigenpräsentation postuliert, daß der Hauptunterschied zwischen den beiden Präsentationswegen in der Nutzung verschiedener proteolytischer Systeme zur Herstellung antigener Peptide liegt. In den nächsten Abschnitten sollen die Daten, die zur Beschreibung dieser „klassischen“ Antigenpräsentationswege geführt haben, näher erläutert werden.

### 1.1.1 Der MHC-Klasse-I-Präsentationsweg

Bevor die einzelnen Komponenten des Antigenpräsentationsweges behandelt werden, soll ein Überblick über die wichtigsten Schritte gegeben werden (Abb. 2).



**Abbildung 2: Der klassische MHC-Klasse-I-Präsentationsweg**

Dargestellt ist die Degradation eines zytoplasmatischen Proteins in Peptidfragmente (schwarz und grün), die im ER an MHC-Klasse-I-Moleküle binden können und anschließend auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Abkürzungen: TAP: transporter associated with antigen processing; TPPII: Tripeptidyl Peptidase; ER: endoplasmatisches Retikulum; PM: Plasmamembran; Ub: Ubiquitin.

Proteine des Zytoplasmas, des Zellkerns und teilweise auch des endoplasmatischen Retikulums (ER) werden durch zytoplasmatische Proteasen (Proteasom, TPPII und andere) in Peptide zerlegt, die über einen in der ER-Membran lokalisierten Transporter (TAP: transporter associated with antigen processing) in das Lumen des ER transferiert werden. Dort findet die Bindung der Peptide an neu-synthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle mit Hilfe verschiedener ER-residenter Chaperone statt. Beladene MHC-I/Peptid-Komplexe verlassen das ER und werden über den Golgiapparat an die Zelloberfläche gebracht (Übersicht bei Pamer und Cresswell, 1998; Rock und Goldberg, 1999). Im Folgenden sollen die einzelnen Schlüsselkomponenten dieses Präsentationsweges näher beschrieben werden.

### 1.1.1.1 Herstellung von Peptiden zur Beladung auf MHC-Klasse-I

#### A) Das Proteasom

Das Proteasom (26S Proteasom) tierischer Zellen ist ein 2000kDa Multiproteinkomplex, der aus einem zylindrischen Kernkomplex (Core; 20S Proteasom) aus 28 Untereinheiten sowie einem regulatorischen Komplex (19S Regulatory complex oder Cap Struktur) aus etwa 20 Untereinheiten besteht und im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert ist (Übersicht bei Bochtler et al., 1999). Die aktiven Zentren liegen im Innenraum des zylindrischen Kernkomplexes, weshalb zum Abbau bestimmte Proteine erst entfaltet werden müssen, um Zugang zu den Proteasen zu erhalten.

Die drei am besten charakterisierten proteolytischen Aktivitäten sind die Chymotrypsin-ähnliche, die Trypsin-ähnliche und die Peptidyl-post-Glutamyl-ähnliche (PGPH) Aktivität, wobei die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität die geschwindigkeitsbestimmende ist. Die Abbauprodukte haben eine Größe von 4-24 Aminosäuren, und etwa 20% der gebildeten Peptide haben eine passende Größe für die Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle (Übersicht bei Rock und Goldberg, 1999).

Eine wichtige Funktion der 19S-Komponente liegt in ihrer Fähigkeit, ubiquitinylierte Proteine zu erkennen. Bei diesem Abbauweg wird durch eine Reihe verschiedener Enzyme an Aminosäureseitenketten eine Polyubiquitin-Kette angefügt (Übersicht bei Bonifacino und Weissman, 1998). Hierbei kann es sich zum einen um falsch gefaltete, mutierte und defekte Proteine handeln, zum anderen aber auch um Proteine, die im Rahmen regulierter Abbauprozesse degradiert werden.

Eine zusätzliche Komplexität und Verbindung zu immunologischen Prozessen erhielt das Proteasom durch die Entdeckung drei weiterer  $\beta$ -Untereinheiten, die durch  $\text{IFN}\gamma$  induziert werden können und von denen zwei im MHC-Komplex kodiert werden.

Nach Induktion mit  $\text{IFN}\gamma$  entstehen Proteasomen, die anstelle der konstitutiven  $\beta$ -Untereinheiten die neuen, immunologisch induzierten Untereinheiten LMP 2 (low molecular weight protein 2), LMP7 und LMP10 (MECL-1) enthalten. Derart modifizierte Proteasomen werden auch Immunoproteasomen genannt (Übersicht bei Kloetzel, 2001). Zusätzlich wird durch  $\text{IFN}\gamma$  ein weiterer, PA28 (11S) genannter regulatorischer Komplex induziert (Rechsteiner et al., 2000). Eine konstitutive Expression von Immunoproteasomen findet man in professionellen antigenpräsentierenden Zellen (pAPC), wie etwa dendritischen Zellen.

*In vitro* Studien deuten darauf hin, daß Immunproteasomen eine erhöhte Protease-Aktivität aufweisen und zudem vornehmlich nach hydrophoben und positiv geladenen Aminosäuren spalten.

Die wichtige Rolle des Proteasoms für den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg konnte zuerst durch die Verwendung von Peptidalddehyd-Inhibitoren und später durch den Proteasom-spezifischen Inhibitor Lactacystin gezeigt werden (Rock et al., 1994). Die Inhibition des Proteasoms führt zu einer Retention von MHC-Klasse-I-Molekülen im endoplasmatischen Retikulum, da nicht mehr genügend Peptide zur Beladung von MHC-I-Molekülen zur Verfügung stehen.

### B) TPPII und andere Proteasen

Daneben gibt es Hinweise darauf, daß weitere Proteasen des Zytoplasmas an der Peptidherstellung beteiligt sein könnten (Glas et al., 1998). Vor kurzem wurde ein TPPII (für: Tripeptidyl-Peptidase II) genannter Proteasekomplex identifiziert (Geier et al., 1999). TPP II besitzt *in vitro* neben einer exo- auch eine endoproteolytische Aktivität und ist in der Lage Peptide herzustellen, die für die Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen geeignet sind. Obwohl initial angenommen wurde, daß dieser Degradationsweg nur im Fall von verminderter, bzw. inhibierter Proteasom-Aktivität zum Tragen kommt, weisen neueste Studien darauf hin, daß verschiedene Zelltypen Unterschiede in den Aktivitäten des Proteasoms, bzw. des TPPII-Multiproteinkomplexes aufweisen (Gavioli et al., 2001).

Neben dem Proteasom und TPPII sind für das endgültige Zurechtschneiden der Vorläuferpeptide wahrscheinlich zusätzliche, im Zytoplasma oder endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Aminopeptidasen notwendig. Kandidaten im Zytoplasma sind die IFN $\gamma$ -induzierbare Leucin-Aminopeptidase (Beninga et al., 1998) und die vor kurzem identifizierten (Stoltze et al., 2000) Proteasen PSA (Puromycin-sensitive Aminopeptidase) und BH (Bleomycin Hydrolase).

#### **1.1.1.2 Transport der Peptide in das endoplasmatische Retikulum**

Während über den Transport der Peptide vom Proteasom zum ER noch wenig bekannt ist, ist der Import der Peptide in das ER besser verstanden. Die zentrale Rolle spielt ein heterodimeres, in die ER-Membran eingelagertes Molekül mit dem Namen „transporter associated with antigen processing“ (TAP), welches aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2 besteht.

Diese sind über mehrere putative Transmembrandomänen in der Membran des ER verankert und transportieren die Peptide ATP-abhängig in das Lumen des ER. Die Länge der transportierten Peptide liegt zwischen 7-16 Aminosäuren. Während Peptide mit basischen Aminosäuren an den Enden eine höhere Affinität aufweisen, werden Peptide mit sauren Aminosäuren schlecht transportiert (Uebel et al., 1997).

### **1.1.1.3 Peptidbeladung von MHC-Klasse-I-Molekülen**

Neu-synthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle werden kotranslational in die Membran des ER eingelagert und liegen dort gebunden an ER residente Chaperone, wie Calnexin, BiP und Calretikulin vor, die zur Faltung einer Vielzahl von Proteinen notwendig sind (ER housekeeping Chaperones). Zudem halten die Chaperone MHC-Klasse-I-Moleküle in einer für die Peptidbindung optimalen Konfiguration und schützen sie vor Degradation (Grande et al., 1997). Nur etwa 5% der ins ER transportierten Peptide sind in der Lage, an MHC-Klasse-I-Moleküle zu binden (Rammensee et al., 1997). Die übrigen 95% werden wahrscheinlich über das Translokon (Sec61p Kanal) zurück in das Zytoplasma exportiert und dort vollständig degradiert (Koopmann et al., 2000). Nach Bindung eines geeigneten Peptides werden MHC-Klasse-I-Moleküle aus dem ER über den Golgiapparat an die Zelloberfläche gebracht.

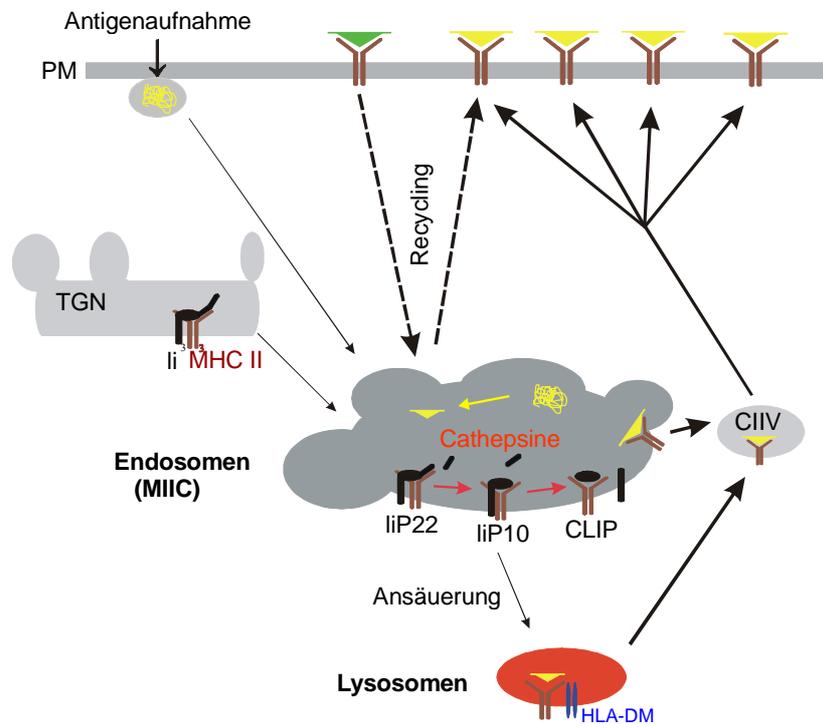
### **1.1.2 Der MHC-Klasse-II-Präsentationsweg**

Auch hier soll mit einem Überblick über die wichtigsten Schritte des Präsentationsweges begonnen werden. Neu-synthetisierte  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten assoziieren im endoplasmatischen Retikulum zu MHC-Klasse-II-Heterodimeren, die im Komplex mit einem „invariante Kette“ (*Ii*) genannten Chaperon vorliegen.

Die invariante Kette verhindert eine frühzeitige Peptid-Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen im ER und ist an einer Vielzahl weiterer Schritte in diesem Präsentationsweg beteiligt (Übersicht bei Busch et al., 2000). Nach dem Transport in das endosomale System können die MHC-Klasse-II-Moleküle durch Dissoziation von *Ii* mit Peptiden beladen werden.

Diese stammen hauptsächlich von Proteinen, die im endosomalen/lysosomalen System abgebaut werden, wie zum Beispiel extrazelluläre Proteine, aber auch endogene membranständige und endosomale Proteine der Zelle. Das endosomale/lysosomale System beherbergt ein komplexes Gemisch an Proteasen, die eine Doppelfunktion für den MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg haben.

Zum einen sind sie für die Herstellung antigener Peptide notwendig, zum anderen aber auch für die Reifung (*li*-Degradation) von MHC-Klasse-II-Molekülen (Abb. 3).



**Abbildung 3: Der klassische MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg**

MHC-Klasse-II-Moleküle gelangen in einem nonameren Komplex ( $li_3 \alpha_3 \beta_3$ ) über das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in das endosomale/lysosomale System. Dort finden die Reifung der MHC-Klasse-II-Moleküle (Abbau von *li*), die Antigen Degradation und die Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen mit Peptiden (gelbe, bzw. grüne Dreiecke) statt. MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexe werden dann über spezielle Vesikel (CIIV) zur Zelloberfläche gebracht. Zusätzlich können bereits beladene MHC-Klasse-II-Moleküle nach Endozytose erneut an Peptide binden (Recycling). Abkürzungen: PM: Plasmamembran; liP22/liP10/CLIP: Degradationsprodukte der invarianten Kette (siehe Text); MIIC/CIIV: MHC-class-II-compartments/class-II-vesicles.

Die Beladung mit Peptiden kann in verschiedenen Teilen des endosomalen Systems erfolgen, hauptsächlich jedoch in späten endosomalen Kompartimenten, die reich an MHC-Klasse-II-Molekülen sind und MIIC (MHC-class-II-compartments) genannt werden (Übersicht bei Pierre und Mellman, 1998 b). Beladene MHC-Klasse-II-Moleküle werden über Transportvesikel (CIIVs: class-II-vesicles) zur Zelloberfläche gebracht (Übersicht bei Mellman und Steinman, 2001; Turley et al., 2000) und dort für bis zu 36 Stunden präsentiert. Im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Molekülen können schon einmal beladene, internalisierte MHC-Klasse-II-Moleküle im frühen endosomalen System erneut mit Peptiden beladen werden (Pinet et al., 1995; Pinet et al., 1998) und wieder an die Zelloberfläche gelangen; dieser Beladungsweg wird „MHC-Klasse-II Recycling-Präsentationsweg“ genannt.

### **1.1.2.1 Antigenaufnahme**

Eine Hauptaufgabe professioneller antigenpräsentierender Zellen ist die Überwachung des extrazellulären Milieus auf eingedrungene Pathogene (Bakterien, Viren, toxische Proteine). Die Aufnahme exogenen Materials vollzieht sich hauptsächlich auf drei verschiedene Arten: Rezeptor-vermittelte Endozytose, Phagozytose und Macropinozytose. Während es sich bei den ersten beiden um eine induzierbare Aufnahme handelt (Übersicht bei Schmid, 1997), ist Macropinozytose/Pinozytose ein kontinuierlich ablaufender Prozeß (Übersicht bei Swanson und Watts, 1995).

Die pAPCs zeigen aufgrund verschiedener Lokalisation und Aufgaben im Rahmen einer Immunantwort eine unterschiedlich starke Nutzung der Mechanismen zur Antigenaufnahme. B-Zellen und Makrophagen besitzen Oberflächenrezeptoren (B-Zell Rezeptor, Mannose- und Fukoserezeptoren, Fc- und Komplement-Rezeptoren), die an lösliche Proteine, bakterielle Zellwandbestandteile und opsonisierte Pathogene binden können und so die Endozytose einleiten; die Fähigkeit zur konstitutiven Makropinozytose ist gering. Dendritische Zellen haben dagegen neben der Ausstattung mit spezifischen Rezeptoren für die Antigenaufnahme auch eine hohe konstitutive Fähigkeit, extrazelluläre Flüssigkeit durch Pinozytose, bzw. Makropinozytose aufzunehmen.

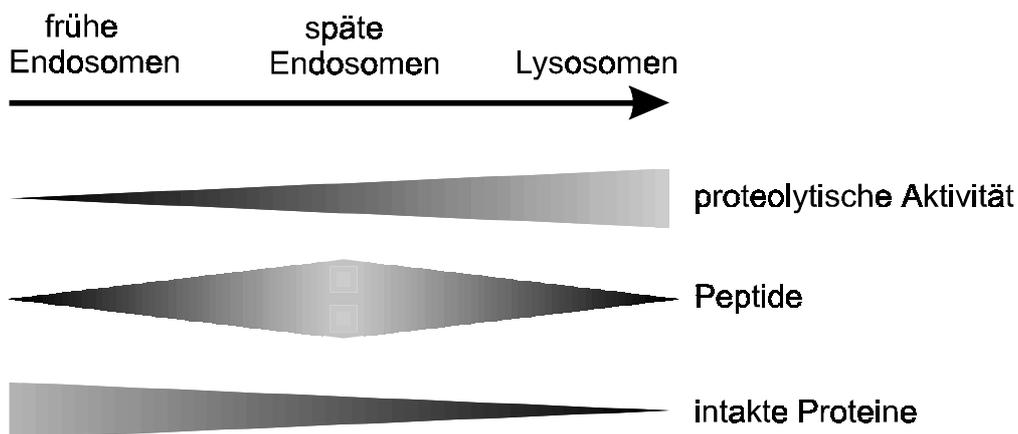
Im Gegensatz dazu zeigen nicht-professionelle APCs sowohl nur eine geringe pinozytotische Aktivität als auch keine Expression von spezifischen Rezeptoren, weshalb sie extrazelluläre Antigene um ein Vielfaches schlechter präsentieren.

### **1.1.2.2 Antigenprozessierung im endosomalen/lysosomalen System**

Die Mechanismen, die zur Herstellung von Peptiden und zur Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen führen, unterscheiden sich grundlegend vom MHC-Klasse-I-Präsentationsweg. Während für MHC-Klasse-I das Proteasom den Hauptanteil an der Herstellung der Peptide hat, ist die Situation für MHC-Klasse-II komplexer. Dies liegt unter anderem daran, daß das endosomale/lysosomale System aus verschiedenen Kompartimenten zusammengesetzt ist, die sich in ihrer proteolytischen Aktivität unterscheiden und im Folgenden kurz beschrieben werden sollen. Das endosomale System läßt sich in frühe und späte Endosomen unterteilen. Frühe Endosomen finden sich hauptsächlich in der Peripherie der Zelle und haben einen schwach sauren pH-Wert.

In diesem Kompartiment finden Sortierungsprozesse statt, die dazu führen, daß Proteine entweder zur vollständigen Degradation in späte Endosomen und Lysosomen, oder aber wieder zurück an die Zelloberfläche gebracht werden (Recycling von Oberflächenrezeptoren). Neben dem Eintrittsweg über die Endozytose werden die Enzyme des endosomalen und lysosomalen Systems nach dem Transport durch den Golgiapparat über Bindung an spezielle Rezeptoren direkt in frühe Endosomen gebracht. Späte Endosomen befinden sich mehr im Inneren der Zelle und stehen mit frühen Endosomen über Mikrotubuli-abhängigen Vesikeltransport in Verbindung. Auch aus diesem Kompartiment können Proteine für eine erneute Verwendung von anderen getrennt werden. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes kommt es zu einer Aktivierung der aus den frühen Endosomen importierten Enzyme. Die Verbindung zwischen späten Endosomen und Lysosomen ist noch schlecht verstanden; diskutiert wird ein Reifungsprozeß von späten Endosomen durch kontinuierliche Ansäuerung oder eine Verschmelzung von Endosomen mit Lysosomen.

Lysosomen haben einen stark sauren pH-Wert, ein aggressives proteolytisches Milieu und sind wie späte Endosomen in der Nähe des Zellkerns lokalisiert. Ein besonderes Merkmal dieser Vesikel ist ihre hohe Dichte, wodurch sie von Endosomen zu unterscheiden sind. Ausschlaggebend für die effiziente Herstellung antigener Peptide ist ein Gleichgewicht zwischen Degradation und genügend langer Halbwertszeit der Peptidfragmente. Nach dem gegenwärtigen Modell sind diese Bedingungen besonders gut in späten Endosomen gegeben.



**Abbildung 4: Proteindegradation und Peptidherstellung im endosomalen/lysosomalen System**

Dargestellt sind wichtige Parameter, die sich an verschiedenen Stellen im endosomalen/lysosomalen System unterscheiden (in Anlehnung an Vogt und Kropshofer, 1999). In frühen Endosomen ist der Anteil an noch intakten Proteinen aufgrund der geringen proteolytischen Aktivität hoch, ganz im Gegensatz zu Lysosomen. Die besten Voraussetzungen für die Herstellung antigener Peptide hat das Milieu der späten Endosomen.

Eine Übersicht über die Proteasen, ihre Aktivitäten und potentielle Beteiligung an der Antigenprozessierung ist in Tabelle 1 dargestellt. So ist es, bis auf eine Ausnahme (Manoury et al., 1998), trotz der Identifikation vieler im endosomalen/lysosomalen System prozessierter Antigene bisher nicht möglich gewesen, eine für die Peptidherstellung essentielle Protease zu finden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die hohe Redundanz der verschiedenen Proteasen bei der Antigen degradation sein.

**Tabelle 1: Proteasen des endosomalen/lysosomalen Systems**

<b>Cystein-Proteasen</b>	<b>Proteolytische Aktivität</b>	<b>Verbreitung</b>	<b>Funktion im MHC-II-Präsentationsweg</b>
Cathepsin B	Carboxypeptidase*	ubiquitär	Antigenprozessierung
Cathepsin C	Aminopeptidase	ubiquitär	Antigenprozessierung
Cathepsin F	Endoprotease	ubiquitär	Antigenprozessierung, <i>li</i> -Degradation
Cathepsin H	Aminoprotease*	ubiquitär	Antigenprozessierung
Cathepsin K	Endoprotease	Osteoklasten	<i>li</i> -Degradation
Cathepsin L	Endoprotease	ubiquitär	<i>li</i> -Degradation (Thymus)
Cathepsin O	unbekannt	ubiquitär	unbekannt
Cathepsin S	Endoprotease	APCs	<i>li</i> -Degradation
Cathepsin V (L2)	Endoprotease	Thymus, Testis	<i>li</i> -Degradation
Cathepsin W	unbekannt	CD8-, NK-Zellen	unbekannt
Cathepsin Z	unbekannt	ubiquitär	Antigenprozessierung
Legumain/AEP	Asparaginase	ubiquitär	Antigenprozessierung
<b>Aspartyl-Proteasen</b>			
Cathepsin D	Endoprotease	ubiquitär	Antigenprozessierung
Cathepsin E	Endoprotease	ubiquitär	Antigenprozessierung

\* für diese Proteasen gibt es auch Hinweise auf limitierte, eventuell pH-abhängige endoproteolytische Aktivitäten

Generell lassen sich die Proteindegradationswege nach ihrer Abhängigkeit von bestimmten Proteasen klassifizieren (Übersicht bei Villadangos und Ploegh, 2000; Watts, 2001). Zum einen besteht die Notwendigkeit für eine spezifische Protease, wie zum Beispiel AEP (Asparaginyln-Endopeptidase) im Falle der Prozessierung von Tetanus-Toxin, die essentiell für die Initiation, aber auch weitere Schritte der Degradation bis hin zur Herstellung der entsprechenden Peptide ist, zum anderen kann ein Abbauweg aufgrund der Redundanz von einer bestimmten Protease unabhängig sein. Der erste Weg könnte als „Protease-abhängig“, der letzte als „Protease-unabhängig“ klassifiziert werden. Ein weiterer, für beide Wege wichtiger Schritt, ist die Spaltung intramolekularer Disulfidbrücken.

Hierfür sind endosomale Thiol-Reduktasen, wie zum Beispiel das erst kürzlich beschriebene Enzym GILT ( $\gamma$ -IFN inducible lysosomal thiol reductase; Arunachalam et al., 2000) verantwortlich.

Eine wichtige Rolle im Protease-unabhängigen Weg könnten auch MHC-Klasse-II-Moleküle selbst spielen. Wie schon angedeutet hat die Peptidbindungstasche eine an den Enden offene Konfiguration (Abb. 1), was die Bindung sowohl längerer Peptide (Degradationsintermediate), als auch ganzer (entfalteter) Polypeptidketten ermöglicht (Deng et al., 1993; Nelson et al., 1997; Castellino et al., 1998). Auf diese Weise würden MHC-Klasse-II-Moleküle das antigene Peptid vor Degradation schützen, nicht aber die überhängenden Enden der Polypeptidkette, die von verschiedenen Endo- bzw. Exopeptidasen abgebaut werden könnten. Das MHC-Klasse-II-Heterodimer hätte somit eine aktive Rolle in der Peptidselektion und Antigendegradation.

Eine wichtige regulatorische Aufgabe in der Antigenprozessierung scheinen auch endogene Proteaseinhibitoren, wie etwa Cystatin C zu haben (Pierre und Mellman, 1998 a). Durch sie werden, je nach Entwicklungsstadium der professionellen antigenpräsentierenden Zelle, Proteasen aktiviert, bzw. inhibiert. Dieser bisher noch wenig bekannte Weg könnte eine dirigierende Wirkung sowohl auf die Antigenprozessierung, als auch auf die Reifung von MHC-Klasse-II-Molekülen haben.

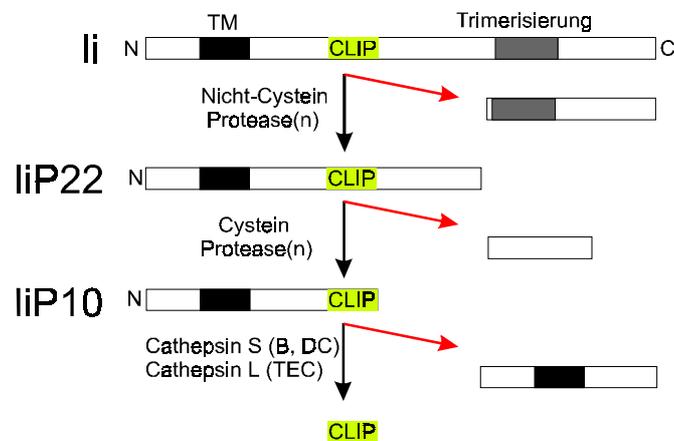
### **1.1.2.3 Die Reifung und Beladung neu-synthetisierter MHC-Klasse-II-Moleküle**

Wie schon angedeutet liegen neu-synthetisierte MHC-Klasse-II-Moleküle im ER im Komplex mit der invarianten Kette vor. Dieses MHC-Klasse-II-spezifische Chaperon erfüllt mehrere Aufgaben im MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg (Übersicht bei Cresswell, 1994).

Zum einen ist die invariante Kette für die richtige Faltung der Heterodimere im ER (Anderson et al., 1992) und zum anderen für den Transport der MHC-Klasse-II-Moleküle in das endosomale System (Lamb et al., 1991) wichtig. Hierfür ist ein im zytoplasmatischen Teil der invarianten Kette enthaltenes Di-Leucin Motiv verantwortlich (Bakke et al., 1990). Zusätzlich dazu bindet eine konservierte, CLIP (class-II-associated invariant chain peptide) genannte Region des Chaperons an die Antigenbindungstasche des MHC-Klasse-II-Heterodimeres (Roche et al., 1991; Chisz et al., 1993; Avva et al., 1994) und verhindert so eine vorzeitige Beladung von MHC-Klasse-II im peptidreichen Milieu des ER.

Weiterhin kommt es über eine in der invarianten Kette enthaltene Trimerisierungsdomäne zur Ausbildung einer nonameren Struktur aus drei Molekülen *li*, die jeweils im Komplex mit einem MHC-Klasse-II-Heterodimer vorliegen. Dieser Komplex wird aus dem ER in das endosomale System transportiert. Zusätzlich dazu gibt es Hinweise darauf, daß *li* oder Spleißvarianten davon, an der Regulation bestimmter Proteasen in Endosomen und Lysosomen beteiligt sind (Ogrinc et al., 1993; Bevec et al., 1996).

Ein essentieller Vorgang im Klasse-II-Präsentationsweg ist die schrittweise *li*-Degradation durch endosomale Proteasen und die Freigabe der Peptidbindungstasche des MHC-Klasse-II-Komplexes (Abb. 5).



**Abbildung 5: Degradation der invarianten Kette im endosomalen System**

Schematische Darstellung der Domänen und des Abbaus der invarianten Kette (*li*), der sich in drei Schritten vollzieht (siehe auch Text). Nach der Abspaltung von zwei C-terminalen Fragmenten durch noch nicht genau definierte Cystein-, bzw. nicht-Cystein Proteasen, kommt es abhängig vom Zelltyp zur Freisetzung des CLIP-Fragmentes durch Cathepsin S oder L. Abkürzungen: N: Aminoterminus; C: Carboxyterminus; TM: Transmembrandomäne; liP22, liP10: Proteolytisch modifizierte *li*-Fragmente; B: B-Zellen; DC: dendritische Zellen; TEC: Thymus-Epithelzellen.

Im Gegensatz zur Antigenprozessierung sind hier einige der verantwortlichen Proteasen bekannt. Der Abbau beginnt mit der Abspaltung eines C-terminalen Fragmentes, das auch die Trimerisierungsdomäne enthält; dies führt zu einer Dissoziation des nonameren Komplexes. Der entstehende liP22/MHC-Klasse-II-Komplex wird im nächsten Schritt weiter C-terminal verkürzt (liP10-Fragment). Schließlich wird durch einen letzten Spaltvorgang die invariante Kette vom MHC-Klasse-II-Dimer getrennt, wobei nur noch das in der Antigenbindungstasche gebundene CLIP-Fragment mit dem MHC-II-Molekül assoziiert bleibt (siehe auch Abb. 3).

Während für die ersten beiden Schritte nur bekannt ist, daß nicht-Cystein-, bzw. Cystein-Proteasen notwendig sind, ist die essentielle Rolle von Cathepsin S (in B-Zellen und dendritischen Zellen) und Cathepsin L (in Thymus-Epithelzellen) für den letzten Degradationsschritt akzeptiert (Riese et al., 1996; Nakagawa et al., 1998; Shi et al., 1999; Nakagawa et al., 1999). Für die Entfernung von CLIP und die Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle mit antigenen Peptiden sind wahrscheinlich zwei weitere, nicht klassische MHC-Klasse-II-Moleküle notwendig, die HLA-DM, bzw. HLA-DO genannt werden (Übersicht bei Vogt und Kropshofer, 1999; Busch et al., 2000).

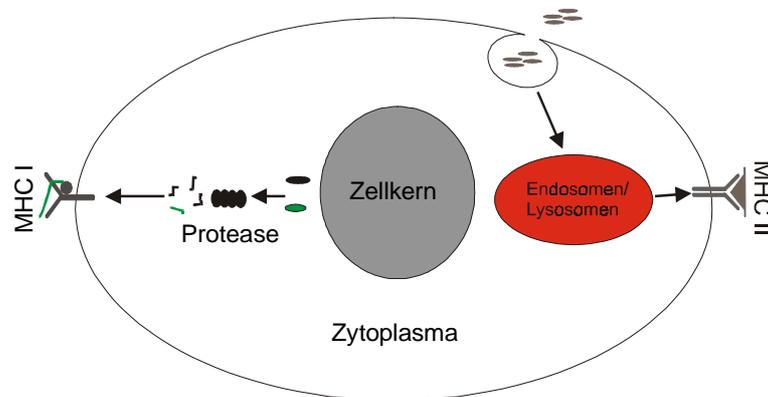
Die Aufgabe von HLA-DM liegt in einer Chaperonfunktion bei der Beladung von leeren, bzw. CLIP gebundenen MHC-Klasse-II-Heterodimeren mit geeigneten Peptiden (Sloan et al., 1995). Dies zeigt sich eindrucksvoll in Zelllinien, denen dieses Molekül fehlt, da ein Großteil der Klasse-II-Moleküle auf der Zelloberfläche mit CLIP beladen ist (Fling et al., 1994). Zusätzlich verhindert die Bindung von HLA-DM an MHC-Klasse-II-Moleküle deren Aggregation bei sehr niedrigen pH-Werten. Die genaue Funktion von HLA-DO ist noch nicht bekannt, *in vitro* Studien deuten aber auf eine pH-abhängige Regulation der HLA-DM-Aktivität hin (Kropshofer et al., 1998; Liljedahl et al., 1998).

Die Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen ist wahrscheinlich nicht an spezielle Kompartimente gebunden, sondern kann überall im endosomalen/lysosomalen System mit unterschiedlicher Effizienz erfolgen (Castellino et al., 1995). Peptid/MHC-Klasse-II-Komplexe werden dann über Transportvesikel (CIIVs) zur Zelloberfläche transportiert, wo sie von T-Zellen erkannt werden können.

### **1.1.3 Die Dichotomie MHC-restringierter Antigenpräsentation**

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein Modell aufgestellt, das auch unter der Bezeichnung „Dichotomie MHC-restringierter Antigenpräsentation“ bekannt ist (Übersicht bei Pieters, 2000). Diese Theorie besagt, daß die beiden MHC-Klassen Proteinfragmente aus unterschiedlichen zellulären Kompartimenten präsentieren (Übersicht bei Braciale et al., 1987). Proteine des Zytoplasmas und des Zellkerns werden im Kontext von MHC-Klasse-I, Proteine des extrazellulären Raumes und des endosomalen/lysosomalen Systems dagegen im Kontext von MHC-Klasse-II präsentiert (Abb. 6).

Die experimentelle Grundlage für dieses Modell lieferte die Elution und Sequenzierung von Peptiden, die an MHC-Klasse-I und -II gebunden waren (Rudensky et al., 1991; Chicz et al., 1992; Hunt et al., 1992; Rammensee et al., 1993) und Studien mit aktiven, bzw. inaktivierten Viren (Morrison et al., 1986).



### Abbildung 6: Die Dichotomie MHC-restringierter Antigenpräsentation

Peptide, die im Kontext von MHC-Klasse-I-, bzw. MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, stammen aus unterschiedlichen zellulären Kompartimenten. Proteine aus dem extrazellulären Raum werden im endosomalen- und lysosomalen-System degradiert und im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert. Dagegen werden Peptide von Proteinen, die im Zytoplasma abgebaut werden, im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert.

Jedoch gibt es auch eine wachsende Anzahl von „Ausnahmefällen“ (Malnati et al., 1992; Lich et al., 2000; Mukherjee et al., 2001), die eine strikte Trennung der Herkunft (Zytoplasma/endosomales System) der auf MHC-Molekülen präsentierten Peptide in Frage stellen und auf die Existenz anderer, sogenannter alternativer Antigenpräsentationswege schließen lassen.

## 1.2 Alternative Antigenpräsentationswege

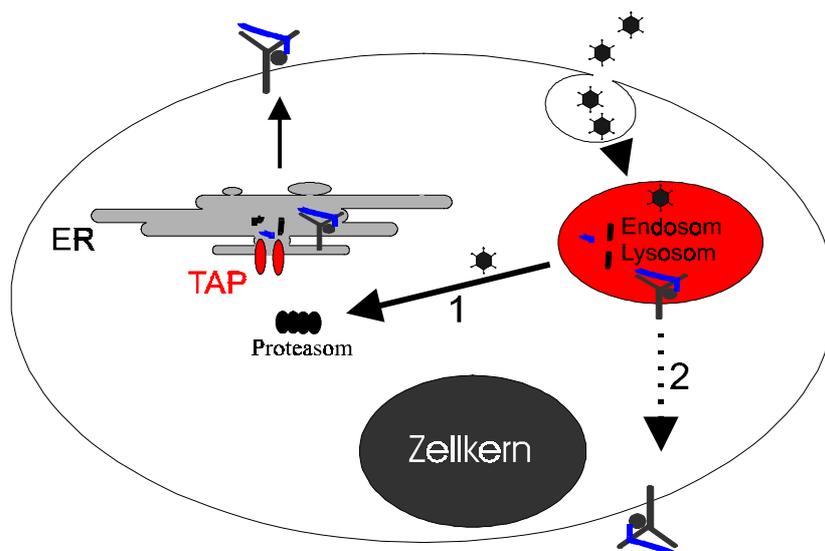
### 1.2.1 „Cross Presentation“ im MHC-Klasse-I-Präsentationsweg

Erste Hinweise auf die Existenz alternativer Antigenpräsentationswege lieferten Experimente, in denen Mäuse mit Zellen einer Spendermaus immunisiert worden waren, die sich sowohl im MHC-Klasse-I-Phänotyp als auch in der Expression eines Minor-Histokompatibilitätsantigens (mHA) vom Empfänger unterschieden (Bevan et al., 1976).

Die auftretenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Empfängermaus erkannten mHA-Peptide der Spenderzellen im Kontext der MHC-Moleküle des Empfängers, was darauf hindeutete, daß die Immunantwort nicht von der transplantierten Spenderzelle, sondern von einer Zelle des Empfängers, die das Antigen aufgenommen haben mußte, induziert worden war.

Dies steht im klaren Gegensatz zum klassischen MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg, in dem nur Proteine, die von der antigenpräsentierenden Zelle selbst gemacht werden (hauptsächlich im Zytosol/Nukleus), auf MHC-Klasse-I präsentiert werden.

Zusätzliche Bestätigung erhielt diese Theorie durch Experimente mit inaktivierten Viren (Schrader und Edelman, 1977) und der exogenen Zufuhr von löslichen Proteinen (Wiktor et al., 1977; Jay et al., 1978; Carbone und Bevan, 1990), die auch in der Lage waren, CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten zu induzieren. Obwohl viele Details dieses „cross-presentation“ (Übersicht bei Yewdell et al., 1999 b) genannten Antigenpräsentationsweges noch ungeklärt sind, lassen sich zwei verschiedene Mechanismen erkennen, die aufgrund ihrer Abhängigkeit vom TAP-Transporter unterschieden werden können (Abb. 7).



**Abbildung 7: Mechanismen zur Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen mit endozytierten Antigenen**

Aufgenommenes Material könnte intakt oder in teilweise prozessiertem Zustand (3-12kDa Fragmente) aus den Endosomen ins Zytosol entkommen, wodurch eine Proteasom- und TAP-abhängige Prozessierung und Beladung auf MHC-Klasse-I stattfinden könnte (1). Alternativ wäre auch eine Beladung mit Peptiden im endosomalen System denkbar, die unabhängig vom TAP-Transporter ablaufen würde (2). Abkürzungen: ER: endoplasmatisches Retikulum; TAP: transporter associated with antigen processing.

In dem TAP-abhängigen Präsentationsweg wird postuliert, daß endozytiertes Material aus dem endosomalen System in das Zytoplasma gelangt (endosomal escape). Dies kann entweder noch intakt (Yewdell et al., 1988) oder in teilweise degradiertes Form (vorwiegend 3-12kDa Fragmente; Rodriguez et al., 1999) stattfinden. Die endgültige Prozessierung würde dann im Zytoplasma ablaufen, wo die Peptide über TAP in das ER transportiert werden.

Im Gegensatz dazu würde bei dem TAP-unabhängigen Weg die Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen mit Peptiden im endosomalen System (Stryhn et al., 1996) oder auf der Zelloberfläche (Rock et al., 1991) erfolgen, wodurch sich die Unabhängigkeit von zytoplasmatischer Prozessierung und TAP erklären ließe.

Eine besonders wichtige Rolle spielt diese Form der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I-Molekülen in dendritischen Zellen, die sehr effizient phagozytiertes und macropinozytiertes Material im Kontext von MHC-Klasse-I präsentieren können (Shen et al., 1997; Albert et al., 1998; Sigal et al., 1999; Norbury et al., 2001). Dies ist essentiell für die Induktion einer Immunantwort gegen Mikroorganismen, welche die dendritischen Zellen nicht infizieren.

### **1.2.2 Präsentation endogener Proteine im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen**

In Analogie zur Entdeckung des alternativen MHC-Klasse-I-Präsentationsweges gab es auch für die Existenz eines alternativen MHC-Klasse-II-Beladungsweges schon seit längerer Zeit Hinweise aus verschiedenen experimentellen Systemen. Im Falle der Masern-Infektion konnte gezeigt werden, daß zytoplasmatische Proteine des Virus im Kontext von MHC-Klasse-II präsentiert werden (Jacobson et al., 1989). Ähnliches gilt für das Influenza A Matrix Protein M1 (Nuchtern et al., 1990).

Daß es sich bei diesen Phänomenen nicht um Ausnahmen handelt, wurde durch biochemische Peptid-Elutions-Studien belegt, die einen signifikanten Anteil MHC-Klasse-II gebundener Peptide fanden, die von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen abstammten (Rudensky et al., 1991; Chicz et al., 1993; Dongre et al., 2001). Schließlich konnte auch in *in vitro* und *in vivo* Studien mit Modellantigenen gezeigt werden, daß Proteine des Zytoplasmas und des Zellkerns im Kontext von MHC-Klasse-II präsentiert werden können (Sant, 1994; Oxenius et al., 1995; Guéguen und Long, 1996; Qi et al., 2000). Da es sich hierbei um die Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen mit Peptiden von in der Zelle synthetisierten Proteinen handelte, wurde dieser Präsentationsweg „endogener MHC-Klasse-II-Präsentationsweg“ genannt (Übersicht bei Lechler et al., 1996).

Die einzelnen Schritte dieses Präsentationsweges sind noch kaum verstanden. Diskutiert werden eine Antigenprozessierung im Zytoplasma (Lich et al., 2000; Mukherjee et al., 2001) oder eine vorzeitige Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen im ER entweder mit Peptiden oder mit falsch gefalteten längeren Polypeptidketten (Übersicht bei Marelli-Berg und Lechler, 1999). In letzterem Fall würde die Prozessierung nach Eintritt dieses Komplexes in das endosomale System erfolgen. Im Falle zytosolischer Prozessierung und Beladung mit Peptiden im ER müßte eine Abhängigkeit vom TAP-Transporter postuliert werden, allerdings gibt es für diesen Weg noch keine schlüssigen Beweise. Andere Studien zeigen eine eindeutige TAP-Unabhängigkeit auf (Malnati et al., 1992). Weitere, experimentell noch nicht hinterfragte Möglichkeiten zum Import zytoplasmatischer Proteine in das endosomale/lysosomale System und somit zur Beladung auf MHC-Klasse-II-Moleküle stellen Autophagie, bzw. der direkte Import von Proteinen in Lysosomen dar (Übersicht bei Dice, 1990; Ohsumi, 2001).

### **1.3 Endogene MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationswege sind die Basis wichtiger immunologischer Prozesse**

Anhand zweier Beispiele soll dargestellt werden, wie eine bessere Kenntnis endogener MHC-Klasse-II-restringierter Antigenpräsentation zur Aufklärung bisher wenig verstandener immunologischer Phänomene beitragen könnte. Beim ersten handelt es sich um die Präsentation endogener Proteine auf Thymus-Epithelzellen (TEC) zur Toleranzinduktion und beim zweiten um die Rolle endogener Antigenpräsentation auf Tumorzellen zur Induktion einer antitumoralen Immunantwort.

Nach einem aktuellen Modell (Übersicht bei Klein und Kyewski, 2000) induzieren die verschiedenen Typen von MHC-Klasse-II positiven Zellen im Thymus Toleranz gegen Proteine unterschiedlicher Herkunft. Die aus dem Knochenmark stammenden dendritischen Zellen haben eine hohe Kapazität zur Aufnahme exogener Proteine und sind wahrscheinlich verantwortlich für die Toleranzinduktion gegenüber ubiquitären Serumproteinen (hämatopoetisches Selbst). Dagegen sind die Epithelzellen im Kortex des Thymus kaum in der Lage exogene Proteine aufzunehmen und präsentieren vor allem Peptide endogener Proteine (nicht-hämatopoetisches Selbst). Es fände also eine Aufgabenteilung in der Toleranzinduktion gegenüber endogenen und exogenen Antigenen statt.

Die molekularen Mechanismen, die zu diesen verschiedenen Präsentationsprogrammen (endogen gegenüber exogen) führen und somit auch auftretende Fehler in der Toleranzinduktion (Autoimmunität), sind aufgrund fehlender Informationen über die endogene MHC-Klasse-II-restringierte Antigenpräsentation kaum verstanden.

Die meisten Tumoren exprimieren nicht konstitutiv MHC-Klasse-II-Moleküle, können jedoch durch Zytokine dazu induziert werden. Die Rolle der direkten Präsentation von Tumorassoziierten Antigenen (TAA) auf MHC-II im Verlauf einer Tumorerkrankung ist unklar. Während eine MHC-Klasse-II-Expression auf Zellen des Brust-, Kolon-, Zervix-, und Larynxkarzinoms mit einer guten Prognose einhergeht (Hilders et al., 1993; Jackson et al., 1996; Diedrichsen et al., 1997), ist genau das Gegenteil für das maligne Melanom und Osteosarkome der Fall (Moretti et al., 1997; Trieb et al., 1998). Es gibt Hinweise, daß die Erkennung von TAA auf Tumorzellen durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen über direkte (Zytotoxizität) und indirekte (Hilfe für CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Zytokinsekretion) Mechanismen (Armstrong et al., 1997; Manici et al., 1999; Mumberg et al., 1999) zur Tumorabstoßung beitragen könnte (Übersicht bei Pardoll und Topalian, 1998). Zur Klärung der Frage, warum die MHC-Klasse-II-Expression auf Tumoren sowohl positive als auch negative Folgen für den Verlauf der Krankheit haben kann, sind bessere Kenntnisse über die präsentierten endogenen Antigene, die Erkennung durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen und damit wiederum das Verständnis der molekularen Grundlagen endogener MHC-Klasse-II-restringierter Antigenpräsentation notwendig.

## **1.4 Fragestellung der Arbeit**

Die molekularen Mechanismen, die zur Präsentation von Peptiden zytoplasmatischer Proteine im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen führen, sind weitgehend unverstanden. Diese Form der Antigenpräsentation spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen zentralen immunologischen Abläufen, weshalb eine bessere Kenntnis dieses Antigenpräsentationsweges notwendig ist. Da die zur Verfügung stehenden Modellsysteme nur sehr eingeschränkte Aussagen zulassen, war das erste Ziel der Arbeit die Etablierung eines neuen Modellsystems, in dem dieser Präsentationsweg besser untersucht werden kann. Anschließend sollte durch immunologische, biochemische und zellbiologische Methoden versucht werden, den endogenen MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg zu charakterisieren.

## 2 Material

### 2.1 Zelllinien

- Für die Antigenpräsentationsstudien wurden die folgenden Zelllinien (Simons et al., 1997) mit dem angegebenen HLA-Phänotyp als antigenpräsentierende Zellen verwendet:

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR-B1	HLA-DQ-B1	HLA-DP-B1
LCL 1.11	2;26	w6;18;41	7	1501;1301	0602;0301	0301;0402
LCL 1.25*	3;24	w4;6;7;51	7	0101;1101	0501;0301	n.b.
RCC 1.24-NeoR & LCL 1.24	1;2	w6;39;62	1;7	0101;0801	0501;0402	0301;0401

Abkürzungen: n.b.: nicht bestimmt

\* Durch funktionelle Untersuchungen ist bekannt, daß diese Zelllinie HLA-DP3 negativ ist.

- Die Detektion der Präsentation des NeoR-Peptides (DRYQDIALATRDIA) im Kontext von HLA-DP3, bzw. des Hämagglutinin-Peptides (PKYVKQNTLKLAT) im Kontext von HLA-DR1 erfolgte mit den CD4+ T-Zellklonen 20-4/A4, bzw. Clone1. Der Nachweis des Tyrosinase-Peptides (YMNGTMSQV) im Kontext von HLA-A2 erfolgte mit einem Tyrosinase-spezifischen CD8+ T-Zellklon.
- Für biochemische und zellbiologische Experimente wurde die 293T-Zelllinie (zur Verfügung gestellt von Prof. G. Hobom) verwendet.

Im Rahmen der Arbeit wurde die Zelllinie LCL 1.11-ICP47 hergestellt, die den Vektor pINCO-ICP47 stabil als Episom enthält. Als Selektionsmarker ist das Puromycin-Resistenzgen auf dem Plasmid enthalten.

### 2.2 Bakterienstämme

Es wurden ausschließlich die *Escherichia coli*-Stämme XL1-blue (Stratagene) und DH5 $\alpha$  (GibcoBRL) verwendet.

## 2.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried) synthetisiert.

NeoR for: 5'-ATGATTGAACAAGATGGA-3'

NeoR anti: 5'-GCGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGC-3'

HA-Tag sense:

5'-GGCCGCATGTTACCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTTGAT-3'

HA-Tag antisense:

5'-CTAGATCAAAGGGAGGCATAATCCGGCACATCATAAGGGTAACATGC-3'

hApg5 for: 5'-CCACCATGACAGATGACAAAGATGTGC-3'

hApg5 rev: 5'-CGATCTCGAGCCTTCAATCTGTTGGCTGTGG-3'

hApg7 for: 5'-GACGACCATGGCGGCAGCTACGGGG-3'

hApg7 rev: 5'-TCTCAGATGGTCTCATCATCG-3'

hApg12 for: 5'-GACGACCATGGCGGAGGAGCCGCAG-3'

hApg12 rev: 5'-CGATCTCGAGTCATCCCCACGCCTGAGAC-3'

LC3for: 5'-CTTCGCGGCCGCAATGCCGTCGGAGAAGACCTTC-3'

LC3rev:5'-CGATTCTAGATTAACTGACAATTCATCCCG-3'

## 2.4 Expressionsplasmide

Für alle angeführten Plasmide befinden sich Vektorkarten im Anhang.

### 2.4.1 Zur Verfügung gestellte Expressionsplasmide

**pCMV/myc/cyto:** Dieses für eukaryonte Zellen geeignete Expressionsplasmid (Invitrogen) enthält einen CMV-Promotor und eine Multiple-Klonierungsstelle (MCS), durch die das Gen der Wahl mit einer Sequenz für das myc-Antikörper-Epitop fusioniert werden kann. Zusätzlich enthält es die Selektionsmarker Neomycin-Phosphotransferase (G 418-Resistenzgen) und  $\beta$ -Lactamase (Ampicillin-Resistenzgen).

**pHL 2823:** Eukaryonter Expressionsvektor, der für eine humanisierte Form des Grün-fluoreszierenden Proteins unter der Kontrolle eines CMV-Promotors kodiert (zur Verfügung gestellt von Prof. G. Hobom, Gießen).

**pINCO-GFP:** Dieser Vektor trägt den offenen Leserahmen (ORF) des EBNA1-Proteins und den Epstein Barr Virus Replikationsursprung oriP und repliziert in eukaryonten Zellen extrachromosomal als Episom. Als Selektionsmarker sind eine Puromycin- und Ampicillin-Resistenz enthalten und der GFP-ORF befindet sich unter der Kontrolle eines pCMV-Promotors (zur Verfügung gestellt von Dr. P.G. Pellici, Milano).

**pINCO-Tyrosinase:** In diesem Vektor wurde der GFP-ORF von pINCO-GFP durch den ORF für das Tumor-assoziierte Antigen Tyrosinase ersetzt (zur Verfügung gestellt von Dr. J. Mautner).

**pKEX2XR-ICP47:** Eukaryonter Expressionsvektor, der den ORF des humanen Herpes Simplex Virus Gens ICP47 unter Kontrolle eines pCMV-Promotors trägt (zur Verfügung gestellt von Prof. H. G. Rammensee).

#### 2.4.2 Eigene Expressionsplasmide

**pCMV/myc/cyto/NeoR:** Der ORF für das NeoR-Protein wurde aus pCMV/myc/cyto durch PCR mit den Primern NeoR for und NeoR anti amplifiziert (PCR-Programm: 1 min 95°C, 1 min 48°C, 2 min 72°C; 35 Zyklen), über ein Agarose-Gel aufgereinigt und mit Polynukleotidkinase (PNK) phosphoryliert. Der Vektor pCMV/myc/cyto wurde durch Verdau mit NotI linearisiert, die überhängenden Enden mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und die 3'- und 5'-Phosphate durch CIP (Calf intestine phosphatase) entfernt. Nach Aufreinigung über ein Agarose-Gel wurde das NeoR-PCR-Produkt im Verhältnis 3:1 mit dem Vektor ligiert. Nach Transformation in *E.coli* XL-1 blue wurden rekombinante Klone durch Präparation von Plasmid-DNA und analytischem Restriktionsverdau identifiziert sowie eine präparative Plasmidaufarbeitung durchgeführt. Die Richtigkeit der Klonierung wurde durch Sequenzierung (Sequiserve GmbH, Vaterstetten) überprüft.

**pCMV/myc/cyto/NeoR-GFP:** Für die Herstellung des NeoR-GFP-Fusionsproteins wurde der GFP-ORF aus dem Vektor pHL2823 über einen Verdau mit *AgeI*, anschließender Glättung der überhängenden Enden mit T4-DNA-Polymerase und abschließendem Verdau mit *XbaI* mobilisiert und über ein Agarose-Gel aufgereinigt.

Der Vektor pCMV/myc/cyto/NeoR wurde mit *NotI* gespalten, die Enden mit T4-DNA-Polymerase geglättet und im Anschluß mit *XbaI* verdaut. Nach Aufreinigung des Vektors über ein Agarose-Gel erfolgte die Ligation des GFP-ORF in pCMV/myc/cyto/NeoR über Nacht bei Raumtemperatur. Die Identifikation positiver Bakterienkolonien und die Verifikation der Sequenz erfolgten wie für pCMV/myc/cyto/NeoR beschrieben.

**pCMV/myc/cyto/NeoR-HA:** Der Vektor pCMV/myc/cyto/NeoR wurde durch Verdau mit *NotI* und *XbaI* geöffnet und über ein Agarose-Gel aufgereinigt. Jeweils 5 µl des HA-Tag „sense“ und HA-Tag „antisense“ Oligonukleotides (je 100 pmol/µl) wurden in einem PCR Röhrchen gemischt und für 5 min auf 95°C erhitzt (Denaturierung). Im Anschluß an ein langsames Abkühlen auf Raumtemperatur (Ausbildung doppelsträngiger DNA) wurden 3 µl des Gemisches in einer Ligation mit dem geschnittenen Vektor eingesetzt. Die Identifikation positiver Bakterienkolonien und die Verifikation der Sequenz erfolgten wie für pCMV/myc/cyto/NeoR beschrieben.

**pINCO-NeoR, pINCO-NeoR-GFP, pINCO-NeoR-HA:** Die Mobilisierung der jeweiligen Fragmente aus den pCMV-Vektoren (pCMV/myc/cyto/NeoR, pCMV/myc/cyto/NeoR-GFP, pCMV/myc/cyto/NeoR-HA) erfolgte durch Verdau mit *XbaI*, anschließendem Glätten der Enden mit T4-DNA-Polymerase, abschließendem Verdau mit *EcoRI* und Aufreinigung der Fragmente über ein Agarose-Gel. Der pINCO-GFP-Vektor wurde mit *NotI* verdaut, T4-DNA-Polymerase behandelt, abschließend mit *EcoRI* verdaut und aufgereinigt. Die Ligation des pINCO-Vektors mit den jeweiligen Fragmenten erfolgte im Verhältnis 1:3.

**pINCO-ICP47:** Das ICP47-Fragment wurde aus dem Vektor pKEX2XR-ICP47 durch Verdau mit *SacI*, Glätten der Enden mit T4-DNA-Polymerase und Verdau mit *NotI* isoliert und in den mit *HindIII*/T4-DNA-Polymerase und *NotI* verdauten pINCO-GFP-Vektor kloniert.

## **2.5 Antikörper**

### **2.5.1 Western-Transfer**

Die monoklonalen Antikörper gegen Lamp1, Rab5 und BiP wurden von Transduction Laboratories (Lexington), der myc-spezifische Antikörper (9E10) von Invitrogen (NV Leek) und der Cytochrom C-spezifische Antikörper von Pharmingen bezogen. Als Detektionsantikörper wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper von Dianova (Hamburg) verwendet.

Das Kaninchen Antiserum gegen humanes LC3 wurde von Dr. Noboru Mizushima (Okazaki, Japan) zur Verfügung gestellt. Der Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper wurde von Dianova bezogen.

### **2.5.2 Immunfluoreszenz**

Der monoklonale Ratte-Antikörper gegen HA wurde von Roche (Mannheim), der Cy3-gekoppelte Ziege-anti-Ratte-Sekundärantikörper von Dianova bezogen.

### **2.5.3 FACSTM-Analyse**

Der Maus HLA A,B,C (W6/32)-Antikörper wurde von Sigma, die HLA DR, DP, DQ- und HLA DP-Antikörper von Becton Dickinson (Heidelberg) bezogen. Zur Detektion wurde ein DTAF-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper von Dianova verwendet.

## **2.6 Enzyme**

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Restriktionsenzyme sowie die T4-DNA-Polymerase, CIP, T4-DNA-Ligase, Reverse-Transkriptase und die dazugehörigen Puffer von New England Biolabs (Schwalbach) und MBI Fermentas (Vilnius, Lettland) bezogen. Die für die PCR benötigten Polymerasen (Taq und PFU) und Puffer stammten von Promega (Madison, USA).

## 2.7 Chemikalien

### 2.7.1 Antibiotika

Ampicillin und Tetracyclin wurden von Merck (Darmstadt), Puromycin von Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### 2.7.2 Inhibitorstudien

Die folgenden Inhibitoren kamen in den Antigenpräsentationsstudien zum Einsatz:

Substanz	Eingesetzte Menge	Firma
AAF-CMK	25-50 $\mu$ M	Bachem (Heidelberg)
Brefeldin A	1 $\mu$ g/ml	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Chloroquin	50-100 $\mu$ M	ICN (Eschwege)
Cycloheximid	50 $\mu$ g/ml	Sigma-Aldrich
Deoxyspergualin	5-20 $\mu$ g/ml	Nippon Kayaku Co, Ltd.
Lactacystin	5 $\mu$ M	Sigma-Aldrich
Leupeptin	200 $\mu$ g/ml	Biomol (Hamburg)
3-Methyladenin	1-10 mM	Sigma-Aldrich
Pepstatin A	50 $\mu$ g/ml	Biomol
Wortmannin	10-30 nM	Sigma-Aldrich

### 2.7.3 Sonstige Chemikalien

Alle sonstigen Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in der höchsten Reinheitsstufe erworben.

## 2.8 Zellkultur

Fötales Kälberserum wurde von Biochrom (Berlin) und Bioser (Buenos Aires), Ficoll-Paque von Amersham-Pharmacia (Freiburg) bezogen. Alle sonstigen für die Zellkultur verwendeten Reagenzien stammten von GibcoBRL (Eggenstein).

## 2.9 Bakterienkultur

Hefe Extrakt, Bacto-Agar und Bacto-Trypton wurden von GibcoBRL bezogen.

## 2.10 DNA- und Proteinstandards

Für Western-Transfer-Analysen wurde der Benchmark™ Prestained Proteinstandard (GibcoBRL) und für die DNA-Agarose-Gelelektrophorese der Gene-Ruler (1kb DNA Ladder) Standard (MBI Fermentas) verwendet.

## 2.11 Software

Für das Einscannen von Diapositiven wurde die Adobe Photoshop 4.0 Software, für die FACS Auswertung die Cell Quest Software (Becton-Dickinson) verwendet. Die Vektorkarten wurden mit dem Clone Manager 6.0 Programm (Scientific and Educational Software) erstellt und die ELISA Auswertungen mit Microsoft Exel 2000 (Microsoft, USA) durchgeführt.

## 2.12 Verbrauchsmaterial

3MM Papier	Whatman (Maidstone, USA)
Bakterien und Zellkulturgefäße	Greiner (Frickenhausen)
Bradford-Lösung	BioRad (München)
Cryotubes (Einfrierampullen)	Nunc (Wiesbaden)
DNA-Gel Extraktionskit	Quiagen (Hilden)
DNA-Maxipräparationskit	Jet Star
Diafilme (ISO 400)	Kodak
ECL-Plus-Detektionssystem	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Elektroporationsküvetten	BioRad
FACS-Röhrchen	Becton-Dickinson(Heidelberg)
Hybond-P-Membran	Amersham Pharmacia
Mikro-Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Parafilm	Dynatech (Denkendorf)
Polypropylenröhrchen (5ml, 14ml)	Becton-Dickinson
Polypropylenröhrchen (15ml, 50ml)	Becton-Dickinson
Polystyrolröhrchen (15ml)	Becton-Dickinson
Rneasy-Mini-Kit	Quiagen
Röntgenfilm-XAR-5	Eastman Kodak (Rochester, USA)
Sterilfilter (0,22µM, 0,45µM)	Millipore (Eschborn)
Ultra-Zentrifugenröhrchen	Kontron (Neufahrn)

## 2.13 Geräte

Bakterien-Brutschrank	Haereus (Osterode)
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific Co. (Edison, USA)
CO <sub>2</sub> -Inkubator, Haereus 6000	Haereus
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	BioRad
ELISA-Reader	Tecan
Expositionskassetten	Eastman Kodak

## Material

---

FACS-Scan Apparatur	Becton-Dickinson
Gelelektrophoresekammer	GibcoBRL
Kamera und Steuereinheit	Carl Zeiss (Göttingen)
Lichtmikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss
Milli-Q Wasserbereitungsanlage	Millipore (Essen)
Neubauer Zählkammer	GLW (Würzburg)
pH-Meter Multi-Calimatic 763	Knick
Pipetten (20, 200, 1000µl)	Gilson
Pipettierhilfe (Pipett Boy)	Integra Biosciences
Proteingelelektrophorese	Amersham Pharmacia (Hofer)
Mighty Small II	
Scanner	Epson GT 9600
Spektrophotometer (BioPhotometer)	Eppendorf
Sterilwerkbank (Lamina Flow Hood)	Bio Flow Technik (Meckenheim)
Stromgerät Power-Pac 300	BioRad
Ultrazentrifuge (Centricon 1160)	Kontron
UV-Transilluminator	UVP Inc. (San Gabriel, USA)
Vortexer (Vortex Genie 2)	Bender & Hobein (Ismaning)
Western-Transfer-Apparatur	Amersham Pharmacia (Hofer)
TE Series Transphor	
Zentrifuge 5415C	Eppendorf
Zentrifuge Sepatech Variofuge	Haereus
Zentrifuge 2K15	Sigma (Taufkirchen)
Zentrifuge Sorvall RC5C	DuPont (Bad Homburg)

### 3 Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden (Restriktionsanalyse, Ligationen, Minipräparation von Plasmid-DNA, cDNA-Synthese, etc.) wurden nach gängigen Methoden durchgeführt (Sambrook et al., 1989) und werden hier nicht näher behandelt. Die folgenden Methoden wurden mit handelsüblichen Präparationssystemen („Kit“) nach den Angaben der Hersteller durchgeführt:

- Präparative Aufarbeitung von Plasmid-DNA (Jet Star)
- Isolierung von RNA (Quiagen)
- DNA-Isolation aus Agarose-Gelen (Quiagen)

#### 3.1 Bakterienkultur

Die Bakterien der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme XL-1 blue und DH5 $\alpha$  wurden als Kolonien auf LB-Platten (1% Trypton, 0,5% Hefe Extrakt, 0,5% NaCl, 1,2% Bacto-Agar) oder als Suspensionskultur unter Schütteln in LB Medium (1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 0,5% NaCl) bei 37°C kultiviert. Mit Plasmiden transformierte *E.coli*-Stämme wurden in Gegenwart von Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) im Fest- und Flüssigmedium gehalten. Für eine längerfristige Aufbewahrung der Bakterien wurde 1 ml einer dicht gewachsenen Suspensionskultur abzentrifugiert (5 min, 8000 U/min), in 1 ml LB Medium mit 5% DMSO resuspendiert und bei -80°C gelagert.

#### 3.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien zur Transformation

Ein 2 Liter Erlenmeyerkolben mit 500 ml LB-Medium, dem 10 ml Glucose (20%) und 5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> zugesetzt waren, wurde mit 2,5 ml einer 10 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt, bis die OD<sub>600</sub> bei 0,5-0,7 lag. Die Kultur wurde für 15 min auf Eis inkubiert, sedimentiert (15 min, 4000 U/min, 4°C) und in 250 ml kaltem Glycerol (10% in H<sub>2</sub>O) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension in 10% Glycerol wurden die Bakterien sedimentiert und in 12,5 ml kaltem Glycerol aufgenommen.

Im Anschluß an eine letzte Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert, die Bakterien in zurücklaufendem Überstand resuspendiert und in Aliquots von 30 und 100  $\mu$ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### **3.3 Transformation von Bakterien**

Pro Transformation wurden 30 µl der elektrokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 µl des Ligationsansatzes vermischt. Nach Überführung in eine gekühlte Elektroporationskuvette (2 mm Spaltbreite) erfolgte die Transformation bei 1800 Volt und 100 Ohm. Die Bakterien wurden sofort in 1 ml SOC-Medium (20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 0,58 g NaCl, 0,18 g KCl, 2 g Glucose, ad 1 l H<sub>2</sub>O) aufgenommen und für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 50 und 100 µl Proben dieser Kultur auf LB-Platten mit Ampicillin ausgebracht und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **3.4 Methoden der DNA-Analytik**

#### **3.4.1 Präparative Herstellung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Für die Herstellung großer Mengen an reiner Plasmid-DNA wurde eine 400 ml Übernachtskultur pelletiert (5000 U/min, 10 min) und die Plasmid-DNA über handelsübliche DNA-Adsorptionssäulen (Jet Star) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

#### **3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente wurden entweder Gele mit 1% Agarose (Trennbereich: 0,3-8 kb) oder 2 % Agarose (Trennbereich: 0,07-2 kb) angefertigt. Dazu wurde die entsprechende Agarose-Menge zu TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH7,8, 5 mM NaAc, 1 mM EDTA) gegeben und für 3 min in einem Mikrowellenherd aufgeköcht. Nach Abkühlen der Agarose-Lösung auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zugegeben und das Gel in einer Gelgießvorrichtung gegossen.

Die 1:10 mit Ladepuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 10% Glycerin) versetzten DNA-Proben wurden in das Gel geladen und bei 100 Volt für 1-2 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde unter UV-Licht (Wellenlänge: 254 nm) detektiert und fotografiert.

### **3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion**

cDNA (1  $\mu$ l) oder 20 ng Plasmid-DNA wurden mit je 1  $\mu$ l des Hin- und Rückprimers (100 pmol/ $\mu$ l), 2,5  $\mu$ l DMSO, 5  $\mu$ l Reaktionspuffer (10x) und 1  $\mu$ l dNTPs (je 20 nmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP) vermischt und mit H<sub>2</sub>O auf 49  $\mu$ l aufgefüllt. Nach Überschichtung mit 50  $\mu$ l Mineralöl wurde der Ansatz im Heizblock der PCR-Maschine auf 95°C erhitzt bevor 1 U der Polymerase zugegeben wurde. Sollten die PCR-Produkte für Klonierungen verwendet werden, wurde anstatt der Taq- eine Pfu-Polymerase mit Korrekturlesefunktion eingesetzt. Das verwendete PCR-Programm richtete sich nach der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer und der Länge der erwarteten PCR-Produkte (ca. 1 min/1kb).

### **3.4.4 Reverse-Transkriptase-PCR-Analyse**

Aus je  $5 \times 10^6$  LCL 1.11, RCC 1.24-NeoR, bzw. 293T-Zellen wurde mit dem Rneasy-System (Quiagen) RNA nach den Angaben des Herstellers isoliert. Nach dem Umschreiben von 3  $\mu$ g der RNA in cDNA wurde mit jeweils 1  $\mu$ l dieser cDNA eine PCR mit spezifischen Primern für die Transkripte der folgenden Proteine und unter den angegebenen Bedingungen durchgeführt:

hApg5, hApg12, LC3: 1 min 95°C, 1 min 62°C, 1 min 72°C; 35 Zyklen

hApg7: 1 min 95°C, 1 min 62°C, 2 min 72°C; 35 Zyklen

Jeweils 10  $\mu$ l der Ansätze wurden auf ein 1%-iges Agarose-Gel geladen, Amplifikate unter UV-Licht identifiziert und fotografiert.

## **3.5 Eukaryonte Zellkultur**

### **3.5.1 Kultivierung der Zellen**

Die Suspensionszelllinien LCL 1.11, 1.24 und 1.25 wurden in RPMI-1640-Medium gehalten, dem 10% fötales Kälberserum (FKS), 1% Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin zugesetzt wurden. Die Zellen wurden alle 4 Tage in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro Milliliter (ml) in frischem Zellkulturmedium neu ausgebracht.

Die humanen NeoR-, Hämagglutinin-, bzw. Tyrosinase-spezifischen T-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium mit 10% humanem Serum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin gehalten und alle 10-12 Tage restimuliert. Die Nierenkarzinomzelllinie RCC 1.24-NeoR und die 293T-Zellen wachsen adhärent und wurden in RPMI-1640-Medium mit 20% FKS, 1% Tryptose-Phosphate-Broth, 1% NEAA, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin, bzw. in Dulbeccos-Modified-Eagle-Medium mit 10% FKS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin kultiviert. RCC 1.24-NeoR wurde alle 3 Tage, 293T alle 2 Tage im Verhältnis 1:5 mit frischem Zellkulturmedium versorgt. Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Partialdruck in einem Wasserdampf-gesättigten Inkubator gehalten.

### **3.5.2 Bestimmung der Lebendzellzahl und Ficoll-Aufreinigung lebender Zellen**

Nach guter Durchmischung der Zellen wurden 10 µl der Kultur entnommen, mit 10 µl einer 0,5%-igen Trypanblau Lösung versetzt, und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Tote Zellen können durch die Aufnahme des blauen Farbstoffes im Lichtmikroskop von lebenden Zellen unterschieden werden. Befanden sich mehr als 25% tote Zellen in der Zellkultur (vor allem nach Elektroporation) wurden die toten Zellen durch Ficoll-Zentrifugation von den lebenden Zellen abgetrennt. Hierzu wurden 10 ml der Zellkultur über 2,5 ml Ficoll-Lösung geschichtet und für 30 min bei 2000 U/min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die lebenden Zellen (oberhalb der Ficoll-Lösung) wurden abgenommen, einmal in Zellkulturmedium gewaschen, erneut gezählt und in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgebracht.

### **3.5.3 Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff**

Für die längerfristige Aufbewahrung wurden  $1 \times 10^7$  Zellen abzentrifugiert (1200 U/min, 5 Minuten, RT) und in 1,8 ml Einfriermedium (10% DMSO, 90% FKS) aufgenommen. Nach der Überführung in Einfrier-Ampullen wurden die Zellen schrittweise auf -80°C abgekühlt und nach 2 Tagen in flüssigen Stickstoff transferiert. Um die eingelagerten Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Ampullen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in 10 ml frisches Zellkulturmedium überführt und abzentrifugiert. Schließlich erfolgte die Aufnahme der Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$ /ml in Zellkulturmedium und eine Kultivierung im Brutschrank.

## **3.6 Transiente und stabile Transfektionen**

### **3.6.1 Elektroporation der LCL-Zelllinien**

Die Zellen ( $1 \times 10^7$ ) wurden abzentrifugiert, einmal mit 10 ml RPMI-Medium (ohne Zusätze) gewaschen und in 300  $\mu$ l RPMI-Medium (ohne Zusätze) aufgenommen. Nach Zugabe von 15  $\mu$ g der Plasmid-DNA erfolgt die Überführung in Elektroporationsküvetten (4 mm Spalt) und die Transfektion in einem Elektroporationsgerät (Gene Pulser) bei 230 V und 1 mF.

Im Anschluß wurden die Zellen in RPMI-Medium mit 20% FKS, 1% NEAA, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Für die Herstellung stabiler Zelllinien erfolgte zuerst eine einwöchige Kultivierung in Gegenwart von 0,5  $\mu$ g/ml Puromycin und anschließend eine mindestens dreiwöchige Kultivierung der Zellen mit 1  $\mu$ g/ml Puromycin.

### **3.6.2 Transfektion mit LipofectAMIN™ und Calciumphosphat (293T und RCC 1.24)**

Für die transiente Transfektion der 293T- und RCC 1.24-NeoR-Zellen mit LipofectAMIN™ wurden die Zellen am Vortag so auf Zellkulturschalen ausgebracht, daß am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 70-80 % erreicht war.

Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers mit 5  $\mu$ g DNA und 15  $\mu$ l LipofectAMIN™ in 6cm Zellkulturschalen, bzw. mit 5  $\mu$ g DNA und 30  $\mu$ l LipofectAMIN™ in 10 cm Zellkulturschalen in OptiMEM-Medium. Nach 6 Stunden wurde das Transfektionsmedium durch normales Zellkulturmedium ersetzt.

Alternativ dazu wurden 293T-Zellen auch mit Calciumphosphat transfiziert. Die im Folgenden angeführten Mengen gelten für die Transfektion einer 10 cm Zellkulturschale. Für die Transfektion einer 14 cm Zellkulturschale wurden die dreifachen Mengen der jeweiligen Substanzen eingesetzt. Zuerst wurde 8 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben. Danach wurden 20  $\mu$ g DNA, 875  $\mu$ l Wasser und 100  $\mu$ l 2,5 M  $\text{CaCl}_2$  gemischt und tropfenweise zu 1 ml 2xHBS Lösung (280 mM NaCl, 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM HEPES; pH 7,05) gegeben. Um möglichst kleine und gleichmäßige Ca/DNA-Präzipitate zu erhalten, wurde die 2xHBS Lösung während der Zugabe durch konstante Zufuhr von Luftblasen (Pipettman-Pipette) gemischt.

Nach einer weiteren Durchmischung für 1 Minute wurde das Transfektionsgemisch tropfenweise auf die Zellkulturschale verteilt. Im Anschluß an eine 9-stündige Inkubation wurde das Medium abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Für die stabile Transfektion von 293T erfolgte die Kultivierung der Zellen 48 Stunden nach Transfektion in Gegenwart von 1-2 µg/ml Puromycin für mindestens 3 Wochen.

### **3.7 FACS™-Analyse**

Etwa  $3 \times 10^5$  Zellen wurden sedimentiert (5 min, 500xg, 4°C), in 100 µl FACS-Puffer (PBS, 2% FCS) resuspendiert und mit dem Primärantikörper (Verdünnung: 1:50) für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und für 20 min mit dem DTAF-gekoppelten Sekundärantikörper auf Eis inkubiert (Volumen: 100 µl, Antikörperverdünnung: 1:50). Nach drei Waschschritten erfolgte die Aufnahme in 1 ml FACS-Puffer mit 2 µg/ml Propidiumjodid und die Analyse wurde in einem FACS-Scan Gerät mit Cell Quest Software (Becton-Dickinson) durchgeführt.

### **3.8 Antigenpräsentationsstudien**

#### **3.8.1 LCL-Zelllinien**

Ein ausführlicher Überblick über den Versuchsablauf befindet sich im Ergebnis-Teil (Abb. 12). An dieser Stelle wird nur auf die experimentellen Details eingegangen. LCL 1.11-, bzw. LCL 1.25-Zellen wurden elektroporiert und blieben für 48 Stunden unbehandelt oder wurden in Gegenwart von Inhibitoren kultiviert. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl, wurden aus jedem Ansatz  $1 \times 10^5$  lebende Zellen in einem Volumen von 100 µl in eine 96-Loch-Zellkulturschale überführt und mit  $1 \times 10^5$  T-Zellen (100 µl) für 20 Stunden kokultiviert. Im Falle der Inkubation mit chemischen Inhibitoren wurden alle Ansätze vor Kokultivierung mit T-Zellen zunächst mit 0,5% Paraformaldehyd fixiert. Hierzu wurden  $5-7 \times 10^5$  Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (500xg, 6 Minuten, 4°C). Im Anschluß an eine 10-minütige Inkubation in 750 µl 0,5% Paraformaldehyd (Verdünnung einer 1%-igen PFA-Lösung in PBS mit RPMI-Medium ohne Zusätze) wurden die Zellen mit 1 ml RPMI-Medium (ohne Zusätze) gewaschen. Schließlich wurden die Zellen für 15 Minuten in RPMI-Medium mit 20% FCS und 1% NEAA inkubiert, zweimal gewaschen und je  $1 \times 10^5$  Zellen/100 µl pro Ansatz in eine 96 Loch Zellkulturschale überführt.

### **3.8.2 RCC 1.24-NeoR**

RCC 1.24-NeoR-Zellen ( $3 \times 10^4$ /Loch) wurden in einer 96 Loch-Zellkulturschale in einem Volumen von 100  $\mu$ l ausgebracht und für 24 Stunden kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 U/ml IFN $\gamma$  in 100  $\mu$ l Medium (Endkonzentration 50 U/ml) für 60 Stunden. Schließlich wurden die Zellen mit 0,5% Paraformaldehyd fixiert und für 20 Stunden mit  $1 \times 10^5$  T-Zellen kokultiviert. Da die Zellen adhären wachsen, wurde die Fixierung in den Zellkulturschalen durchgeführt. Hierfür wurden die oben (3.8.1) beschriebenen Volumina auf 200  $\mu$ l reduziert, der Ablauf und die Inkubationszeiten blieben gleich. Im Falle der Kultivierung mit Inhibitoren wurden den Zellen 24-48 Stunden vor dem Fixieren die jeweiligen Substanzen zugesetzt.

### **3.8.3 GM-CSF ELISA**

Im Anschluß an die Kokultivierung der antigenpräsentierenden Zellen mit den T-Zellen wurden von jedem Ansatz 100  $\mu$ l Kulturüberstand entnommen und die enthaltene GM-CSF Konzentration mittels eines GM-CSF ELISA (R&D Systems) nach den Angaben des Herstellers bestimmt.

## **3.9 Zellfraktionierung**

### **3.9.1 Grobaufreinigung der Endosomen/Lysosomen-Fraktion**

Auf eine 14 cm Zellkulturschale wurden  $1 \times 10^7$  293T-Zellen ausgebracht und am folgenden Tag mit dem Vektor pINCO-NeoR, bzw. pINCO-GFP mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion im Verhältnis 1:10 in neuem Zellkulturmedium in Gegenwart von 1  $\mu$ g/ml Puromycin ausgebracht. Untransfizierte Zellen lösen sich unter Puromycin-Behandlung bereits nach 24 Stunden von der Kulturschale und sterben ab. Nachdem die adhären Zellen zu 50% konfluent (nach ca. 24 Stunden) waren, wurde frisches Kulturmedium ohne Puromycin zu den Zellen gegeben und bis zur Konfluenz weiter kultiviert (ca. 48 Stunden). Aufgrund der hohen Transfektionseffizienz (>80%) und der schnellen Selektion durch Puromycin, exprimierten zu diesem Zeitpunkt mehr als 95% der Zellen das eingebrachte Protein (GFP-positive Zellen). Die Zugabe von Inhibitoren (Leupeptin, 3-Methyladenin) erfolgte während der letzten 48 Stunden der Kultur.

Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C, bzw. auf Eis in Anlehnung an das Protokoll von Schroter durchgeführt (Schroter et al., 1999). Das Kulturmedium wurde abgenommen, die Zellen mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2-7,4) vom Boden der Kulturschale abgespült und abzentrifugiert (1500 U/min, 5 min, 4°C).

Im Anschluß an zwei weitere Waschschrte mit PBS wurden die Zellen in 4ml Fraktionierungspuffer (10 mM Tris/Essigsäure pH 7,0, 250 mM Sucrose; 1 mM PMSF, 5 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Leupeptin) vereinigt und in einen Glasdouncer überführt. Nach 15-20 Auf- und Abbewegungen mit dem Pistill wurden die Zellen in ein 15 ml Falcon Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 2000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet (Zelltrümmer und intakte Zellen) einmal mit 1 ml Fraktionierungspuffer gewaschen. Die beiden Überstände wurden vereinigt und die Zellkerne und Plasmamembranen durch Zentrifugation bei 4000xg für 2 min sedimentiert. Das Pellet wurde einmal mit 500 µl Fraktionierungspuffer gewaschen, in 1 ml Fraktionierungspuffer aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Überstände wurden vereinigt und die Endosomen und Lysosomen durch Zentrifugation bei 100000xg für 2 min pelletiert.

Das Pellet wurde in 1 ml Fraktionierungspuffer aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und die Mikrosomen für 11 min bei 400000xg sedimentiert. Der letzte Überstand wurde als Zytosol definiert. Aliquots des Überstandes und des Mikrosomen-Pellets wurden bei -80°C gelagert.

### **3.9.2 Feinfraktionierung der Endosomen und Lysosomen**

Für eine weitere Auftrennung der endosomalen und lysosomalen Vesikel wurde das oben beschriebene Endosomen/Lysosomen-Gemisch einmal gewaschen und vorsichtig in 2 ml Fraktionierungspuffer resuspendiert. Ein Milliliter wurde entnommen und über 8 ml einer 27 %-igen Percoll-Lösung (in Fraktionierungspuffer verdünnt) geschichtet, der Rest der Mischfraktion wurde bei -80°C gelagert. Nach Zentrifugation (1 Stunde, 22000 U/min, Ti70-Rotor) wurden von oben beginnend jeweils 1 ml Fraktionen entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.9.3 Herstellung von Zellysaten aus LCL-, 293T- und RCC 1.24-Zellen

LCL-Zellen ( $1 \times 10^7$ ), bzw. 293T- oder RCC 1.24-NeoR-Zellen ( $3-5 \times 10^6$ ) wurden abzentrifugiert, einmal in kaltem Medium ohne Zusätzen gewaschen, in 100  $\mu$ l RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 1% Triton X-100, 0,5% DOC, 0,1% SDS) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden unlösliche Zellbestandteile pelletiert (15 min, 15300 U/min, 4°C), der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## 3.10 Protein-Analytik

### 3.10.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford et al., 1976)

Es wurde der von BioRad vertriebene Protein-Assay-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Jeweils zwei Verdünnungen der Proteinlösung wurden vermessen und die Proteinkonzentration durch eine parallele Eichkurve mit BSA (Konzentrationsbereich 0,5 – 10  $\mu$ g/ml) ermittelt.

### 3.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden jeweils gleiche Proteinmengen der verschiedenen Proben 4:1 mit 4x SDS-PAGE Ladebuffer (200 mM Tris/HCl pH6,8, 8% SDS (w/v), 40% Glycerin (v/v), 400 mM DTT, 0,2 mM EDTA/NaOH pH 8,0, 0,4% Bromphenolblau (w/v)) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Beladung des Polyacrylamid (PAA)-Geles mit gleichen Proteinmengen erfolgte die Elektrophorese bei 90 V für ca. 3 Stunden in Elektrophoresebuffer (0,125 M Tris-Base, 1,25 M Glycin, 0,5% SDS).

Die Zusammensetzung der PAA-Gele war wie folgt:

Sammelgel:

1 ml PAA (30% v/v; PAA/Bis: 29:1)  
3,75 ml 2xTris/SDS pH 6,8  
2,7 ml H<sub>2</sub>O  
45  $\mu$ l APS  
5  $\mu$ l TEMED

Trenngel (10, bzw. 14%):

3,5 ml PAA, bzw. 4,65 ml für 14%  
5,0 ml 2xTris/SDS pH 8,8  
1,4 ml H<sub>2</sub>O, bzw. 0,25 ml für 14%  
83  $\mu$ l APS  
8,5  $\mu$ l TEMED

2xTris/SDS pH6,8: 7,56 g Tris-base, 2,5 ml 20% SDS (w/v), pH 6,8 (HCl), H<sub>2</sub>O ad 250 ml

2xTris/SDS pH8,8: 22,68 g Tris-base, 2,5 ml 20% SDS (w/v), pH 8,8 (HCl), H<sub>2</sub>O ad 250 ml

### 3.10.3 Western-Transfer und Immunodetektion von Proteinen

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen durch Antikörper wurden die Proteine über PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran (Hybond P) erfolgte in einer mit Transfer-Puffer befüllten und im Eisbad-gekühlten Transfer-Kammer für 1 Stunde bei 90 Volt.

Die Vorbehandlung der Membran wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zusammensetzung des Transferpuffers unterschied sich für den Nachweis verschiedener Proteine:

Transferpuffer für den Nachweis von NeoR ( $\alpha$ -myc), Lamp 1, BiP: 9,5 g Glycin, 3 g Tris-base, ad 1 l H<sub>2</sub>O.

Transferpuffer für den Nachweis von Rab 5, Cytochrom C, LC3: 14 g Glycin, 3 g Tris-base, 20% Methanol (v/v), ad 1 l H<sub>2</sub>O.

Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde die Membran für 1 Stunde in Blockierlösung (5% Magermilchpulver (w/v)) inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers in Western-Puffer (3% Magermilchpulver) für 12 Stunden, bzw. über Nacht. Vor Zugabe des Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers (1:10000 in Western-Puffer) für 1 Stunde wurde die Membran dreimal für 10min mit Western-Puffer gewaschen. Nach erneuten drei Waschschrritten wurden die Proteine durch Zugabe des ECL-Plus-Detektionssystems und anschließende Autoradiographie detektiert. Die Verwendung des ECL-Plus-Systems erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Western-Puffer und Blockierlösung unterschieden sich nur in der zugegebenen Menge an Magermilchpulver.

Western-Puffer/Blockierlösung für NeoR ( $\alpha$ -myc) Nachweis: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,1% Tween 20 (v/v).

Western-Puffer/Blockierlösung für sonstige Antikörper: 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20 (v/v).

Eingesetzte Verdünnungen der Primärantikörper (in Western-Puffer):  $\alpha$ -myc (1:5000),  $\alpha$ -Lamp (1:250),  $\alpha$ -Rab5 (1:500),  $\alpha$ -Cytochrom C (1:500),  $\alpha$ -BiP (1:250),  $\alpha$ -LC3 (1:2000)

### **3.11 Immunfluoreszenz**

293T-Zellen und RCC 1.24-NeoR wurden in 10 cm Zellkulturschalen auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger ausgebracht und am nächsten Tag mit pINCO-NeoR-HA transfiziert. LCL 1.11 wurden elektroporiert,  $1 \times 10^6$  Zellen nach 48 Stunden abzentrifugiert, in 200  $\mu$ l PBS aufgenommen, auf Glasobjektträger aufgetropft und getrocknet.

Die Objektträger wurden in Glasschalen, bzw. in einer Zellkulturschale abwechselnd mit nachfolgenden Lösungen bei Raumtemperatur behandelt:

- 1) Waschen der Objektträger für 1 min in PBS
- 2) Fixieren der Zellen in 3% Paraformaldehyd (w/v in PBS) für 10 min
- 3) Waschen der Objektträger für 2 min in PBS
- 4) Blockieren der Objektträger in PBS/3% BSA für 15 min
- 5) Überführen der Objektträger in Zellkulturschalen mit angefeuchtetem Whatman-Papier („feuchte Kammer“) und Zugabe des HA-Antikörpers (1:100 in PBS/3%BSA) für 30 min
- 6) Waschen der Objektträger für 5 min in PBS
- 7) Überführen der Objektträger in feuchte Kammer und Zugabe des Sekundärantikörpers (1:100 in PBS/3% BSA) für 30 min
- 8) Waschen der Objektträger für 5 min in PBS
- 9) Aufbringen des Deckglases und Konservierung mit Kaisers Glyceringelatine (Merck)

### **3.12 Fluoreszenzmikroskopie**

Die auf Objektträger aufgebrachten Präparate, bzw. mit pINCO-NeoR-GFP-transfizierte Zellen wurden unter einem Zeiss Axiovert 10 Mikroskop mikroskopiert. Für die Färbung der späten Endosomen und Lysosomen wurden die Zellen für 1 Stunde mit LysoTracker™ Reagenz (Molecular Probes, Eugene) nach den Angaben des Herstellers inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen unter UV-, bzw. unter Tageslicht mit verschiedenen Belichtungszeiten fotografiert.

## **4 Ergebnisse**

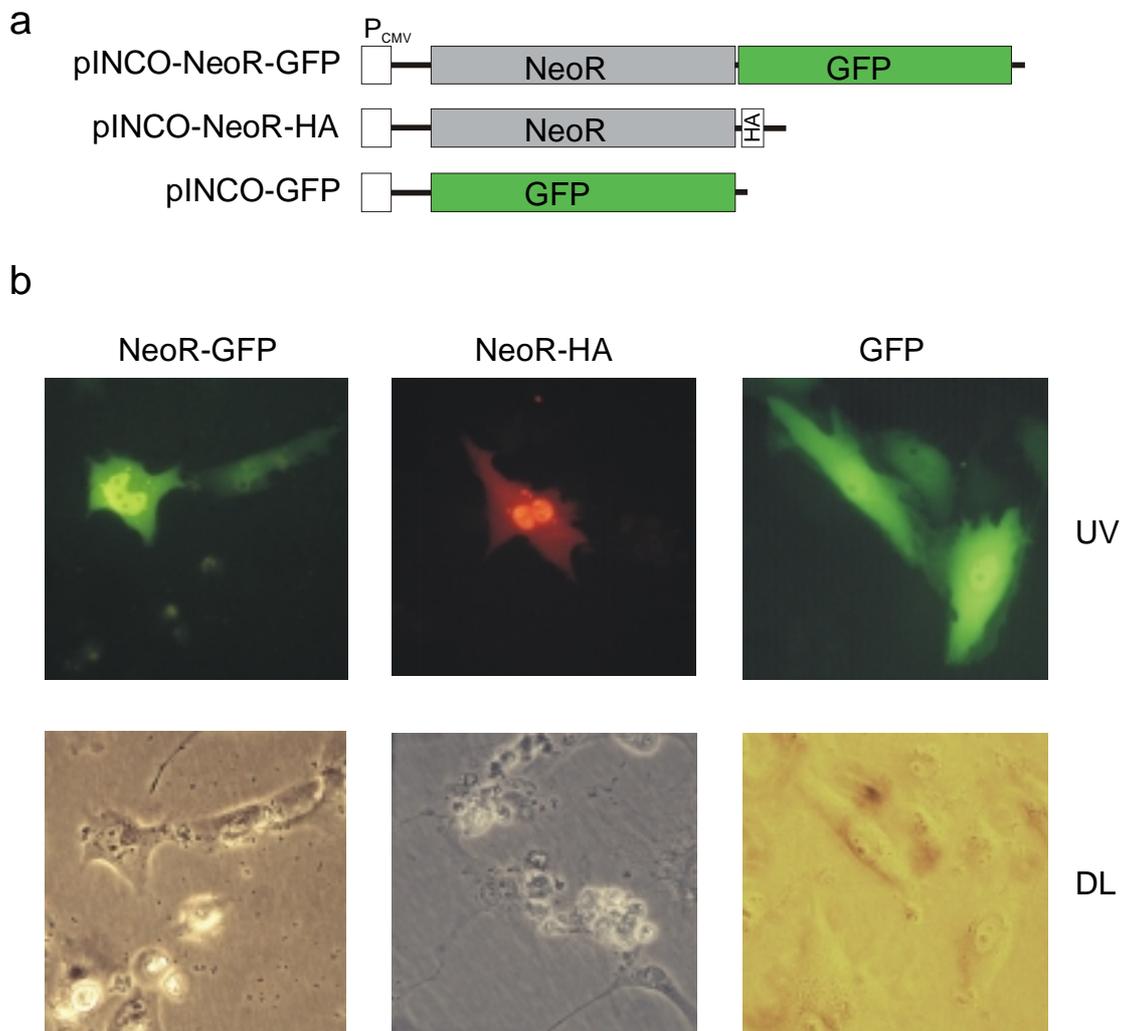
### **4.1 Etablierung eines neuen Modellsystems zur Untersuchung des endogenen MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweges**

Mit den bisher zur Verfügung stehenden Modellsystemen ist es nur eingeschränkt möglich, Aussagen über beteiligte zelluläre Strukturen am endogenen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg zu machen. Deshalb sollte ein zelluläres System etabliert werden, das für die Charakterisierung dieses Präsentationsweges besser geeignet ist. Zur Detektion der Antigenpräsentation im Kontext von MHC-Klasse-II stand der T-Zellklon 20-4/A4 zur Verfügung, der ein Peptid des bakteriellen Proteins Neomycin-Phosphotransferase (NeoR) erkennt. Um allgemeinere Aussagen machen zu können, sollte der Präsentationsweg sowohl in professionellen APCs als auch in nicht-professionellen APCs charakterisiert werden. Als Vertreter dieser beiden Klassen wurden die EBV immortalisierte B-Zelllinie LCL 1.11, bzw. die Nierenzellkarzinomlinie RCC 1.24-NeoR verwendet.

#### **4.1.1 Das Modellantigen Neomycin-Phosphotransferase ist im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert**

Es ist bekannt, daß Peptide endogener Proteine des sekretorischen Apparates (ER, Golgi), der Plasmamembran und des endosomalen Systems auf MHC-Klasse-II präsentiert werden können. Denkbare Mechanismen hierfür sind zum Beispiel die Sekretion des Proteins gefolgt von erneuter Endozytose und die vorzeitige Bindung des Proteins an MHC-Klasse-II-Moleküle im ER. Sequenzvergleiche ergaben, daß NeoR keine bekannten Signalsequenzen für einen Import in das ER hat und aller Wahrscheinlichkeit nach im Zytoplasma lokalisiert sein sollte. Um dies zu verifizieren, wurde der offene Leserahmen (ORF) von NeoR mittels PCR amplifiziert und mit dem ORF des Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP), bzw. mit einem Antikörper-Epitop des Hämagglutinin-Proteins fusioniert (NeoR-GFP, bzw. NeoR-HA). Durch den Nachweis mit unterschiedlichen Methoden (Fluoreszenz, Immunfluoreszenz) sollten mögliche Effekte der Proteinfusion auf die subzelluläre Lokalisation ausgeschlossen werden.

Mit diesen Vektoren wurden RCC 1.24-, 293T- und LCL 1.11-Zellen transient transfiziert und die Lokalisation des Proteins nach 36 h durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. Im Kontrollansatz wurden die Zellen nur mit pINCO-GFP transfiziert, um Unterschiede in der Lokalisation des Fusionsproteins im Vergleich zu GFP feststellen zu können.



**Abbildung 8: Vektorkonstrukte und subzelluläre Lokalisation von NeoR**

- a) Schematische Darstellung der verwendeten NeoR-Konstrukte pINCO-NeoR-GFP, pINCO-NeoR-HA und pINCO-GFP. NeoR, bzw. GFP repräsentieren die offenen Leserahmen, die für die jeweiligen Proteine kodieren.
- b) Gezeigt ist die subzelluläre Lokalisation des NeoR-Proteins. RCC 1.24-Zellen wurden transient mit den angegebenen pINCO-Vektoren transfiziert und nach 36 h entweder direkt (NeoR-GFP und GFP) oder nach indirektem Nachweis des Proteins über Immunfluoreszenz mit einem anti-HA-Antikörper (NeoR-HA) unter ultraviolettem (UV; obere Reihe), bzw. unter Tageslicht (DL; untere Reihe) fotografiert.
- Abkürzungen: P<sub>CMV</sub>: Promotor des Cytomegalovirus; HA: Antikörper-Epitop aus dem Hämagglutinin-Protein, das für den Nachweis des Proteins durch Immunfluoreszenz geeignet ist.

In allen verwendeten Zellsystemen konnte sowohl das NeoR-GFP-Fusionsprotein als auch das NeoR-HA-Protein im Zytoplasma und Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 8b und nicht gezeigt).

Somit eignete sich NeoR als Modellantigen für das Studium des bisher kaum verstandenen endogenen Präsentationsweges für zytosolische und nukleäre Proteine auf MHC-Klasse-II-Molekülen.

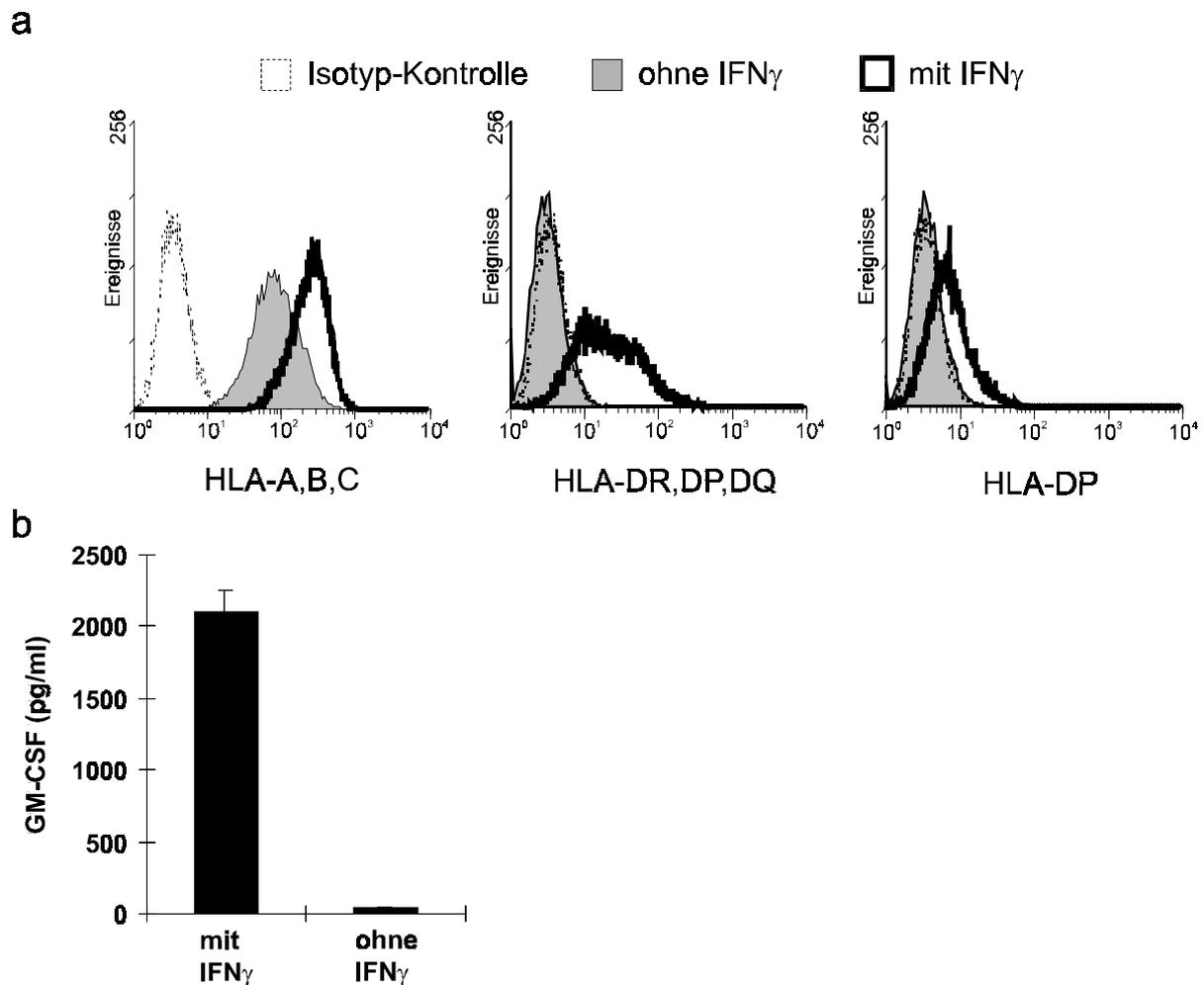
### **4.1.2 Endogene Präsentation von NeoR in der Nierenzellkarzinomzelllinie RCC 1.24-NeoR**

RCC 1.24-NeoR ist eine mit NeoR stabil transfizierte Sublinie der Nierenzellkarzinomlinie RCC 1.24. Beide Linien exprimieren MHC-Klasse-II-Moleküle erst nach Induktion mit IFN $\gamma$  (Abb. 9a). Um zu klären, ob Spaltprodukte von endogen synthetisiertem NeoR auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, wurden RCC 1.24-NeoR für 48 h mit 50 U/ml Interferon- $\gamma$  inkubiert, mit 0,5% Paraformaldehyd fixiert und anschließend für 20 Stunden mit dem T-Zellklon 20-4/A4 kokultiviert. Eine Präsentation des NeoR-Peptides im Kontext von HLA-DP3 auf der Zelloberfläche der APC, führt zu einer Aktivierung der T-Zellen. Ein Maß für diese Aktivierung ist die Sekretion von Zytokinen (IL-2, TNF $\alpha$ , GM-CSF), die mittels ELISA nachgewiesen werden können. Bereits 48 h nach Induktion der MHC-Klasse-II-Expression mit IFN $\gamma$  kam es zu einer starken Erkennung durch die T-Zellen und somit auch zu einer Präsentation des NeoR-Peptides (Abb. 9b).

### **4.1.3 Endogene Präsentation von NeoR in der lymphoblastoiden Zelllinie LCL 1.11**

In Analogie zu den vorangegangenen Experimenten wurde auch die LCL 1.11-Zelllinie auf Expression von MHC-Klasse-II, Transfizierbarkeit und die Fähigkeit zur endogenen Präsentation von NeoR-Peptiden auf MHC-Klasse-II untersucht. Durch FACSTM-Analyse mit Antikörpern gegen MHC-Klasse-I (HLA-A, B, C), MHC-Klasse-II (HLA-DR, DP, DQ) und HLA-DP konnte gezeigt werden, daß die Zellen diese MHC-Moleküle konstitutiv exprimieren (Abb. 10a). Da virale Genprodukte häufig mit der Antigenpräsentation interferieren, sollte auf die Verwendung viraler Systeme zum Zwecke des Gentransfers verzichtet werden (Übersicht bei Yewdell und Bennink, 1999 a; Alcamì und Koszinowski, 2000). Deshalb wurde die Transfizierbarkeit der LCL 1.11-Zelllinie mittels Elektroporation untersucht.

Nach Optimierung der Elektroporationsbedingungen für diese Zelllinie konnten reproduzierbar Transfektionseffizienzen zwischen 40 und 50 % erreicht werden (Abb. 10b).



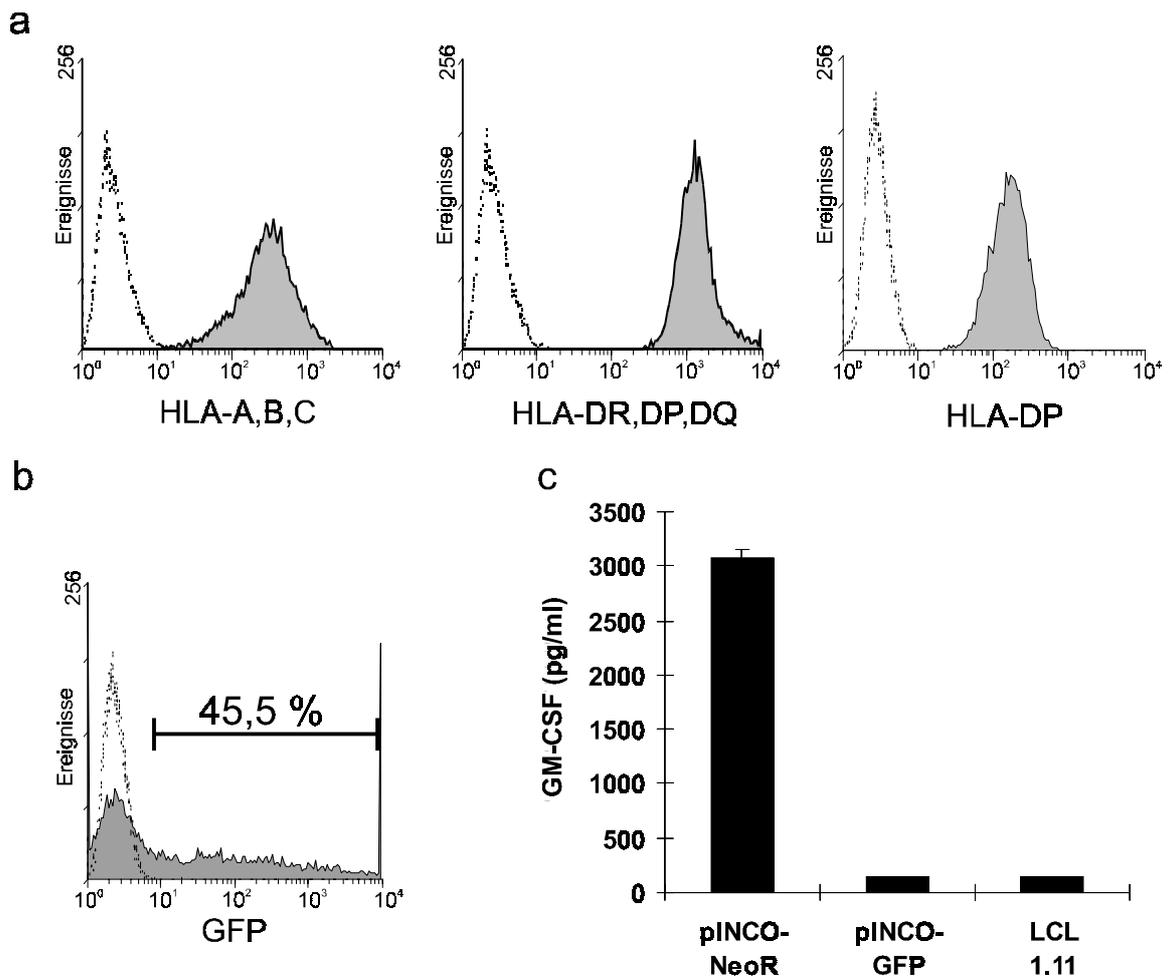
**Abbildung 9: Induktion der MHC-Klasse-II-Expression und Antigenpräsentation auf RCC 1.24-NeoR durch Interferon- $\gamma$**

RCC 1.24-NeoR-Zellen wurden für 48 h in Gegenwart oder Abwesenheit von 50 U/ml IFN $\gamma$  kultiviert.

a) Untersuchung der Zellen auf Expression von MHC-Klasse-I (HLA A,B,C), MHC-Klasse-II (HLA DR, DP, DQ) und HLA-DP durch FACST<sup>TM</sup>-Analyse.

b) RCC 1.24-NeoR-Zellen wurden nach Fixierung mit 0,5% Paraformaldehyd für 20 Stunden mit dem T-Zellklon 20-4A/4 kokultiviert. Dargestellt ist die GM-CSF Konzentration im Kulturüberstand, die mittels eines GM-CSF ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) gemessen wurde.

Anschließend wurde die Fähigkeit zur endogenen Präsentation des Modellantigens durch Transfektion der Zellen mit dem Modellantigen überprüft. Hierfür wurde der offene Leserahmen (ORF) des GFP-Proteins im Vektor pINCO-GFP (Abb. 8a) durch den NeoR-ORF ersetzt (pINCO-NeoR).



**Abbildung 10: Transfizierbarkeit und endogene Antigenpräsentation in LCL 1.11**

- LCL 1.11-Zellen wurden mittels FACS<sup>TM</sup>-Analyse auf Expression von MHC-Klasse-I (HLA A,B,C), MHC-Klasse-II (HLA DR, DP, DQ) und HLA-DP untersucht. Die Färbung mit den jeweiligen Antikörpern (x-Achse) ist grau unterlegt, die Isotyp-Kontrolle gestrichelt und ohne Füllung dargestellt.
- LCL 1.11-Zellen wurden mit dem Vektor pINCO-GFP transfiziert und nach 48 h durch FACS<sup>TM</sup>-Analyse auf Expression von GFP untersucht. Die Analyse transfizierter Zellen ist grau unterlegt, die der untransfizierten Kontrolle gestrichelt und ohne Füllung dargestellt.
- Die endogene Präsentationskapazität der LCL 1.11-Zellen wurde durch Transfektion mit pINCO-NeoR und Kokultivierung mit dem T-Zellklon 20-4/A4 ermittelt. Als Kontrolle wurden mit pINCO-GFP, bzw. untransfizierte Zellen verwendet.

Die Zellen wurden elektroporiert und nach 48 h mit dem NeoR-spezifischen T-Zellklon 20-4/A4 kokultiviert. Anhand der gemessenen GM-CSF Sekretion durch die T-Zellen konnte gezeigt werden, daß auch diese Zellen gut in der Lage sind, Peptide von endogen exprimiertem NeoR im Kontext von MHC-Klasse-II zu präsentieren. Im Gegensatz dazu wurden pINCO-GFP, bzw. untransfizierte Zellen nicht erkannt (Abb. 10c).

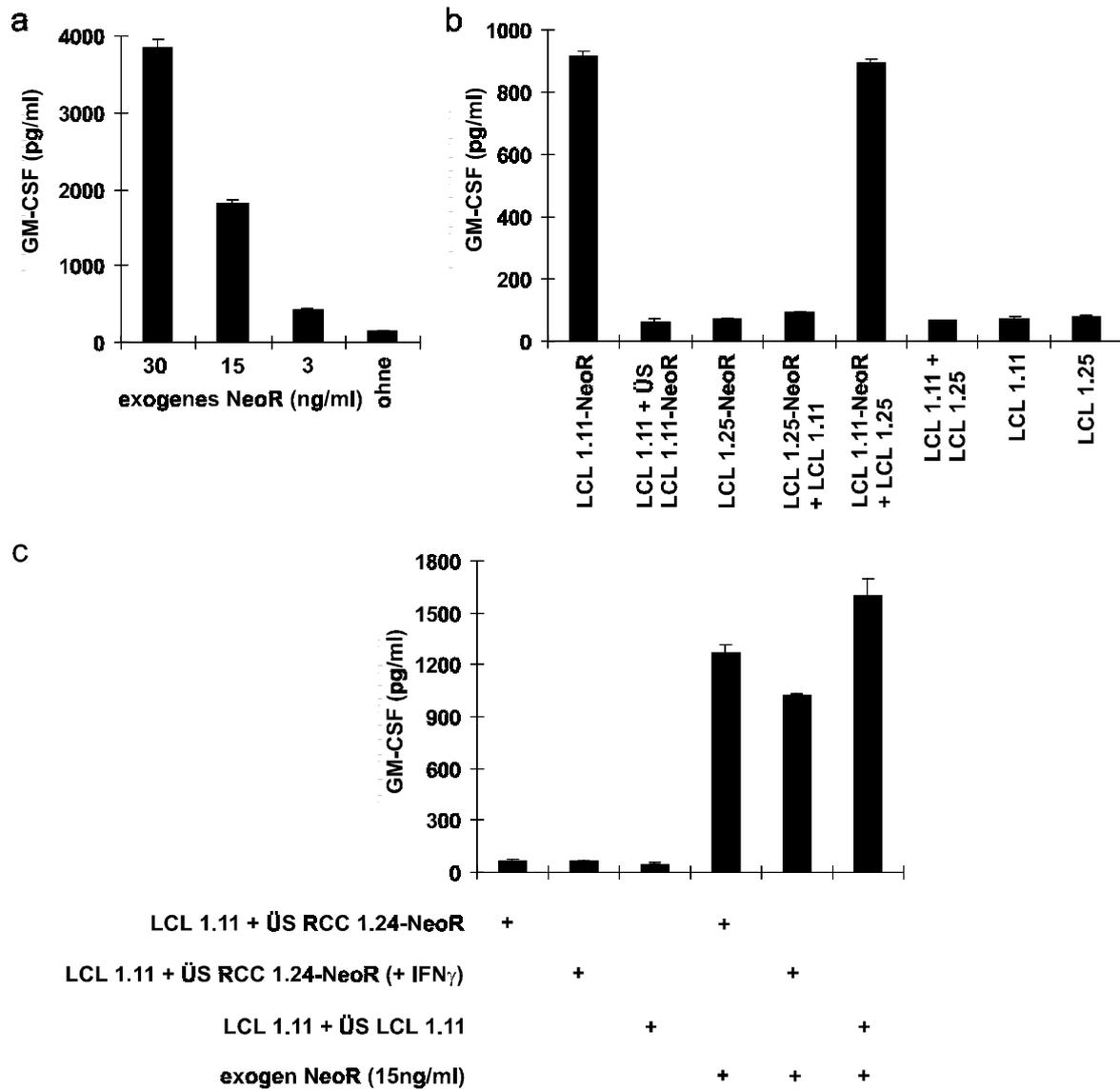
#### **4.1.4 NeoR wird nicht in den Kulturüberstand sekretiert**

Professionelle APCs zeichnen sich durch eine effiziente Antigenaufnahme aus dem extrazellulären Raum (Kulturmedium) aus. Deshalb sollte ausgeschlossen werden, daß es in den verwendeten Zellen zu einer Freisetzung des NeoR-Proteins in den Kulturüberstand und zu einer Aufnahme in den klassischen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg kommt. Die Proteinkonzentrationen, die für eine Aufnahme und Präsentation ausreichen, sind oft nicht mehr durch biochemische Detektionsverfahren (Western-Transfer-Experimente) nachweisbar. Deshalb sollte der Nachweis auf im Kulturüberstand vorhandenes Protein funktionell auf Ebene der Antigenpräsentation durch die professionelle APC LCL 1.11 erfolgen.

Um einen Einblick in die Endozytosekapazität der Zelllinie zu erhalten, wurde zunächst durch Zugabe verschiedener Mengen von rekombinant in *E. coli* hergestelltem NeoR-Protein die minimale Proteinkonzentration ermittelt, die ausreichend für eine Erkennung durch NeoR-spezifische T-Zellen war. Im Gegensatz zur allgemeinen Annahme, daß B-Zellen nur eine geringe pinozytotische Aktivität besitzen, konnte gezeigt werden, daß eine extrazelluläre Antigenkonzentration von 3 ng/ml ausreicht, um eine Erkennung durch den T-Zellklon 20-4/A4 zu gewährleisten (Abb. 11a).

Im Vergleich dazu waren 500-1000fach höhere Konzentrationen an exogenem NeoR-Protein für die Erkennung der RCC 1.24 durch die T-Zellen notwendig (nicht gezeigt). Deshalb wurde LCL 1.11 als biologisches Detektionssystem für sekretiertes NeoR-Protein eingesetzt. Dazu wurden LCL 1.11 mit Überstand (48 h nach Elektroporation) NeoR-transfizierter LCL 1.11 für 48 h inkubiert und anschließend mit dem NeoR-spezifischen T-Zellklon kokultiviert. Obwohl mit diesem Versuchsansatz kein NeoR im Kulturüberstand detektiert wurde, konnte nicht ausgeschlossen werden, daß NeoR-Protein über Zell/Zellkontakt weitergegeben wird und so wiederum in den klassischen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg gelangt. Um dies zu untersuchen, wurde eine HLA-DP3-negative LCL-Zelllinie (LCL 1.25) mit pINCO-NeoR transfiziert und dann mit LCL 1.11 für 48 h kokultiviert. Auch dies führte zu keiner Erkennung durch den T-Zellklon (Abb.11b).

In analoger Weise wurde auch die RCC1.24-NeoR-Zelllinie durch LCL 1.11 auf NeoR-Sekretion überprüft. Um auszuschließen, daß Kulturüberstände von RCC 1.24-NeoR die Präsentation von exogenem Antigen in der B-Zelllinie inhibieren, wurde den Überständen in einem parallelen Ansatz jeweils 15 ng/ml exogenes NeoR zugesetzt.



**Abbildung 11: Das Modellantigen NeoR wird über einen endogenen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg präsentiert**

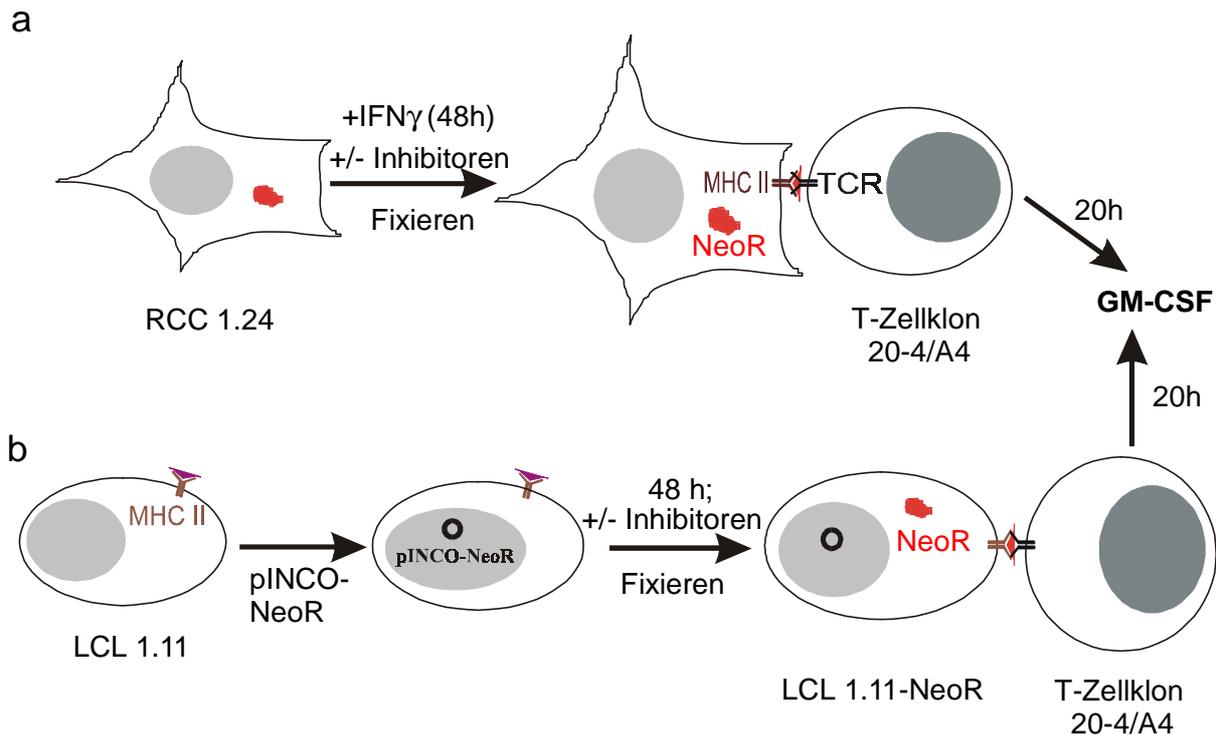
- a) **Die LCL 1.11-Zelllinie ermöglicht den Nachweis minimaler NeoR-Mengen im Kulturmedium.** LCL 1.11 wurden in Gegenwart von unterschiedlichen exogenen NeoR-Konzentrationen für 24 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen viermal mit Medium (ohne NeoR) gewaschen und mit dem T-Zellklon 20-4/A4 kokultiviert. Die GM-CSF Sekretion wurde mit einem GM-CSF ELISA ermittelt.
- b) **NeoR gelangt weder über Sekretion noch durch Zell/Zellkontakt-abhängigen Transfer in den MHC-Klasse-II-Präsentationsweg.** LCL 1.11-Zellen wurden mit pINCO-NeoR transfiziert (LCL 1.11-NeoR), und der Kulturüberstand (ÜS) nach 48 h auf untransfizierte LCL 1.11 transferiert (LCL 1.11 + ÜS LCL 1.11-NeoR) und diese für weitere 48 h kultiviert. Zusätzlich wurden HLA-DP3 negative LCL 1.25-Zellen mit pINCO-NeoR transfiziert (LCL 1.25-NeoR) und mit LCL 1.11 kokultiviert. Als Kontrollen wurden untransfizierte LCL 1.11 und 1.25 entweder zusammen oder einzeln kultiviert. Die weitere Behandlung der Zellen (Waschen, Kokultivierung mit T-Zellen, GM-CSF ELISA) erfolgte wie unter a) beschrieben.
- c) **Im Kulturüberstand von RCC 1.24-NeoR ist kein NeoR-Protein nachweisbar.** Überstände (ÜS) von RCC 1.24-NeoR-, bzw. RCC 1.24-NeoR-Zellen, die für 48 h mit IFN $\gamma$  behandelt worden waren (ÜS RCC 1.24-NeoR (+IFN $\gamma$ )), wurden auf LCL 1.11-Zellen transferiert und diese für 48 Stunden kultiviert. Als Negativkontrolle diente der Kulturüberstand von LCL 1.11-Zellen, als Positivkontrollen Überstände von RCC 1.24-NeoR- und LCL 1.11-Zellen, denen exogenes NeoR (15 ng/ml) zugesetzt worden war. Die weitere Behandlung der Zellen (Waschen, Kokultivierung mit T-Zellen, GM-CSF ELISA) erfolgte wie unter a) beschrieben.

Diese Versuche ergaben, daß sich auch im Kulturüberstand von RCC 1.24-NeoR keine nachweisbaren Mengen von NeoR befanden (Abb.11c). Somit konnte zum einen ausgeschlossen werden, daß es sich bei dem verwendeten Modellantigen Neomycin-Phosphotransferase um ein sekretiertes Protein handelt, zum anderen konnte nachgewiesen werden, daß die MHC-Klasse-II-restringierte Präsentation von NeoR alle Kriterien einer endogenen Präsentation auf MHC-Klasse-II erfüllt.

### **4.2 Das experimentelle System zur Untersuchung endogener Antigenpräsentation**

Somit standen zwei zelluläre Systeme zur Verfügung, um die Präsentation eines zytoplasmatischen Antigens auf MHC-Klasse-II sowohl in professionellen als auch in nicht-professionellen APCs untersuchen zu können. Dazu wird die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf RCC-Zellen mit IFN $\gamma$  induziert, bzw. die LCL 1.11-Zelllinie mit pINCO-NeoR transfiziert. Hieran schließt sich eine 48-stündige Inkubationszeit an, in der Antigenprozessierung und Peptidbeladung auf MHC-Klasse-II-Moleküle stattfinden kann (Abb. 12). Zur Charakterisierung der beteiligten zellulären Strukturen sollten Einflüsse von chemischen, bzw. biologischen Inhibitoren innerhalb dieser 48 Stunden auf die Antigenpräsentation (GM-CSF Sekretion durch die T-Zellen) ermittelt werden. Um Auswirkungen der Inhibitoren auf die T-Zellen zu vermeiden, wurden die APCs vor der Kokultivierung mit 0,5% Paraformaldehyd fixiert und die Inhibitoren durch mehrmaliges Waschen entfernt (Abb. 12). Die Fixierung der Zellen ist notwendig, da die Wirkung vieler Inhibitoren reversibel ist. Somit wären die Effekte dieser Substanzen nach dem Auswaschen nicht mehr eindeutig erkennbar. Nach 20-stündiger Kokultivierung sollte die von den T-Zellen freigesetzte GM-CSF Menge mittels einem GM-CSF ELISA bestimmt werden und Auskunft über die Effekte der eingesetzten Inhibitoren auf die Antigenpräsentation geben.

Zusätzlich wurden alle Ansätze vor der Kokultivierung mit den T-Zellen gezählt, um Sekundäreffekte der Inhibitoren auf die Proliferation auszuschließen. Außerdem wurden weitere Kontrollen durchgeführt, um die Spezifität der Inhibitoren zu gewährleisten. Diese werden im Rahmen der jeweiligen Experimente erläutert.



**Abbildung 12: Schematische Darstellung des experimentellen Systems zur Messung der Antigenpräsentation**

- a) Die RCC 1.24-NeoR-Zelllinie wird durch Kultivierung in Anwesenheit von  $IFN\gamma$  zur Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen (braun) induziert, die mit Peptiden des NeoR-Proteins (rot) beladen werden können. In dieser Zeit werden die Zellen auch mit Inhibitoren inkubiert. Nach Fixierung der Zellen mit 0,5% Paraformaldehyd erfolgt die Kokultivierung mit dem NeoR-spezifischen T-Zellklon 20-4/A4 für 20 h.
- b) In einem ersten Schritt wird der pINCO-NeoR-Vektor in die LCL 1.11-Zellen eingebracht, die Zellen mit, bzw. ohne Inhibitoren inkubiert und anschließend fixiert. Hieran schließt sich die Kokultivierung mit dem T-Zellklon 20-4/A4 an.

Erkennt dieser T-Zellklon das NeoR-Peptid auf der Zelloberfläche, führt dies zur Sekretion von GM-CSF durch den T-Zellklon. Die Menge an GM-CSF im Kulturüberstand ist somit ein indirektes Maß für die Antigenpräsentation und kann quantitativ mittels ELISA ermittelt werden. Abkürzungen: TCR: T-Zellrezeptor

### 4.3 Charakterisierung des Prozessierungsortes

Anhand dieses gut definierten experimentellen Systems sollte die Beteiligung verschiedener zellulärer Kompartimente an diesem Präsentationsweg untersucht werden. Daten anderer Gruppen deuteten auf eine Beteiligung klassischer Komponenten des MHC-Klasse-I-Präsentationsweges, wie etwa einer Prozessierung im Zytoplasma, einem TAP-abhängigen Peptidimport und somit einer vorzeitigen Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen im ER hin (Nuchtern et al., 1990; Lich et al., 2000; Mukherjee et al., 2001).

Da nicht alle MHC-Klasse-II-Heterodimere eine hohe Affinität für die Bindung der invarianten Kette (insbesondere des CLIP-Anteils) besitzen, wäre es vorstellbar, daß in diesen besonderen Fällen Peptide im ER an MHC-Klasse-II-Heterodimere binden könnten und diese analog zu MHC-Klasse-I-Molekülen direkt zur Zelloberfläche transportiert würden.

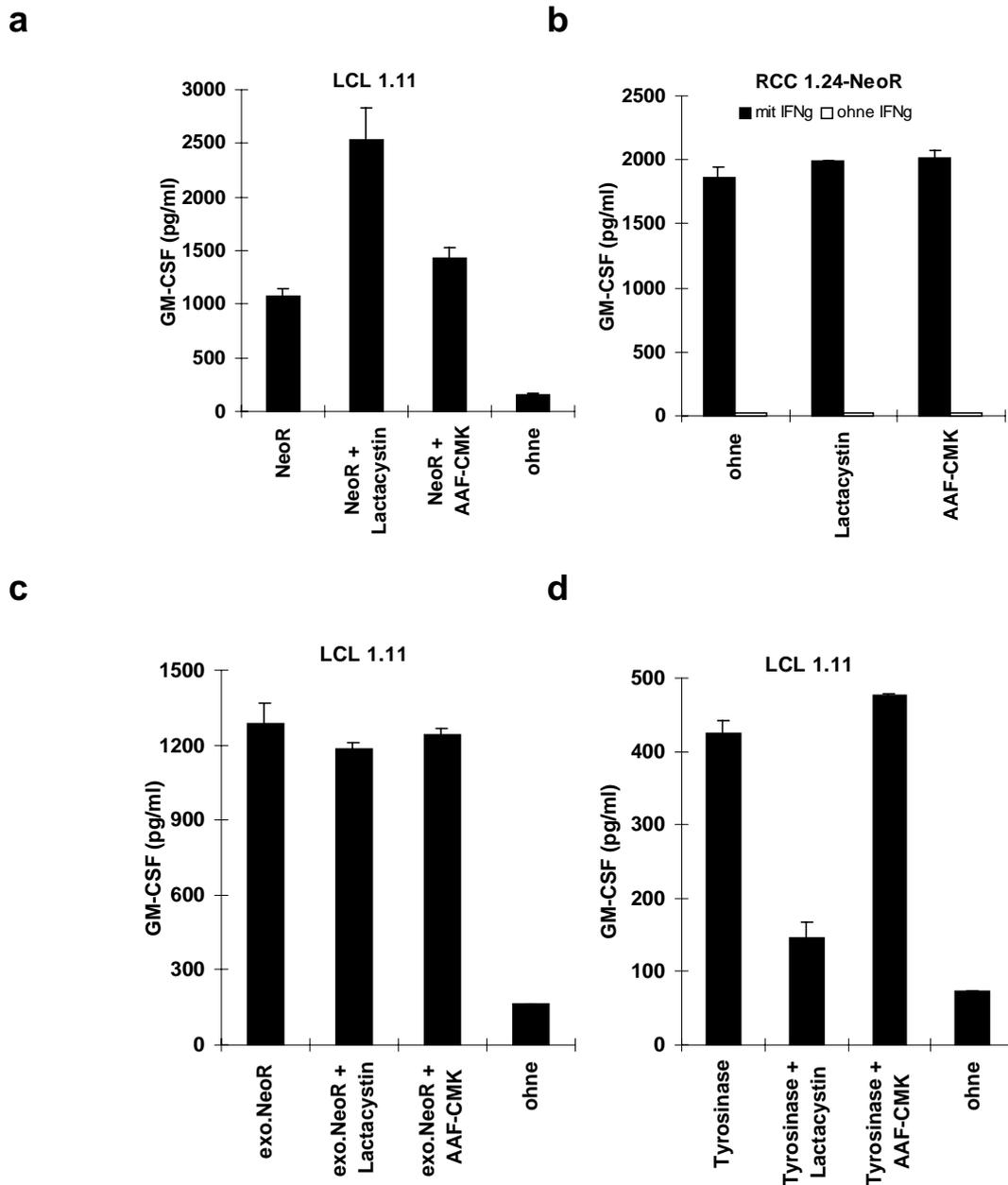
Dagegen gab es aber auch Hinweise für die Notwendigkeit endosomaler/lysosomaler Proteasen (Jaraquemada et al., 1990). Durch die Verwendung chemischer und biologischer Inhibitoren sollte der Einfluß dieser Strukturen auf die endogene Präsentation des NeoR-Modellantigens im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen geklärt werden.

### **4.3.1 Beteiligung des Proteasoms und TPPII an der Präsentation von NeoR im Kontext von MHC-Klasse-II**

Studien mit zytosolischen, MHC-Klasse-II-restringierten Modellantigenen deuten darauf hin, daß sowohl das Proteasom und TPPII, als auch andere, nicht näher charakterisierte Proteasen des Zytoplasmas an der Herstellung von Peptiden für MHC-Klasse-II-Moleküle beteiligt sein könnten (Lich et al., 2000; Mukherjee et al., 2001).

Um den Einfluß von Proteasom und TPPII auf die Präsentation von NeoR zu untersuchen, wurden die beiden gut charakterisierten Inhibitoren Lactacystin und AAF-CMK verwendet. Lactacystin inhibiert irreversibel die Chymotrypsin- und Trypsin-ähnliche Aktivität und in geringerem und reversiblen Ausmaß die PGPH-ähnliche Aktivität (Fenteany et al., 1995) des Proteasoms. In einem Konzentrationsbereich zwischen 1-10  $\mu\text{M}$  wird die Proteasom-Aktivität einer Vielzahl professioneller und nicht-professioneller APCs unterbunden (Craiu et al., 1997). Das modifizierte Tripeptid Alanin-Alanin-Phenylalanin-Chlormethylketon (AAF-CMK) inhibiert in einem Konzentrationsbereich zwischen 20 und 30  $\mu\text{M}$  über 80% der TPPII-Aktivität, nicht jedoch die proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms (Geier et al., 1999). Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen lagen bei 5  $\mu\text{M}$  Lactacystin und 25  $\mu\text{M}$  TPPII und damit im bekannten Normbereich (Craiu et al., 1997; Geier et al., 1999).

pINCO-NeoR-transfizierte LCL 1.11, bzw. IFN $\gamma$ -vorbehandelte RCC 1.24-NeoR-Zellen wurden in den letzten 18 Stunden der 48-stündigen Inkubationszeit mit den Inhibitoren inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Zellen fixiert und mit dem T-Zellklon 20-4/A4 kokulti- viert.



**Abbildung 13: Das Proteasom und TPPII sind nicht an der Herstellung des HLA-DP-restringierten NeoR-Peptides beteiligt**

Dargestellt sind Antigenpräsentationsstudien mit LCL 1.11 (a, c, d) und RCC 1.24-NeoR (b).

- LCL 1.11 wurde mit pINCO-NeoR (NeoR) transfiziert und ein Teil der Zellen wurde mit Lactacystin (5  $\mu$ M), bzw. AAF-CMK (25  $\mu$ M) für 18 h behandelt, fixiert und mit 20-4/A4 kokultiviert. Als Kontrolle wurden transfizierte LCL 1.11 ohne Zugabe von Inhibitoren (NeoR) und untransfizierte LCL 1.11 verwendet (ohne).
- RCC 1.24-NeoR wurde mit IFN $\gamma$  zur MHC-Klasse-II-Expression induziert und in Gegenwart oder Abwesenheit (ohne) von Lactacystin, bzw. AAF-CMK kultiviert. Als Kontrolle wurden RCC 1.24-NeoR-Zellen verwendet, die nicht mit IFN $\gamma$  behandelt wurden. Fixierung und Kokultivierung mit den T-Zellen erfolgte wie unter a) beschrieben.
- LCL 1.11 wurde in Gegenwart oder Abwesenheit der Inhibitoren mit 30 ng/ml exogenem NeoR-Protein (exo-NeoR) inkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte LCL 1.11-Zellen (ohne) verwendet. Fixierung und Kokultivierung mit den T-Zellen erfolgte wie unter a) beschrieben.
- LCL 1.11 wurde mit dem Vektor pINCO-Tyrosinase transfiziert und wie unter a) beschrieben behandelt. Nach Fixierung erfolgte die Kokultivierung mit einem Tyrosinase-spezifischen T-Zellklon. Die Messung der GM-CSF Konzentration im Kulturüberstand erfolgte mittels ELISA.

Es konnte gezeigt werden, daß das Proteasom und TPPII nicht an der Herstellung des HLA-DP-restringierten NeoR-Peptides beteiligt sind (Abb. 13a,b). Um die Spezifität der Inhibitoren in den verwendeten Zelllinien zu gewährleisten, wurden zwei zusätzliche Kontrollen durchgeführt.

Da LCL 1.11 das MHC-Klasse-I-Allel HLA-A2 exprimiert, war es möglich die Funktionalität der Inhibitoren durch die Verwendung des Tumor-assoziierten Antigens (TAA) Tyrosinase zu überprüfen (Brichard et al., 1993; Wolfel et al., 1994). Die Präsentation von Tyrosinase ist abhängig von proteasomaler Prozessierung und dem TAP-Transporter (Mosse et al., 1998) und kann mit einem CD8+ Tyrosinase-spezifischen T-Zellklon gemessen werden (zur Verfügung gestellt von Dr. H. Bussler).

LCL 1.11-Zellen wurden mit einem Tyrosinase-Expressionsplasmid (pINCO-Tyrosinase) transfiziert und die Antigenpräsentationsexperimente in Gegenwart der Inhibitoren wie für NeoR beschrieben durchgeführt (Abb. 12). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß die eingesetzte Lactacystin-Konzentration für eine Inhibition der MHC-Klasse-I-restringierten Präsentation des Tyrosinase-Peptides ausreichend ist (Abb. 13d). Da AAF-CMK zu keiner Inhibition der Präsentation des Tyrosinase-Peptides führte, konnte sichergestellt werden, daß der Inhibitor in dieser Konzentration keine negative Wirkung auf das Proteasom hat.

Weiterhin wurden zum Ausschluß unspezifischer toxischer Effekte untransfizierte LCL 1.11-Zellen gleichzeitig mit den Inhibitoren und exogenem NeoR-Protein inkubiert. Aus dem extrazellulären Raum aufgenommenes NeoR sollte in den klassischen MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg gelangen und unabhängig von zytosolischen Proteasen präsentiert werden. Da keine der beiden Substanzen eine Auswirkung auf die exogene Präsentation von NeoR hatte (Abb. 13c), wurden unspezifische Sekundäreffekte ausgeschlossen.

### **4.3.2 Die Beteiligung des TAP-Transporters an der endogenen Präsentation von NeoR**

Das Proteasom und TPPII sind zwar die hauptverantwortlichen zytoplasmatischen Proteasen für die Herstellung von MHC-Klasse-I-restringierten Peptiden, aber es ist dennoch nicht auszuschließen, daß auch andere Proteasen des Zytoplasmas an der Herstellung antigener Peptide beteiligt sind (Lich et al., 2000). Da für diese noch wenig bekannten Proteasen keine oder nur schlecht definierte chemische Inhibitoren verfügbar sind, wurde eine andere Strategie zum Nachweis zytoplasmatischer Prozessierung gewählt.

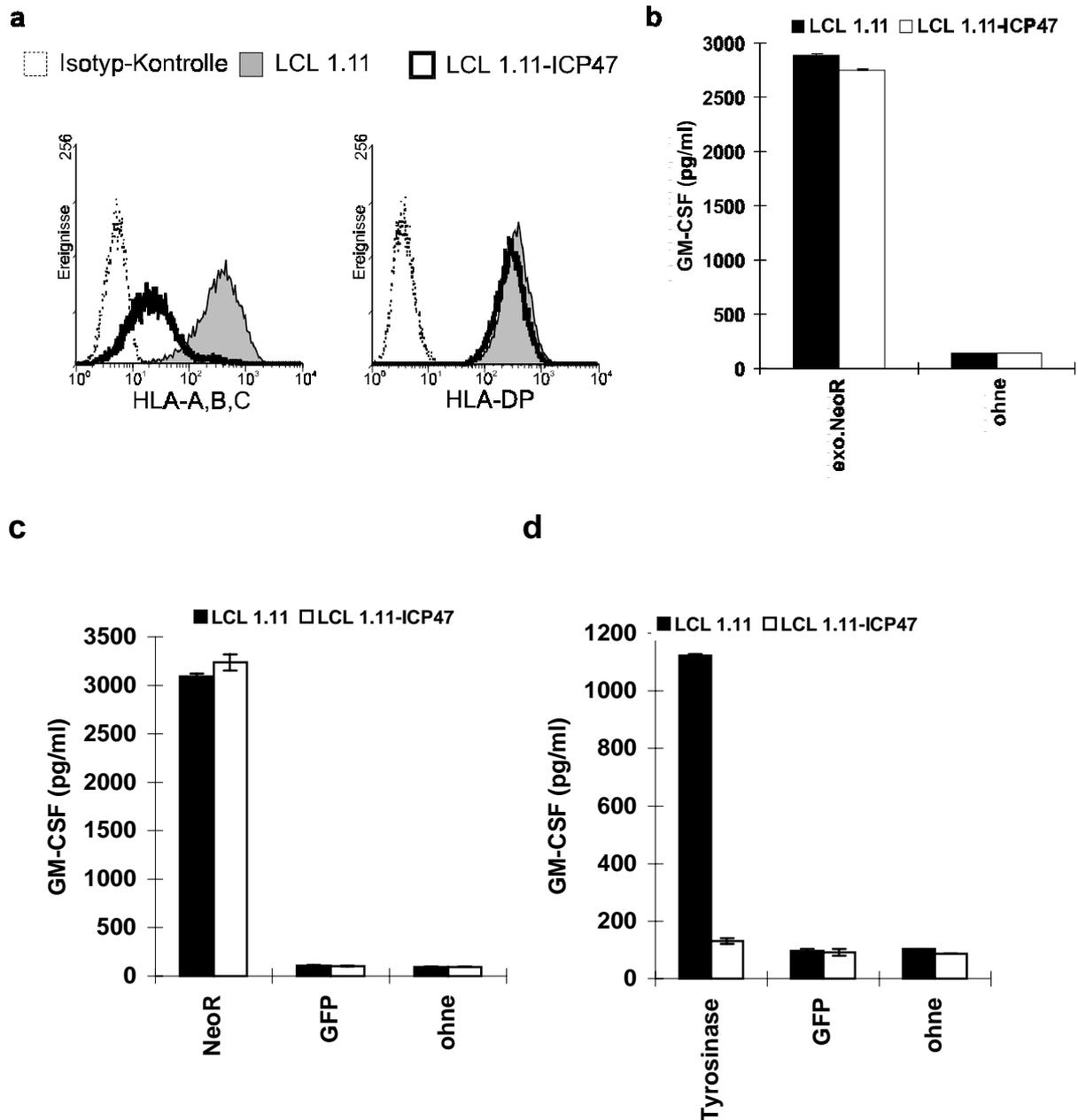
Spaltprodukte zytoplasmatischer Proteine werden durch den TAP-Transporter in das ER transportiert. Eine mögliche Prozessierung von NeoR durch bisher unbekannte Proteasen im Zytoplasma und die anschließende vorzeitige Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen im ER sollte demnach ebenfalls TAP-abhängig sein. Um dies zu untersuchen, wurde eine stabil transfizierte LCL 1.11-Zelllinie hergestellt, die konstitutiv das ICP47-Protein des Herpes Simplex Virus exprimiert. ICP47 bindet an den zytoplasmatischen Teil des TAP-Transporters und verhindert auf diese Weise den Peptidimport in das ER (Übersicht bei Yewdell und Bennink, 1999 a; Alcamí und Koszinowski, 2000). Die daraus resultierende mangelnde Peptidbeladung von MHC-Klasse-I-Molekülen im ER führt zu deren Instabilität, was sich in einer Reduktion der MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche ausdrückt (Übersicht bei Fruh et al., 1999).

Für dieses Experiment wurde der ICP47-ORF aus dem Vektor pKEX2XR-ICP47 (zur Verfügung gestellt von Prof. Rammensee) in den pINCO-Vektor kloniert (pINCO-ICP47) und LCL 1.11 damit stabil transfiziert. Wie in Abbildung 14 dargestellt, hatte die LCL 1.11-ICP47-Zelllinie im Vergleich zu LCL 1.11 eine stark reduzierte Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I, was ein Hinweis für die Funktionalität des eingebrachten Proteins ist. Dagegen blieben Eigenschaften wie exogene Antigenaufnahme, HLA-DP-Expression auf der Zelloberfläche und Transfizierbarkeit (40-50%) unverändert (Abb. 14 und nicht gezeigt).

Die Wirksamkeit der Inhibition des TAP-Transporters durch ICP47 wurde mittels der Transfektion eines Tyrosinase-Expressionskonstruktes überprüft. Während die MHC-Klasse-I-restringierte Präsentation dieses Antigens nahezu komplett unterbunden war, hatte die Inaktivierung von TAP keinen Effekt auf die MHC-Klasse-II-restringierte endogene Präsentation von NeoR (Abb. 14c). Eine NeoR-Peptidherstellung im Zytoplasma, gefolgt von einem Import in das endoplasmatische Retikulum über den TAP-Transporter, konnte somit ausgeschlossen werden.

### **4.3.3 Die Beladung von HLA-DP mit NeoR-Peptiden findet nicht im endoplasmatischen Retikulum statt**

Sollte es durch bisher unbekannte Prozesse zu einem TAP-unabhängigen Peptidimport und einer vorzeitigen Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen mit NeoR-Peptiden im ER kommen, so ließe sich dies durch Experimente mit Brefeldin A nachweisen.



### Abbildung 14: Der endogene MHC-Klasse-II-Präsentationsweg von NeoR ist unabhängig von TAP

Dargestellt sind vergleichende Studien mit der LCL 1.11 und der LCL 1.11-ICP47-Zelllinie.

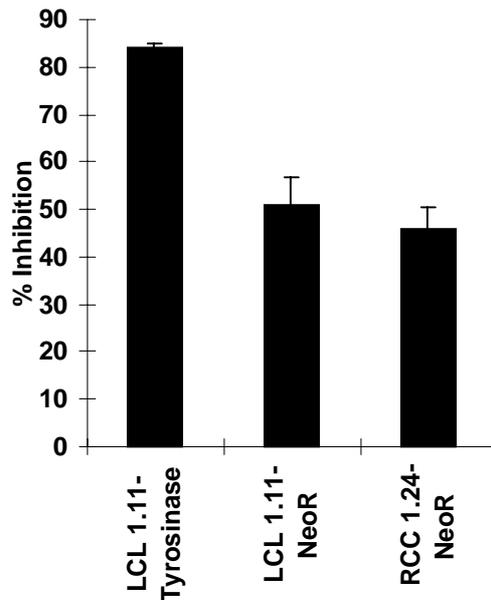
- Gezeigt ist eine FACS™-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I und HLA-DP.
- LCL 1.11, bzw. LCL 1.11-ICP47-Zellen wurden für 24 Stunden mit 15 ng/ml exogenem NeoR-Protein (exo. NeoR) inkubiert, mehrmals gewaschen und anschließend mit dem T-Zellklon 20-4/A4 kokultiviert. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Zugabe von NeoR-Protein mitgeführt (ohne).
- LCL 1.11, bzw. LCL 1.11-ICP47-Zellen wurden mit pINCO-NeoR (NeoR), pINCO-GFP (GFP) oder ohne Vektor (ohne) transfiziert und nach 48 Stunden mit dem T-Zellklon 20-4/A4 kokultiviert.
- Wie c), nur daß anstelle des pINCO-NeoR-Vektors pINCO-Tyrosinase (Tyrosinase) transfiziert wurde. Die Messung der GM-CSF Konzentration (b-d) erfolgte mit einem GM-CSF ELISA. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz enthielten die Ansätze pINCO-NeoR und pINCO-Tyrosinase zusätzlich je 5 µg pINCO-GFP-Plasmid.

Dieser Inhibitor blockiert den anterograden Transport von Vesikeln zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat und zusätzlich zwischen späten Endosomen und Lysosomen (Lippincott-Schwartz et al., 1991; Wood et al., 1991; Übersicht bei Chardin und McCormick, 1999). Dies hat zur Folge, daß neu-beladene MHC-Klasse-I-Moleküle nicht mehr zur Zelloberfläche transportiert werden können, wodurch die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation komplett inhibiert wird.

Obwohl Brefeldin A auch den Export neu-synthetisierter MHC-Klasse-II-Moleküle aus dem ER unterbindet, stehen durch den Recycling-Weg weiterhin beladbare MHC-Moleküle zur Verfügung. Dagegen kann die Inhibition des Endosomen/Lysosomen Überganges je nach Prozessierungsort des Antigens unterschiedliche Auswirkungen haben. Findet die Antigenprozessierung in frühen Endosomen statt, kommt es zu keiner Inhibition der Präsentation durch Brefeldin A. Im Gegensatz dazu würde eine ausschließliche Prozessierung in Lysosomen komplett inhibiert werden. Da die Degradation von Antigenen aber nicht ausschließlich in Lysosomen, sondern bereits in späten Endosomen abläuft (Abb. 4), ist nur eine partielle Inhibition zu erwarten. Eine starke Inhibition der Antigenpräsentation wird demzufolge als Hinweis für eine MHC-Klasse-I-ähnliche Beladung im ER, keine oder eine partielle Inhibition als eine MHC-Klasse-II ähnliche Beladung im endosomalen System interpretiert (Nuchtern et al., 1990; Jaraquemada et al., 1990).

Diese Unterschiede können am besten durch eine parallele Brefeldin A Inkubation von Zellen, die ein Antigen im Kontext von MHC-Klasse-I, bzw. MHC-Klasse-II präsentieren, erkannt werden. Deshalb wurden LCL 1.11-Zellen mit pINCO-NeoR, bzw. pINCO-Tyrosinase transfiziert und anschließend mit Brefeldin A inkubiert. Während die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation des Tyrosinase-Peptides fast komplett (ca. 90%) inhibiert wurde, war die MHC-Klasse-II-restringierte Präsentation des NeoR-Peptides nur partiell (ca. 50%) gehemmt (Abb. 15). In gleicher Weise ließ sich auch die NeoR-Präsentation in RCC 1.24-NeoR nur um ca. 50% verringern.

Diese Ergebnisse sprechen gegen eine MHC-Klasse-I-ähnliche Peptidbeladung im ER. Die Unabhängigkeit von zytoplasmatischer Prozessierung, TAP-Transporter und Beladung im ER bei gleichzeitiger partieller Sensitivität gegenüber Brefeldin A sind Hinweise für eine Beteiligung später endosomaler/lysosomaler Strukturen an der endogenen Präsentation von NeoR auf MHC-Klasse-II.



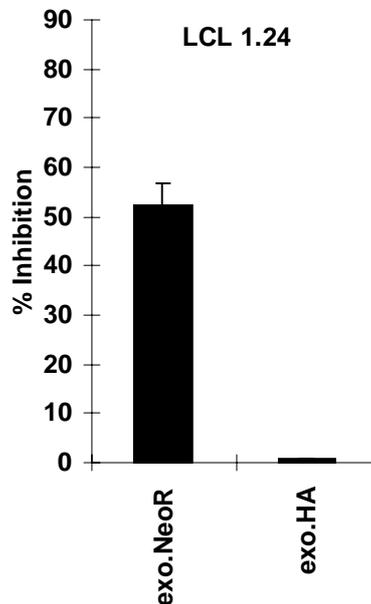
**Abbildung 15: Die Beladung von HLA-DP mit NeoR-Peptiden findet nicht im ER statt**

LCL 1.11 wurden mit pINCO-Tyrosinase, bzw. pINCO-NeoR transfiziert und für 18 h mit 1 µg/ml Brefeldin A inkubiert. RCC 1.24-NeoR wurde für 48 h mit 50 U/ml IFN $\gamma$  und für die letzten 18 h zusätzlich mit 1 µg/ml Brefeldin A inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und für 20 h mit dem T-Zellklon 20-4/A4 kokultiviert. Die freigesetzte GM-CSF Menge wurde mittels eines GM-CSF ELISA bestimmt. Die Berechnung der Inhibition wurde folgendermaßen durchgeführt:  $(1 - \text{GM-CSF Konzentration mit Brefeldin A} / \text{GM-CSF Konzentration ohne Brefeldin A}) \times 100$ .

#### **4.3.4 Späte endosomale/lysosomale Kompartimente sind an der Präsentation von endogenem und exogenem NeoR beteiligt**

Eine Abhängigkeit der endogenen NeoR-Präsentation von späten endosomalen/lysosomalen Kompartimenten würde bedeuten, daß sich der endogene und exogene Präsentationsweg im endosomalen System überschneiden. In diesem Fall sollte die Präsentation von exogen zugeführtem NeoR in ähnlicher Weise durch Brefeldin A inhibiert werden. Für dieses Experiment wurde die LCL 1.24-Zelllinie verwendet, da sie das notwendige Restriktionselement (HLA-DR1) für die Präsentation eines Hämagglutinin-Peptides trägt. Die Prozessierung von Hämagglutinin und Beladung auf MHC-Klasse-II-Moleküle findet in frühen endosomalen Vesikeln statt und wird nicht durch Brefeldin A beeinflusst (Pinet et al., 1998). Somit bietet sich dieses Protein als funktionelle Kontrolle auf zytotoxische Nebeneffekte von Brefeldin A an. Hierfür wurden LCL 1.24-Zellen in Gegenwart, bzw. Abwesenheit von 1 µg/ml Brefeldin A mit exogenem NeoR, bzw. Hämagglutinin für 18 h inkubiert.

Es konnte gezeigt werden, daß Brefeldin A die exogene NeoR-Präsentation um ca. 50% inhibiert, nicht aber die von Hämagglutinin (Abb. 16). Die spezifische partielle Inhibition der endogenen und exogenen NeoR-Präsentation spricht für eine Beteiligung endosomaler/lysosomaler Kompartimente an beiden Präsentationswegen.



**Abbildung 16: Einfluß von Brefeldin A auf die Präsentation von exogenem NeoR**

LCL 1.24 wurde in Gegenwart, bzw. Abwesenheit von 1 µg/ml Brefeldin A mit exogenem NeoR-Protein (exo.NeoR), bzw. Hämagglutinin (exo.HA) für 18 h inkubiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen für 20 h mit dem NeoR-spezifischen T-Zellklon 20-4/A4, bzw. dem Hämagglutinin-spezifischen T-Zellklon Clone1 kokultiviert und die sekretierte GM-CSF Menge mittels ELISA bestimmt. Die Berechnung der Inhibition in Prozent wurde folgendermaßen durchgeführt:  $(1 - \text{GM-CSF Konzentration mit Brefeldin A} / \text{GM-CSF Konzentration ohne Brefeldin A}) \times 100$ .

#### 4.3.5 Die Prozessierung von NeoR ist abhängig von endosomalen/lysosomalen Proteasen

Auf der Basis dieser Ergebnisse sollte ermittelt werden, ob sich die vermutete Prozessierung in späten Endosomen, bzw. Lysosomen durch Inhibition der in diesem Kompartiment vorkommenden Proteasen verifizieren läßt. Für diese Experimente wurden drei Inhibitoren verwendet, die mit verschiedenen proteolytischen Prozessen im endosomalen/lysosomalen System interferieren:

- 1) Chloroquin: Inhibition der Ansäuerung der endosomalen/lysosomalen Vesikel und somit der säureabhängigen Aktivierung der darin enthaltenen Proteasen.
- 2) Leupeptin: Inhibition der Familie der Cystein Proteasen (z.B. Cathepsin B)
- 3) Pepstatin A: Inhibition der Familie der Aspartat Proteasen (z.B. Cathepsin D)

Die Inkubation von transfizierten LCL 1.11, bzw. RCC 1.24-NeoR mit den Inhibitoren ergab, daß sowohl Chloroquin als auch Leupeptin die MHC-Klasse-II-restringierte Präsentation von NeoR verhindern (Abb. 17a, b). Im Gegensatz dazu hatte eine Inhibition der Familie der Aspartat-Proteasen durch Pepstatin A keinen Einfluß auf die Präsentation. Als Spezifitätskontrolle wurden LCL 1.11-Zellen verwendet, die mit dem Tyrosinase-Expressionskonstrukt transfiziert worden waren. Da die MHC-Klasse-I-restringierte Präsentation von Tyrosinase-Peptiden unabhängig von Proteasen des endosomalen Systems erfolgt, hatte erwartungsgemäß keiner der Inhibitoren einen Einfluß auf die Präsentation. Dadurch kam unspezifische Zytotoxizität der Inhibitoren als Ursache für die Blockade der NeoR-Antigenpräsentation nicht in Frage.

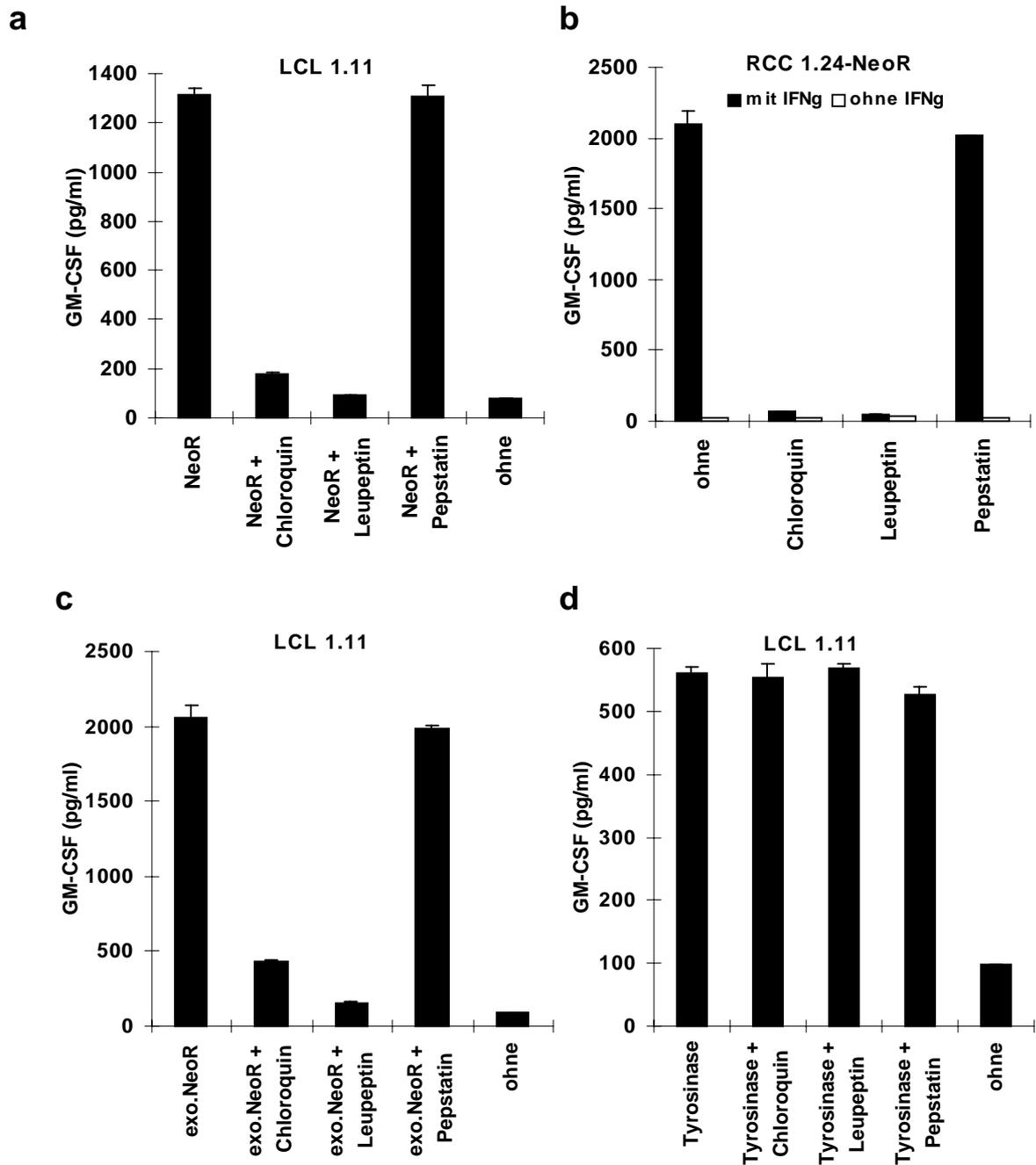
Um auszuschließen, daß der Effekt der Inhibitoren in den RCC 1.24-NeoR-Zellen durch Nebeneffekte auf die Reifung von neu-synthetisierten MHC-Klasse-II-Heterodimeren zustande kommt, wurden die mit Inhibitoren behandelten Zellen mittels FACST<sup>TM</sup>-Analyse auf Expression von MHC-II und HLA-DP untersucht. Keine der Substanzen wirkte sich negativ auf die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen aus (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse mit Brefeldin A ließen vermuten, daß die endogene und die exogene Präsentation in ähnlichen Kompartimenten stattfindet. Deshalb wurde untersucht, ob auch die exogene Präsentation von NeoR abhängig von Vesikelansäuerung (Chloroquin) und Cystein-Proteasen (Leupeptin) ist (Abb. 17c).

Hierfür wurden LCL 1.11-Zellen in Anwesenheit der Inhibitoren mit exogenem NeoR (30 ng/ml) inkubiert. Da auch dieser Präsentationsweg fast vollständig von Chloroquin und Leupeptin inhibiert wurde (Abb. 17c), überschneiden sich der endogene und exogene MHC-Klasse-II-Präsentationsweg für NeoR im endosomalen System.

#### **4.4 NeoR-GFP-Anreicherung in Kern-nahen Vesikeln unter Chloroquin- und Leupeptin-Behandlung**

Zusätzlich zu diesen Ergebnissen deuteten auch Daten mit RCC-Zellen, die mit dem NeoR-GFP-Fusionsprotein transfiziert worden waren, auf eine Beteiligung vesikulärer Strukturen an der Antigenprozessierung hin. Unbehandelt zeigen diese Zellen eine homogene Verteilung des NeoR-Proteins im Zytoplasma und Zellkern.



**Abbildung 17: Die Präsentation von NeoR ist abhängig von Proteasen des endosomalen/lysosomalen Systems**

Dargestellt sind Antigenpräsentationsstudien mit LCL 1.11 (a, c, d) und RCC 1.24-NeoR (b). LCL 1.11 wurde entweder mit pINCO-NeoR (a), bzw. mit pINCO-Tyrosinase (d) transfiziert oder mit exogenem NeoR-Protein (exo-NeoR) inkubiert (c). Um die Abhängigkeit von endosomaler Proteolyse zu ermitteln, wurde ein Teil der Zellen mit Chloroquin (100  $\mu$ M), Leupeptin (200  $\mu$ g/ml) oder Pepstatin A (50  $\mu$ g/ml) inkubiert. Anschließend wurden alle Ansätze fixiert und mit dem T-Zellklon 20-4/A4 (a, b, c), bzw. dem Tyrosinase-spezifischen T-Zellklon (d) kokultiviert. In a, c und d wurden untransfizierte LCL 1.11 (ohne) als Negativkontrolle mitgeführt. RCC 1.24-NeoR (b) wurden mit IFN $\gamma$  induziert, in Gegenwart, bzw. Abwesenheit (ohne) der angegebenen Inhibitoren kultiviert und anschließend wie für LCL 1.11 beschrieben behandelt. Als Kontrolle wurden RCC 1.24-NeoR verwendet, die nicht mit IFN $\gamma$  zur Expression von MHC-Klasse-II induziert worden waren. Die GM-CSF Konzentration im Kulturüberstand wurde mit einem GM-CSF ELISA ermittelt.

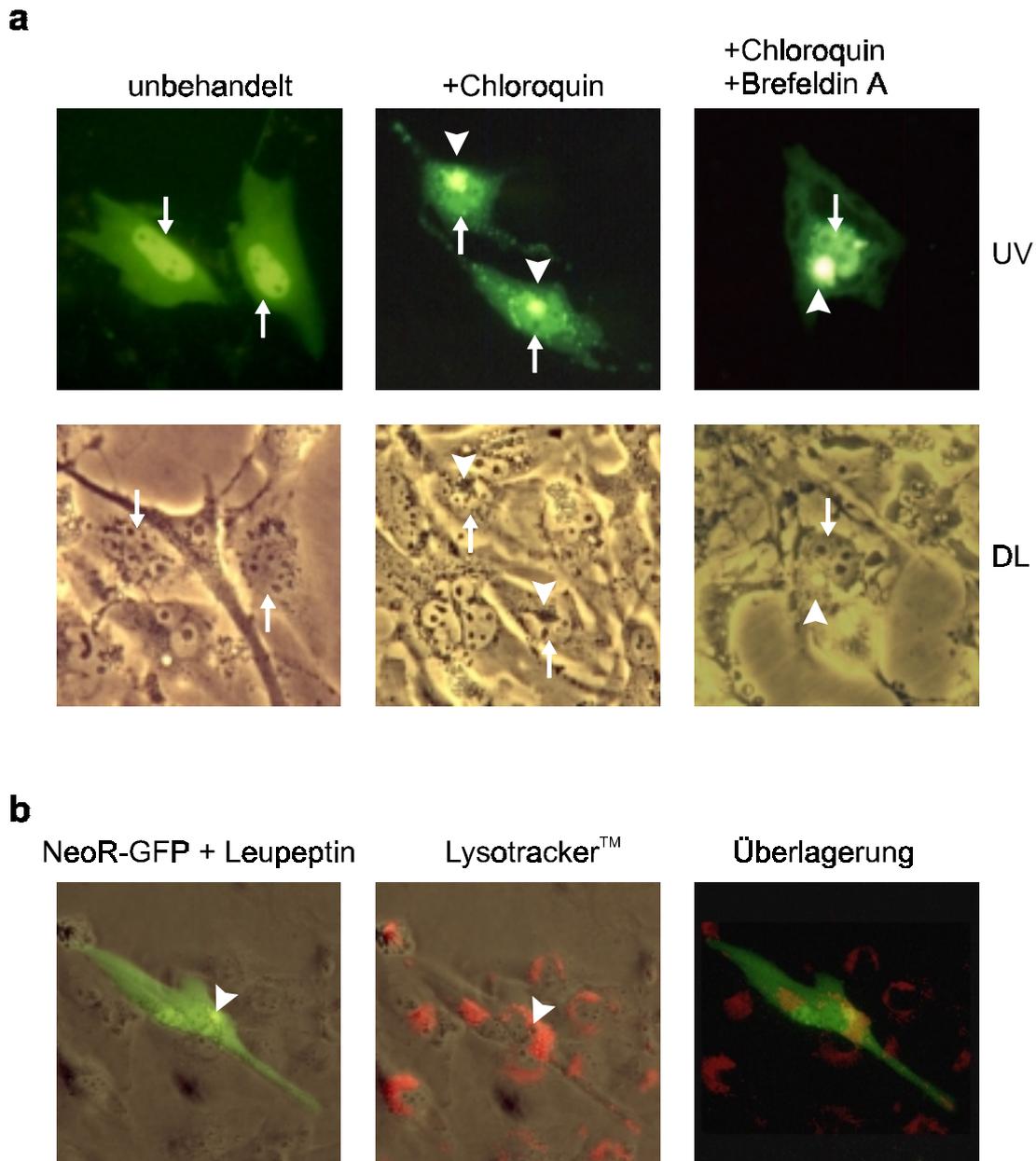
Wurden die Zellen jedoch mit Chloroquin oder Leupeptin behandelt, konnte eine Anreicherung des Fusionsproteins in Vesikeln beobachtet werden, die vor allem im Kern-nahen Bereich gehäuft vorlagen (Abb. 18a). Diese Anreicherung erfolgte auch in Gegenwart des Inhibitors Brefeldin A, was in Übereinstimmung mit den Daten aus den Antigenpräsentationsstudien für einen ER/Golgi-unabhängigen Eintrittsweg in diese Vesikel spricht. Außerdem schien das Protein intakt in diese Kompartimente zu gelangen, weshalb auch diese Daten auf eine Unabhängigkeit von zytosolischer Prozessierung hinweisen. Versuche diese Vesikel durch Anfärbung mit Antikörpern gegen bekannte Marker des endosomalen/lysosomalen Systems, wie Lamp1 und Rab5 zu charakterisieren, ergaben keine eindeutigen Übereinstimmungen (nicht gezeigt). Die Lokalisation von Proteinen in diesen nur vage definierten subzellulären Strukturen, wurde von verschiedenen Autoren beobachtet (Wang et al., 1999; Turley et al., 2000) und mit MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationswegen in Verbindung gebracht.

Um einen Eindruck des Ansäuerungsgrades dieser Vesikel zu erhalten, wurden die NeoR-GFP-transfizierten und Leupeptin-behandelten Zellen zusätzlich mit dem Farbstoff Lyso-traker™ inkubiert, der sich in sauren Vesikeln anreichert. Die Überlagerung der gefärbten Strukturen zeigte, daß diese Kern-nahen Vesikel nur einen neutralen oder schwach sauren pH-Wert aufweisen (Abb. 18b).

Eine genauere Identifikation der Vesikel war mit diesen Methoden nicht möglich, weshalb im Folgenden versucht werden sollte, die beteiligten subzellulären Kompartimente durch zellbiologische und biochemische Methoden zu identifizieren.

### **4.5 NeoR-Nachweis im endosomalen/lysosomalen System**

Auf Grundlage der vorangegangenen Daten konnte vermutet werden, daß NeoR intakt in das endosomale System gelangt. Deshalb sollte überprüft werden, ob NeoR in Endosomen, bzw. Lysosomen detektiert werden kann. Hierfür sollten in einem ersten Schritt die Vesikel des endosomalen/lysosomalen Systems als Gemisch aufgereinigt werden (Grobaufräumung), um eine generelle Aussage über An-, oder Abwesenheit des Proteins machen zu können. Sofern sich NeoR in diesem Gemisch darstellen ließ, sollten genauere Aussagen über die Verteilung in diesen Vesikeln durch weitergehende Aufreinigerungsverfahren (Feinfraktionierung) gemacht werden.



**Abbildung 18: Anreicherung von NeoR-GFP in Kern-nahen Vesikeln**

Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von RCC 1.24-Zellen 48 h nach Transfektion mit pINCO-NeoR-GFP.

a) Die Zellen blieben unbehandelt oder wurden für 20 Stunden mit Chloroquin (100  $\mu$ M), bzw. Chloroquin und Brefeldin A (1  $\mu$ g/ml) inkubiert. Danach wurden die Zellen unter ultraviolettem Licht (UV) oder Tageslicht (DL) fotografiert.

b) Die Zellen wurden für 24 Stunden mit Leupeptin behandelt und abschließend für 1 Stunde mit Lysotracker™ inkubiert. Die Aufnahmen der grünen Fluoreszenz, bzw. der roten Fluoreszenz erfolgte mit Filtersätzen verschiedener Wellenlänge. Die Überlagerung der Tageslicht/UV-, bzw. der UV-Aufnahmen wurde mit dem Adobe Photoshop™ Programm durchgeführt.

Gezeigt sind repräsentative Bildausschnitte. Die Experimente wurden fünfmal mit inhaltlich identischen Ergebnissen wiederholt.

#### 4.5.1 Grobaufreinigung der Endosomen und Lysosomen

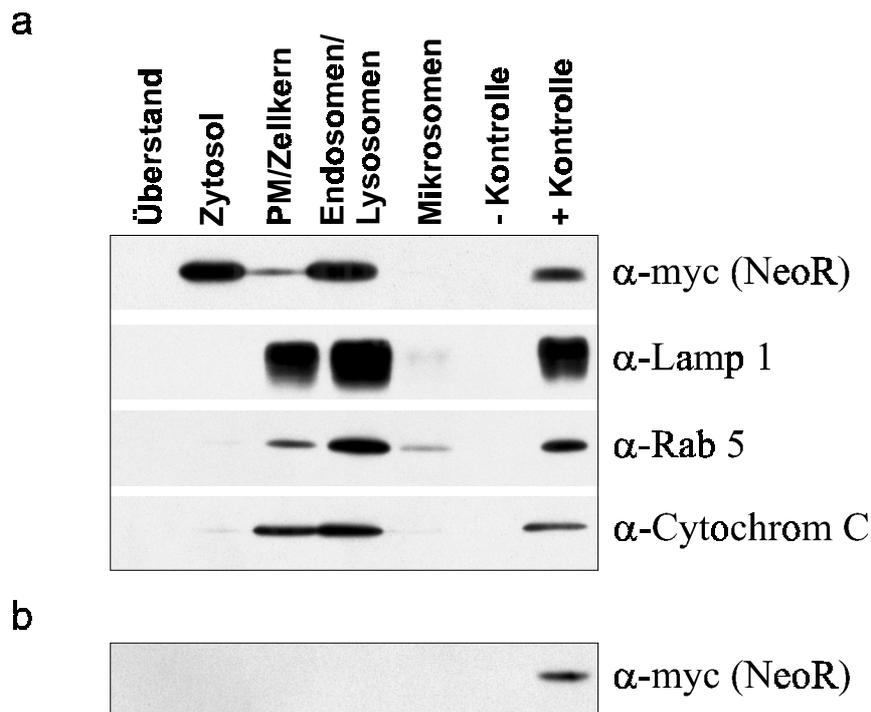
In der Literatur sind mehrere Methoden zur Aufreinigung dieser Kompartimente beschrieben. In unserem Fall wurde nach dem Protokoll von Schroter vorgegangen (Schroter et al., 1999), das speziell für B-Zellen und Nierenzellkarzinom-Zellen optimiert worden war.

Die Grundlage dieser Methode ist die Aufreinigung der Endosomen und Lysosomen durch differentielle Zentrifugation. Etwa  $5 \times 10^8$  Zellen wurden mehrmals gewaschen und nach Aufnahme in Fraktionierungspuffer in einem Homogenisator („Douncer“) aufgeschlossen. Nachdem intakte Zellen und Zelltrümmer entfernt worden waren, wurden Zellkerne/Plasmamembran, Endosomen/Lysosomen und Mikrosomen durch Zentrifugation bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten isoliert. Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde als Zytosol definiert.

Da das Expressionsniveau des NeoR-Proteins in LCL- und RCC 1.24-NeoR-Zellen sehr niedrig war, wurde für diese Studien die embryonale Nierenzelllinie 293T herangezogen. 293T-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Transfizierbarkeit (>90%) aus, was den Nachweis des Proteins nach transienter Transfektion erleichtert.

293T-Zellen wurden mit dem pINCO-NeoR-Vektor transfiziert, über 4 Tage unter Selektion mit Puromycin expandiert und anschließend die verschiedenen Zellkompartimente isoliert. Die Qualität der Zellfraktionierung wurde durch den Nachweis Kompartiment-spezifischer Proteine verifiziert (Abb. 19). Das Lamp1-Protein konnte sowohl in Endosomen/Lysosomen als auch in größerer Menge in der Plasmamembran/Zellkern-Fraktion detektiert werden. Es ist bekannt, daß Zellen Lamp1 auf der Zelloberfläche tragen können, wodurch das Signal in dieser Fraktion zu erklären ist. Als weitere interne Kontrolle für die Aufreinigung wurden Mitochondrien mit einem Antikörper gegen Cytochrom C nachgewiesen.

NeoR konnte in der Zytosol-, Plasmamembran/Kern- und auch in der Endosomen/Lysosomen-Fraktion nachgewiesen werden, nicht jedoch in Mikrosomen oder im Kulturüberstand. Zum Ausschluß der Möglichkeit, daß sich im Kulturüberstand vorhandene minimale NeoR-Konzentrationen in Endosomen und Lysosomen über die Kultur hinweg anreichern, wurde Überstand einer stabil transfizierten 293T-NeoR-Zelllinie auf untransfizierte Zellen überführt. Nach 52 h erfolgte die Präparation der Kompartimente und der Nachweis des Proteins im Western-Transfer-Experiment.



**Abbildung 19: NeoR-Protein Nachweis in der Endosomen/Lysosomen-Fraktion von 293T-Zellen**

Gezeigt sind Western-Transfer-Experimente mit subzellulären Kompartimenten von pINCO-NeoR-transfizierten 293T-Zellen.

- a) Für den Nachweis des NeoR-Proteins in den verschiedenen Kompartimenten wurden 293T-Zellen durch differentielle Zentrifugation in Zytosol-, Plasmamembran (PM)/Zellkern-, Endosomen/Lysosomen- und Mikrosomen-Fraktionen aufgetrennt. Danach wurden gleiche Proteinmengen dieser Kompartimente durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit einem gegen das myc-Epitop des NeoR-Proteins gerichteten Antikörper (9E10). Zusätzlich wurden die in den Fraktionen enthaltenen Kompartimente durch den Nachweis charakteristischer Proteine (Lamp1: späte Endosomen und Lysosomen; Rab5: frühe Endosomen; Cytochrom C: Mitochondrien) identifiziert.
- b) Um zu kontrollieren, ob sich eventuell im Kulturüberstand vorhandenes NeoR in Endosomen und Lysosomen anreichern kann, wurden untransfizierte 293T-Zellen für 52 Stunden mit Überstand einer stabil transfizierten 293T-NeoR-Zelllinie inkubiert. Die Isolierung der Kompartimente und der Nachweis des Proteins erfolgte wie unter a) beschrieben.

Als Negativkontrolle (-Kontrolle) wurde Totallysat von MDCK-Zellen verwendet, als Positivkontrollen (+Kontrolle) vom Hersteller des Antikörpers zur Verfügung gestellte Proteinextrakte.

Auch nach sehr langer Exposition konnte kein Signal für das NeoR-Protein erhalten werden, wodurch sichergestellt wurde, daß das Protein auch in diesen Zellen nicht über Sekretion und Endozytose in das endosomale System gelangt (Abb. 19b).

#### 4.5.2 Feinfraktionierung des endosomalen/lysosomalen Systems

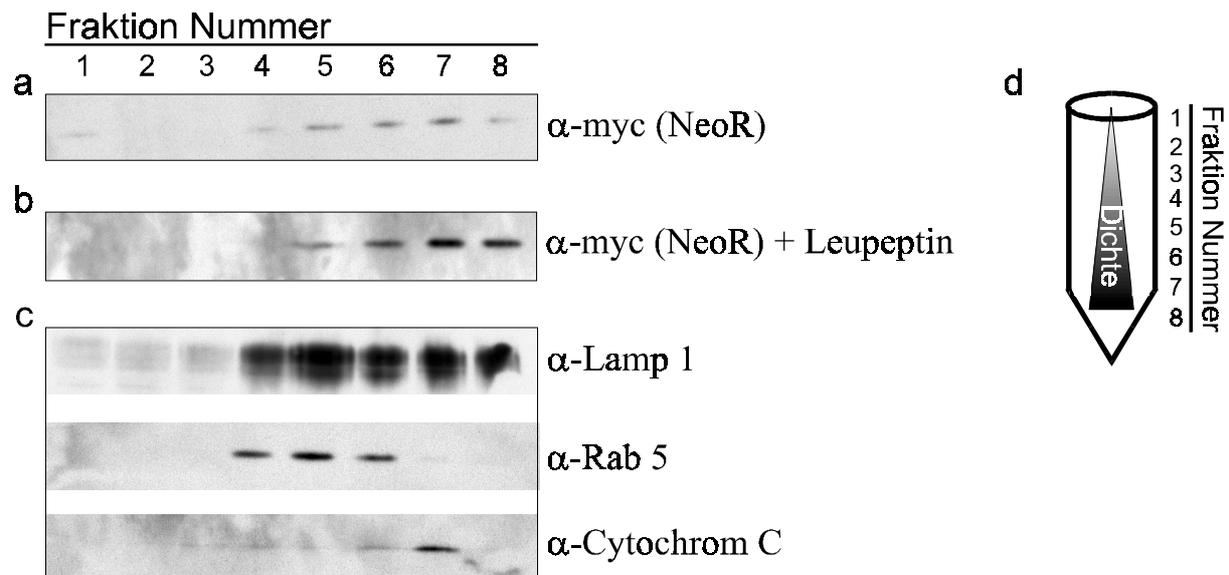
Da NeoR gut in der Endosomen/Lysosomen-Fraktion nachgewiesen werden konnte, sollte genauer bestimmt werden, in welchen Vesikeln sich das NeoR-Protein befindet. Hierfür war eine weitergehende Auftrennung der oben beschriebenen Fraktion notwendig.

Eine oft verwendete Methode für die Auftrennung dieser Vesikel ist die Percoll-Dichtegradientenzentrifugation (Übersicht bei Pertoft, 2000), da sie eine hohe Ausbeute an intakten Kompartimenten erlaubt (Neat et al., 1981; Pertoft et al., 1978). Die Auftrennung erfolgt entlang eines Dichtegradienten, der sich im Laufe der Zentrifugation einstellt. Während sich Vesikel mit hoher Dichte (Lysosomen) nach der Zentrifugation in den unteren Bereichen des Gradienten sammeln, bleiben Vesikel mit geringer Dichte und in Lösung befindliche Proteine in den oberen Schichten.

Nach Isolation der Endosomen/Lysosomen-Fraktion wurde diese gewaschen, erneut sedimentiert, vorsichtig resuspendiert und über eine 27%-ige Percoll-Lösung geschichtet. Im Anschluß an eine Zentrifugation bei 22000 U/min für 60 Minuten wurde der Gradient in 8 Proben (beginnend von oben) aufgeteilt (Abb. 20d). Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde bestimmt und jeweils gleiche Proteinmengen durch SDS-PAGE und anschließenden Western-Transfer auf Anwesenheit des NeoR-Proteins untersucht.

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wurde auch in diesen Fraktionen die Lokalisation der Endosomen und Lysosomen durch Identifikation Kompartiment-spezifischer Proteine nachgewiesen. Es zeigte sich, daß die Fraktionen 4-6 positiv für den frühen endosomalen Marker Rab5 sind und die Fraktionen 4-8 den späten endosomalen und lysosomalen Marker Lamp1 enthalten. Obwohl frühe und späte endosomale Vesikel aufgrund ähnlicher Dichten nur schlecht zu separieren sind, konnte in dieser Aufarbeitung klar zwischen Endosomen und Lysosomen unterschieden werden. Erstere befanden sich in den Fraktionen 4-6, die letzteren in den Fraktionen 7 und 8 des Gradienten. Die in dieser Mischfraktion vorhandenen Mitochondrien wurden entsprechend ihrer hohen Dichte in den unteren Bereichen des Gradienten gefunden (Fraktion 7).

Das NeoR-Protein konnte sowohl in endosomalen als auch in lysosomalen Fraktionen nachgewiesen werden (Abb. 20a; Fraktionen 4-8). Die Intensität der Banden war schwach und nahm vor allem in den lysosomalen Fraktionen stark ab, was sich durch eine schnelle Degradation in diesen Vesikeln erklären ließe.



### Abbildung 20: Nachweis des NeoR-Proteins in endosomalen/lysosomalen Vesikeln

Dargestellt sind Western-Transfer-Experimente mit subzellulären Fraktionen aus 293T-Zellen, die mit pINCO-NeoR transfiziert und für 4 Tage unter Puromycin Selektion expandiert wurden. Die Endosomen/Lysosomen-Fraktion wurde durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation weiter aufgetrennt. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen geladen.

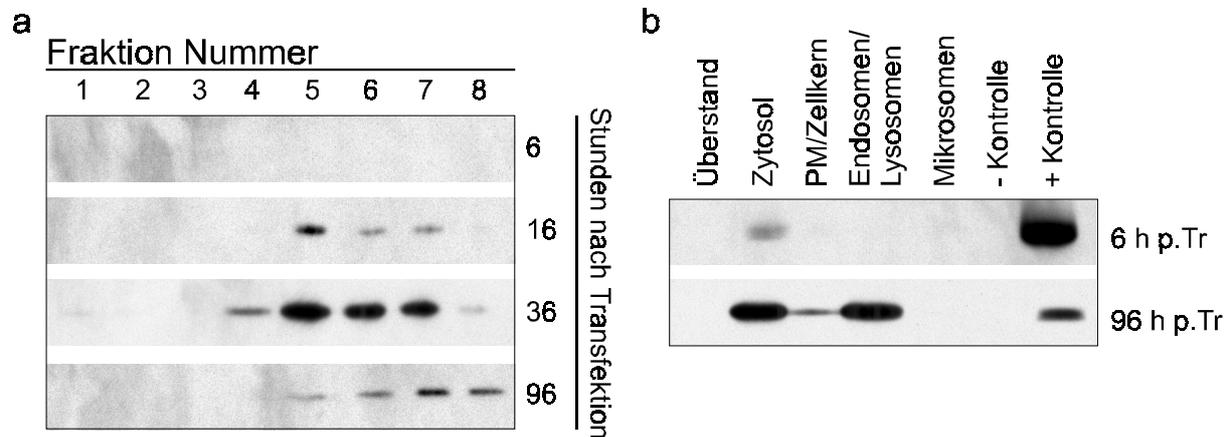
- Nachweis des NeoR-Proteins mit einem myc-Antikörper.
- Nachweis des NeoR-Proteins, wobei die 293T-NeoR-Zellen für 48 h in Gegenwart von 200  $\mu$ g/ml Leupeptin kultiviert worden waren.
- Charakterisierung der erhaltenen Fraktionen durch Nachweis Kompartiment-spezifischer Proteine (siehe auch Abbildung 19a).
- Schematische Darstellung des Percoll-Gradienten nach Zentrifugation, in dem die Dichte vertikal zunimmt. Die einzelnen Fraktionen (je 1 ml) wurden von oben beginnend geerntet.

Um zu prüfen, ob es sich tatsächlich um Degradation des Proteins handelt, wurde die Fraktionierung erneut in Gegenwart von Leupeptin im Zellkulturmedium (48 h) durchgeführt. Im Vergleich zu der Aufarbeitung ohne diesen Inhibitor zeigte sich eine Stabilisierung des Proteins insbesondere in den lysosomalen Fraktionen (Abb. 20b).

#### 4.5.3 Eintrittspunkt von NeoR in das endosomale/lysosomale System

Aus den bisherigen Experimenten konnten noch keine Rückschlüsse auf den Eintrittspunkt des NeoR-Proteins in das vesikuläre System gezogen werden. Da das Protein zum Zeitpunkt der Aufarbeitung sowohl in Endosomen als auch in Lysosomen nachgewiesen werden konnte, sollte bestimmt werden, in welchen Kompartimenten das Protein erstmalig auftritt. Hierfür wurden die endosomalen/lysosomalen Fraktionen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion der 293T-Zellen präpariert und über einen Percoll-Gradienten aufgereinigt.

Zu allen Ansätzen wurde unmittelbar nach der Transfektion Leupeptin zugegeben, um eine unterschiedlich starke Degradation in verschiedenen Vesikeln zu verhindern. Wie in Abbildung 21 gezeigt, konnte NeoR-Protein 6 Stunden nach Transfektion im Zytosol, nicht jedoch im endosomalen/lysosomalen System nachgewiesen werden.



**Abbildung 21: NeoR kann zuerst in Endosomen nachgewiesen werden**

Gezeigt sind Western-Transfer-Experimente mit Percoll-Fraktionierungen der Endosomen und Lysosomen (a), bzw. mit Fraktionierungen durch differentielle Zentrifugation (b) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion mit pINCO-NeoR. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen geladen. Der Nachweis des Proteins erfolgte mit einem myc (9E10)-Antikörper.

- a) Endosomen und Lysosomen von 293T-Zellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion fraktioniert worden waren, wurden über einen Percoll-Gradienten aufgetrennt. Zu allen Ansätzen wurde sofort nach Transfektion Leupeptin (200 µg/ml) zugesetzt.
- b) Dargestellt ist die Aufreinigung von 293T-Zellen mittels differentieller Zentrifugation zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (6 und 96 Stunden) nach Transfektion.

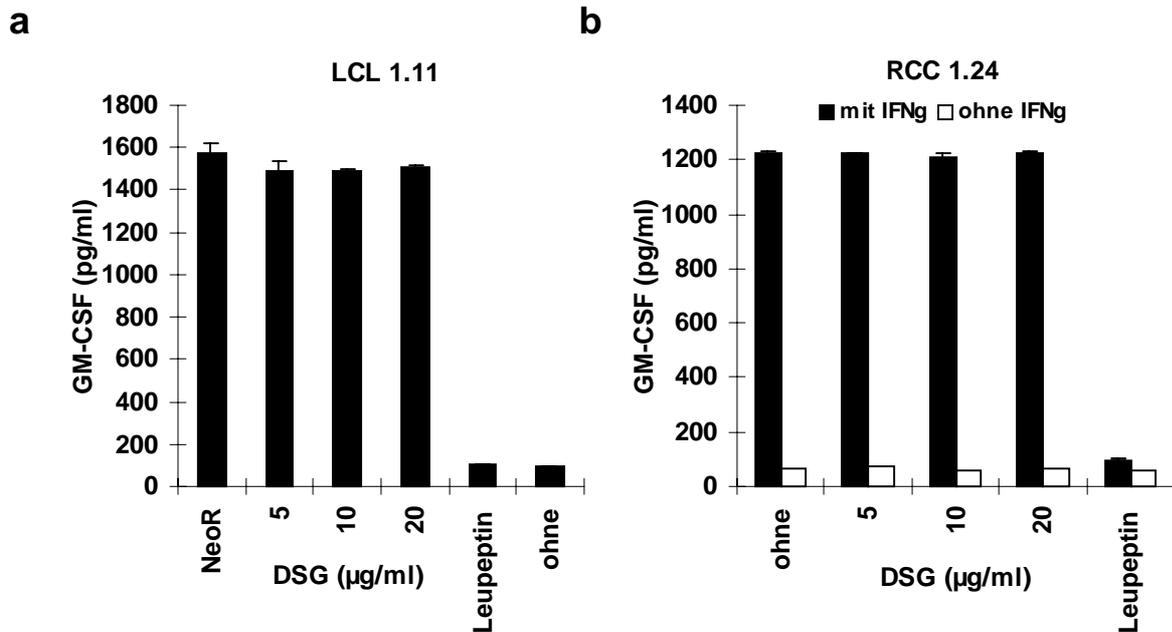
Im Zeitraum zwischen 16-36 Stunden war das Protein hauptsächlich in den endosomalen Fraktionen vertreten, während nach 96 Stunden auch die Lysosomen NeoR-Protein enthielten (Abb. 21a). In keinem der Experimente konnten Degradationsprodukte des NeoR-Proteins nachgewiesen werden, was entweder auf einen sehr raschen oder auf einen am C-Terminus des Proteins beginnenden Abbau schließen läßt, der das Antikörperepitop deletieren würde. Die Fraktionierungsexperimente deuteten auf einen Eintritt des NeoR-Proteins in vorwiegend endosomale Kompartimente und eine Degradation des Proteins entlang des Transports zu Lysosomen hin. Im Zusammenhang mit den bisher erhaltenen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um einen direkten Import des intakten Proteins aus dem Zytoplasma handeln muß.

#### **4.6 Hsc70-vermittelter Protein- und Peptidimport in Lysosomen ist nicht für die MHC-Klasse-II-restringierte Präsentation von NeoR verantwortlich**

Durch die vorangegangenen Experimente konnte klar gezeigt werden, daß die Präsentation des NeoR-Peptides unabhängig von Proteasom/TPP II-Aktivität und Peptidimport in das ER erfolgt. Dagegen sind endosomale Proteasen essentiell für die Präsentation des NeoR-Peptides auf MHC-Klasse-II. Zusätzlich konnte die Anwesenheit von NeoR in Endosomen und Lysosomen nachgewiesen werden. Es gibt Hinweise darauf, daß eine Familie von zytoplasmatischen Chaperonen, sogenannte Hitzeschockproteine, an entfaltete Proteine, bzw. Proteinfragmente binden können (Übersicht bei Hartl, 1996). Aus der Familie der Hitzeschockproteine wird insbesondere Hsc70 mit MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationswegen in Verbindung gebracht (Srivastava et al., 1994; Vanbuskirk et al., 1989; Panjwani et al., 1999). Deshalb sollte überprüft werden, ob Hsc70 an dem Import des NeoR-Proteins aus dem Zytoplasma in das endosomale/lysosomale System beteiligt ist. Hierfür stand die chemische Substanz 15-Deoxyspergualin (DSG) zur Verfügung, welche die Bindung von Peptiden an das Hitzeschockprotein Hsc70 verhindert (Nadler et al., 1992; Nadeau et al., 1994; Hoeger et al., 1994).

pINCO-NeoR-transfizierte LCL 1.11 und IFN $\gamma$ -induzierte RCC 1.24-NeoR-Zellen wurden mit verschiedenen DSG Konzentrationen inkubiert. Parallel dazu wurden die Zellen mit Leupeptin behandelt, um einen Vergleichswert für die Stärke der Inhibition zu erhalten. DSG hatte über den gesamten Konzentrationsbereich keinen Einfluß auf die Präsentation des NeoR-Peptides (Abb. 22), während Leupeptin die Präsentation inhibierte. Die gleichzeitige Anwesenheit von DSG im Kulturüberstand der RCC 1.24-NeoR-Zellen hatte keine Auswirkung auf die Induktion von MHC-Klasse-II-Molekülen durch IFN $\gamma$  (nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, daß Hsc70 nicht am Import des intakten NeoR-Proteins in das endosomale System beteiligt ist. Überdies kann ausgeschlossen werden, daß neben dem intakten Protein im Zytoplasma prozessierte Proteinfragmente von NeoR in Endosomen/Lysosomen transportiert werden.



**Abbildung 22: Einfluß von DSG auf die NeoR-Präsentation**

Gezeigt sind Antigenpräsentationsstudien mit LCL 1.11 (a) und RCC 1.24-NeoR-Zellen (b).

- a) LCL 1.11-Zellen wurden mit pINCO-NeoR transfiziert, mit verschiedenen Konzentrationen DSG und 200 µg/ml Leupeptin für 24 Stunden inkubiert (Panjwani et al., 1999), fixiert und anschließend für 20 Stunden mit dem T-Zellklon 20-4/A4 kokultiviert. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte LCL 1.11 (ohne).
- b) RCC 1.24-NeoR-Zellen wurden für 48 h mit 50 U/ml IFN $\gamma$  inkubiert. In den letzten 24 h wurde einem Teil der Zellen DSG in den angegebenen Konzentrationen, bzw. Leupeptin (200 µg/ml) zugesetzt. Nach Fixierung der Zellen erfolgte die Kokultivierung mit dem T-Zellklon (siehe a). Als Kontrolle wurden RCC 1.24-NeoR-Zellen verwendet, die nicht mit IFN $\gamma$  zur Expression von MHC-Klasse-II induziert worden waren.

Die im Kulturüberstand enthaltenen GM-CSF Konzentrationen wurden mit einem GM-CSF ELISA bestimmt.

#### 4.7 Die Rolle von Autophagie in der MHC-Klasse-II-restringierten Präsentation von NeoR

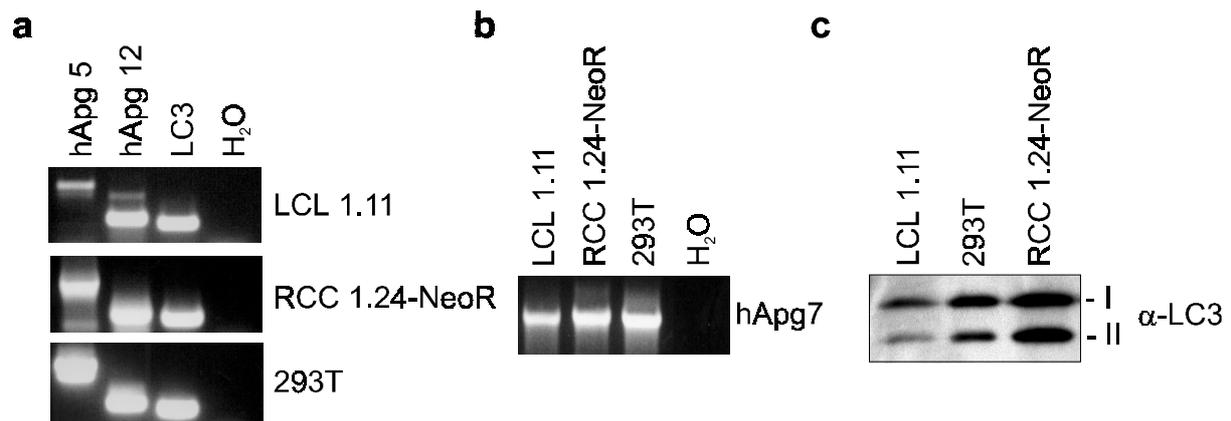
Eine weitere Möglichkeit für die Aufnahme von intakten Proteinen aus dem Zytoplasma in das endosomale System ist Autophagie. Bei diesem Prozeß kommt es zur Ausbildung einer Doppelmembran (Phagophore), die zytoplasmatische Proteine und ganze Organellen (z.B. Mitochondrien) einschließt (Übersicht bei Seglen und Bohley, 1992; Dunn, 1990; Teter und Klionsky, 2000). Die Autophagosomen genannten Vesikel können sowohl mit frühen, als auch mit späten endosomalen Strukturen verschmelzen (Gordon und Seglen, 1988; Liou et al., 1997; Berg et al., 1998), was zum Abbau des eingeschlossenen Materials durch endosomale/lysosomale Proteasen führt.

Autophagie ist neben der Proteasom-vermittelten Degradation der Hauptabbauweg für zytosolische Proteine. Die molekularen Grundlagen für diesen Vorgang wurden hauptsächlich in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* charakterisiert (Übersicht bei Ohsumi, 2001). Es ist noch unklar, inwieweit sich diese Befunde auf andere Organismen übertragen lassen. Die vorwiegend morphologischen Daten aus höheren Eukaryonten wurden vor allem mit Leberzellen der Ratte erhalten, in denen sich Autophagie stark induzieren läßt (Stromhaug et al., 1998). Neueste Publikationen lassen vermuten, daß zumindest die ersten Schritte in der Ausbildung der Autophagosomen bei Hefe und höheren Organismen ähnlich ablaufen, zumal viele der beteiligten Proteine zwischen Hefe und Mensch hoch konserviert sind (Mizushima et al., 1998; Kabeya et al., 2000; Mizushima et al., 2001). Ob diese Form des Proteinabbaus auch eine Rolle in der Antigenpräsentation spielt, ist bisher nicht erforscht.

### **4.7.1 Expression Autophagie-assoziiierter Proteine**

In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob Autophagie-assoziierte Proteine in den verwendeten Zelltypen vorliegen. Ein LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) genanntes Protein ist spezifisch mit Autophagosomen assoziiert. LC3 ist in einer Vorläuferform (LC3-I) im Zytoplasma lokalisiert und wird durch andere Proteine (hApg5, hApg7, hApg12) in eine reife Form (LC3-II) überführt, die an die Autophagosomen-Membran bindet (Mizushima et al., 1998; Kabeya et al., 2000; Übersicht bei Ohsumi, 2001). Die beiden Formen unterscheiden sich in ihrer Größe (LC3-I: ca. 18 kDa; LC3-II: ca. 16 kDa). Die Anwesenheit der prozessierten Form läßt Rückschlüsse auf aktive Autophagie zu.

Um zu prüfen, ob diese mit Autophagie in Verbindung gebrachten Proteine in den verwendeten Zellen vorliegen, wurde aus LCL 1.11-, RCC 1.24-NeoR- und 293T-Zellen RNA isoliert, in cDNA überführt und die Expression der verschiedenen mRNA Spezies mittels PCR analysiert (Abb. 23). In allen verwendeten Zelltypen konnten PCR-Produkte in der erwarteten Größe nachgewiesen werden (Abb. 23a, b). Um sicherzustellen, daß die erhaltenen PCR-Produkte spezifisch sind, wurden diese kloniert und die Identität durch Sequenzierung verifiziert (nicht gezeigt).



### Abbildung 23: Expression Autophagie-assoziiierter Proteine

Dargestellt sind RT-PCR (a, b) und Western-Transfer-Analysen (c).

Die Transkripte für hApg5 (857 bp), hApg12 (435 bp), LC3 (388 bp) und hApg7 (2115 bp) wurden durch PCR mit spezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen (a, b); als Kontrolle wurden alle Primer vereinigt und die PCR anstelle von cDNA mit Wasser (H<sub>2</sub>O) durchgeführt. Für den Nachweis des LC3-Proteins (c) wurden Proteinextrakte aus jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen hergestellt und auf einem 14% PAA-Gel aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion der verschiedenen LC3-Formen (LC3-I: 18 kDa; LC3-II: 16 kDa) mit einem LC3-Antikörper.

Der Nachweis der jeweiligen Proteine ist nur eingeschränkt möglich, da mit Ausnahme von LC3 keine Antikörper gegen die humanen Proteine vorhanden sind. Jedoch können über das Vorkommen der prozessierten Form von LC3 indirekt Rückschlüsse auf die Anwesenheit und Aktivität der anderen Proteine gezogen werden. Deshalb wurden Lysate der verschiedenen Zelllinien durch Western-Transfer-Analyse auf Anwesenheit der Autophagosom-assoziierten Variante von LC3 untersucht (LC3-Antikörper zur Verfügung gestellt von Prof. Yoshimori). In allen Zellen konnte die aktivierte Form von LC3 (LC3-II) identifiziert werden (Abb. 23c), was ein starker Hinweis dafür ist, daß in den verwendeten Zelltypen Autophagie-vermittelte Degradationsprozesse ablaufen.

#### 4.7.2 NeoR wird durch Inhibition der Autophagie stabilisiert

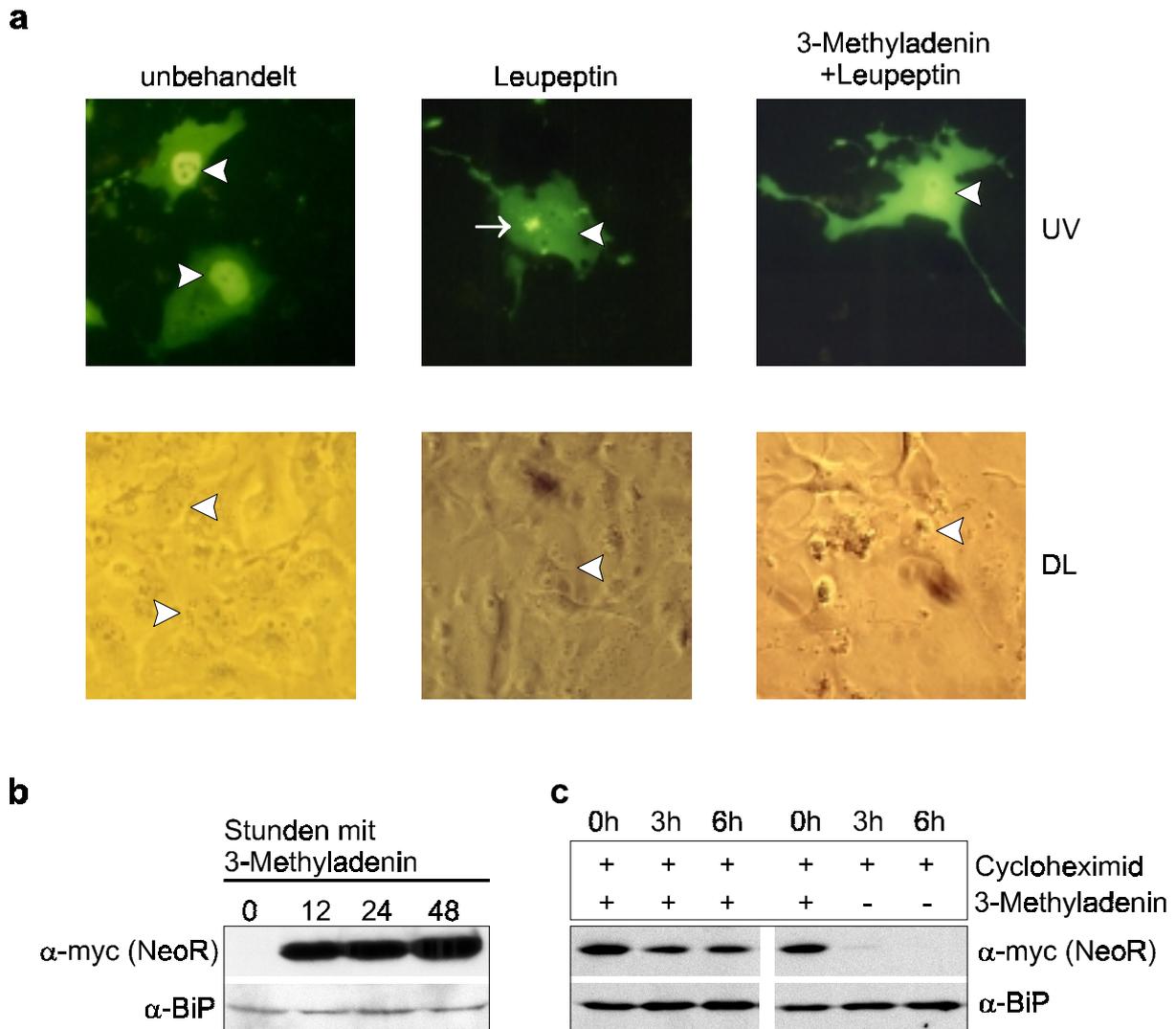
Als nächstes sollte ein Einblick in die Beteiligung dieses Abbauweges an der Degradation von NeoR gewonnen werden. Hierfür wurden RCC 1.24-Zellen mit dem NeoR-GFP-Fusionskonstrukt transfiziert und Autophagie durch 3-Methyladenin inhibiert. Diese Substanz blockiert spezifisch die Ausbildung der Phagophore und somit den ersten Schritt in der Aufnahme zytosmatischer Bestandteile in Autophagosomen (Seglen und Gordon, 1982). Aufgrund der hohen Spezifität ist 3-Methyladenin der am häufigsten verwendete Inhibitor Autophagie-vermittelter Degradationsprozesse.

Bereits 12 Stunden nach Zugabe von 3-MA konnte eine verstärkte Fluoreszenz der pINCO-NeoR-GFP-transfizierten Zellen festgestellt werden, besonders deutlich zeigten sich die Unterschiede nach 24-36 Stunden (Abb. 24a). Während Leupeptin-behandelte Zellen die charakteristische Anreicherung des NeoR-GFP-Fusionsproteins in Kern-nahen Vesikeln aufwiesen (siehe auch Abb. 18), konnte dies in Zellen, denen zusätzlich 3-MA zugesetzt worden war, nicht beobachtet werden. Inhaltlich identische Ergebnisse wurden auch in LCL 1.11- und 293T-Zellen erhalten (nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse legten den Schluß nahe, daß es in Gegenwart von 3-MA zu einer Anreicherung des NeoR-Proteins kommt. Für eine bessere Quantifizierung sollten diese Effekte auf biochemischer Ebene weiter überprüft werden. Dazu wurden stabil mit pINCO-NeoR-transfizierte 293T-Zellen (293T-NeoR) für verschiedene Zeiten mit 3-MA behandelt und die NeoR-Proteinmenge in Western-Transfer-Experimenten überprüft. Da die eingesetzten Zellzahlen 100-fach niedriger als in den Fraktionierungsstudien waren, lag die Proteinmenge in unbehandelten 293T-NeoR-Zellen an der Detektionsgrenze (Abb. 24b; 0 Stunden). In Anwesenheit von 3-MA kam es innerhalb von 12 Stunden zu einer sehr starken Anreicherung des NeoR-Proteins (Abb. 24b), während dieser Effekt in unbehandelten Zellen ausblieb (nicht gezeigt). Als Beladungs- und Spezifitätskontrolle wurde das ER-residente Protein BiP gewählt, da dessen Proteinstabilität unabhängig von Autophagie sein sollte. Wie erwartet hatte 3-MA keine erkennbaren Auswirkungen auf BiP.

Um auszuschließen, daß diese Anreicherung durch verstärkte Translation zustande kommt, wurden 293T-NeoR-Zellen in Gegenwart von Cycloheximid und 3-MA kultiviert. Da das Expressionsniveau des NeoR-Proteins sehr niedrig ist, wurden die Zellen für diese Experimente 12 Stunden in Gegenwart von 3-MA gehalten, um eine NeoR-Akkumulation zu induzieren. Danach wurde einem Teil der Zellen 3-MA entzogen und die Proteinstabilität bei gleichzeitiger Inhibition der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid ermittelt.

In derart behandelten Zellen konnte das Protein bereits nach 3 Stunden kaum noch nachgewiesen werden. Dagegen war der Abbau des NeoR-Proteins in Zellen, die weiterhin in Gegenwart von 3-MA gehalten wurden, inhibiert. Die Stabilität des Kontrollproteins BiP blieb unbeeinflusst (Abb. 24c). Somit konnte sichergestellt werden, daß die beobachtete Akkumulation des NeoR-Proteins unter 3-MA durch eine Inhibition der Degradation zustande kommt.



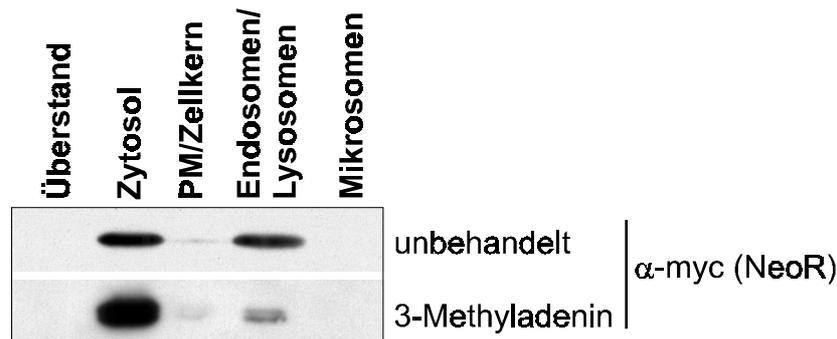
### Abbildung 24: NeoR wird durch Autophagie degradiert

Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in RCC 1.24-Zellen (a) und Western-Transfer-Experimente (b, c) in pINCO-NeoR-transfizierten 293T-Zellen.

- a) **3-Methyladenin unterbindet die Ausbildung der Kern-nahen Vesikel und führt zu einer verstärkten Fluoreszenz.** RCC 1.24-Zellen wurden mit 5  $\mu$ g pINCO-NeoR-GFP transfiziert und nach 24 Stunden entweder Leupeptin (200  $\mu$ g/ml; mitte) oder 3-Methyladenin (7,5 mM; rechts) zugegeben. Unbehandelte Zellen (links) dienen als Vergleich für die beobachteten Effekte. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte, die entweder unter ultraviolettem (UV)- oder Tageslicht (DL) aufgenommen wurden. Die Zellkerne wurden durch Pfeilspitzen, die auftretenden Kern-nahen Vesikel durch Pfeile markiert.
- b) **3-Methyladenin induziert eine Akkumulation von NeoR.** 293T-Zellen wurden mit pINCO-NeoR transfiziert und für 2 Wochen unter Puromycin-Selektion gehalten (293T-NeoR). Je  $2 \times 10^6$  Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder über verschiedene Zeiten mit 7,5 mM 3-Methyladenin (3-MA) inkubiert. Equivalente Proteinmengen wurden geladen. Die Detektion erfolgte mit einem myc (9E10) Antikörper. Als Beladungskontrolle wurde die gleiche Membran anschließend mit einem BiP-Antikörper inkubiert.
- c) **3-Methyladenin stabilisiert NeoR.** Die unter b) beschriebenen 293T-Zellen wurden für 12 Stunden in Gegenwart von 7,5 mM 3-MA kultiviert. Danach wurden die Zellen gewaschen und für weitere 3, bzw. 6 Stunden in Gegenwart von Cycloheximid (50  $\mu$ g/ml) und 3-MA oder nur von Cycloheximid gehalten. Gleiche Mengen der Zellysate wurden geladen und NeoR, bzw. BiP wie unter b) beschrieben detektiert.

### 4.7.3 Autophagie ist für die endogene Präsentation von NeoR notwendig

Da 3-Methyladenin die Ausbildung der Autophagosomen blockiert, sollte die Behandlung der Zellen mit 3-MA zu einer Akkumulation des NeoR-Proteins im Zytoplasma führen. Um dies zu überprüfen, wurden pINCO-NeoR-transfizierte 293T-Zellen mit, bzw. ohne 3-MA inkubiert und anschließend durch differentielle Zentrifugation in Zytoplasma, Plasmamembran/Kern, Endosomen/Lysosomen und Mikrosomen aufgetrennt.



**Abbildung 25: 3-MA verhindert den Import von NeoR in das endosomale/lysosomale System**

293T-Zellen wurden mit pINCO-NeoR transfiziert und unter Puromycin Selektion expandiert. Je  $3 \times 10^8$  Zellen wurden entweder mit 7,5 mM 3-MA für 48 h inkubiert oder blieben unbehandelt. Danach erfolgte die Aufreinigung der Kompartimente durch differentielle Zentrifugation und die Analyse der NeoR-Proteinverteilung mittels Western-Transfer-Analyse. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen geladen. Die Detektion des Proteins erfolgte mit einem myc Antikörper (9E10).

In unbehandelten Zellen konnte NeoR im Zytoplasma, Zellkern und zu einem hohen Anteil im endosomalen/lysosomalen System nachgewiesen werden. Dagegen zeigten 3-MA behandelte Zellen eine Anreicherung des Proteins im Zytoplasma und eine stark reduzierte Menge in Endosomen und Lysosomen (Abb. 25). Zusammen mit den vorangegangenen Experimenten bestätigt dies sowohl die wichtige Rolle der Autophagie bei der Aufnahme des NeoR-Proteins in diese Vesikel, als auch die Funktionalität und Spezifität des verwendeten Inhibitors 3-Methyladenin.

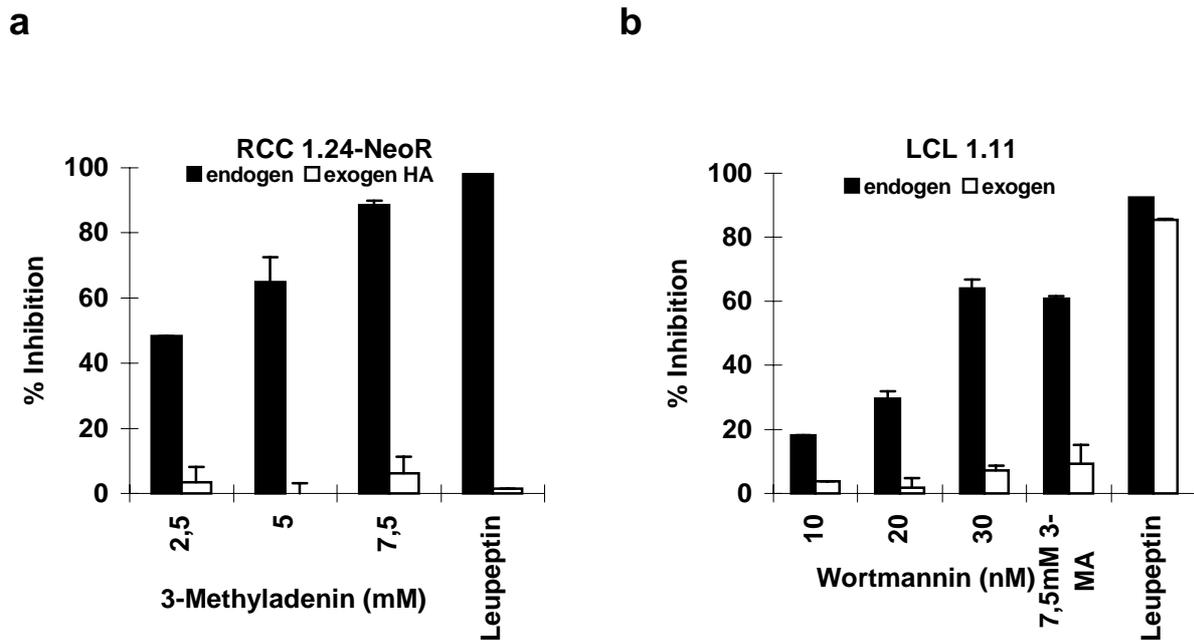
Dennoch waren diese Ergebnisse nur indirekte Anhaltspunkte für eine Beteiligung der Autophagie an der MHC-Klasse-II-restringierten Präsentation von NeoR, weshalb Antigenpräsentationsexperimente mit RCC 1.24-NeoR und LCL 1.11 durchgeführt wurden. Zunächst wurde kontrolliert, ob die standardmäßig eingesetzten Konzentrationen von 3-Methyladenin einen Einfluß auf andere zelluläre Prozesse haben, die mit den Antigenpräsentationsstudien interferieren würden.

Eine Inkubation der Zellen mit 3-MA in einem Konzentrationsbereich zwischen 1 und 10 mM für 36 h führte zu keiner signifikanten Veränderung der Lebendzellzahl (nicht gezeigt). Der Einfluß des Inhibitors auf den klassischen (exogenen) MHC-Klasse-II-Präsentationsweg wurde durch Zugabe von exogenem Protein in Gegenwart verschiedener Inhibitorkonzentrationen überprüft (Abb. 26). Da die RCC 1.24-NeoR-Zelllinie bereits NeoR endogen exprimiert, wurde hierfür das Modellantigen Hämagglutinin verwendet, für dessen Präsentation die RCC-Zellen das restringierende MHC-Klasse-II-Molekül (HLA-DR1) tragen. Für LCL 1.11 konnte exogenes NeoR-Protein verwendet werden.

In keinem der beiden Fälle kam es zu einer Inhibition der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II (Abb. 26). Zusätzlich wurde durch FACS-Analyse ausgeschlossen, daß die beobachtete Inhibition in RCC 1.24-NeoR durch eine Interferenz mit dem Transport neu-synthetisierter MHC-Klasse-II-Moleküle an die Zelloberfläche zustande kommt. 3-MA hatte weder auf die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-, noch auf die von MHC-Klasse-II-Molekülen negative Einflüsse (nicht gezeigt).

Im Anschluß an diese Kontrollexperimente wurden IFN $\gamma$ -induzierte RCC 1.24-NeoR und pINCO-NeoR-transfizierte LCL 1.11 mit verschiedenen Konzentrationen 3-MA für 36 Stunden inkubiert. Während der Inhibitor in RCC 1.24-NeoR-Zellen bereits in geringen Konzentrationen (2,5 mM) eine etwa 50%-ige Inhibition der NeoR-Präsentation zur Folge hatte, konnten in LCL 1.11-Zellen eindeutige Effekte erst bei höheren Konzentrationen beobachtet werden (Abb. 26 und nicht gezeigt). Um sicherzustellen, daß diese Effekte spezifisch sind, wurden diese Zellen mit Wortmannin, einem weiteren Inhibitor der Autophagie inkubiert (Abb. 26b).

Ähnlich wie 3-MA blockiert Wortmannin die Ausbildung der Autophagosomen, beeinflusst aber in hohen Konzentrationen (>100 nM) auch den Vesikeltransport im endosomalen/lysosomalen System. Daher wurden nur sehr niedrige Konzentrationen (maximal 30 nM) eingesetzt und wie im Falle von 3-MA Nebeneffekte durch die oben beschriebenen Kontrollen ausgeschlossen. Auch Wortmannin inhibierte konzentrationsabhängig die endogene Präsentation von NeoR auf MHC-Klasse-II und die größtmögliche Inhibition lag wie für 3-MA bei ca. 60% (Abb. 26b).



**Abbildung 26: 3-Methyladenin inhibiert die MHC-Klasse-II-restringierte Präsentation von NeoR**

Gezeigt sind Antigenpräsentationsexperimente mit RCC 1.24-NeoR (a) und LCL 1.11, die mit pINCO-NeoR transfiziert wurden (b).

- a) RCC 1.24-NeoR-Zellen wurden für 48 h mit 50 U/ml IFN $\gamma$  zur Expression von MHC-Klasse-II induziert. Ein Teil der Zellen blieb unbehandelt, dem anderen wurde zusätzlich 3-Methyladenin für 36 Stunden zugesetzt. Da RCC 1.24-NeoR konstitutiv NeoR exprimiert, wurden die Zellen als Kontrolle mit exogenem HA-Protein (1  $\mu$ g/ml) in Gegenwart, bzw. Abwesenheit von 3-Methyladenin für 24 Stunden inkubiert. Außerdem wurde ein Teil der Zellen mit Leupeptin (200  $\mu$ g/ml) behandelt, um einen internen Vergleichswert für starke Inhibition zu haben.
- b) LCL 1.11-Zellen wurden wie unter a) beschrieben mit 7,5 mM 3-Methyladenin und Leupeptin für 36 Stunden behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Wortmannin inkubiert. Als Kontrolle wurden untransfizierte LCL 1.11 in Gegenwart der Inhibitoren für 24 Stunden mit exogenem NeoR-Protein (30 ng/ml) versetzt.

Alle Ansätze wurden nach 48 Stunden mit 0,5% Paraformaldehyd fixiert und für weitere 20 Stunden mit dem T-Zellklon 20-4/A4 inkubiert. Die freigesetzte GM-CSF Menge wurde mit einem GM-CSF ELISA bestimmt. Die Ergebnisse wurden wie folgt berechnet: % Inhibition =  $(1 - \text{GM-CSF Konzentration in Gegenwart der Inhibitoren} / \text{GM-CSF Konzentration ohne Inhibitoren}) \times 100$ .

Diese Befunde sprechen dafür, daß Autophagie sowohl in professionellen- als auch in nicht-professionellen APCs eine wichtige Rolle bei der endogenen Präsentation des zytosolischen Proteins Neomycin-Phosphotransferase spielt. Mögliche Erklärungen für die unterschiedliche Stärke der Inhibition in professionellen APCs könnten einerseits die Existenz weiterer Autophagie-unabhängiger endogener Präsentationswege oder andererseits die Regulation der Autophagie über Signalwege sein, die nicht durch 3-MA, bzw. Wortmannin zu inhibieren sind.

## 5 Diskussion

MHC-Moleküle spielen eine essentielle Rolle in der Immunabwehr. Sie liegen auf der Zelloberfläche im Komplex mit Peptiden vor, die von CD8 (MHC-I), bzw. CD4 (MHC-II) positiven T-Zellen erkannt werden. Die genaue Kenntnis der Antigenpräsentationswege ist eine Voraussetzung, um regulierend in diese Prozesse eingreifen zu können. Die Grundlage für die Formulierung der beiden klassischen Antigenpräsentationswege bilden Experimente mit aktiven, bzw. inaktivierten Influenzaviren (Morrison et al., 1986). Nach diesem Modell (Übersicht bei Braciale, 1987) präsentieren MHC-Klasse-I-Moleküle Peptide von Proteinen, die aktiv in der Zelle hergestellt werden (**endogene Proteine**; Infektion mit aktivem Virus), MHC-Klasse-II-Moleküle dagegen Peptide von Proteinen, die aus dem extrazellulären Raum aufgenommen werden (**exogene Proteine**; Aufnahme des inaktivierten Virus). Durch weiterführende Studien konnte gezeigt werden, daß diese strikte Trennung der Proteinherkunft nicht aufrecht erhalten werden kann, da insbesondere Peptide endogener Proteine der Plasmamembran und des endosomalen/lysosomalen Systems auch im Kontext von MHC-Klasse-II präsentiert werden (Rudensky et al., 1991; Übersicht bei Pieters, 2000).

Ergebnisse, die mit diesem Modell nicht kompatibel waren, deuteten auf die Existenz von sogenannten „alternativen Antigenpräsentationswegen“ hin (Übersicht bei Lechler, 1996; Yewdell und Bennink, 1999 a). Heute ist weitgehend akzeptiert, daß exogene Proteine auch im Kontext von MHC-Klasse-I präsentiert werden können (**exogener** MHC-Klasse-I-Präsentationsweg, oder „Cross Presentation“) und daß dieser Präsentationsweg eine wichtige Rolle im Rahmen der Immunantwort spielt. Dagegen ist die Präsentation von Peptiden zytoplasmatischer Proteine im Kontext von MHC-Klasse-II (**endogener** MHC-Klasse-II-Präsentationsweg) noch weitgehend unverstanden. Die Kenntnis dieses Präsentationsweges ist die Grundlage für das Verständnis wichtiger immunologischer Prozesse, wie etwa der Toleranzinduktion (Übersicht bei Klein und Kyewski) und der Induktion einer antitumoralen Immunität (Übersicht bei Wang et al., 2001).

Ziel dieser Arbeit war es, einen grundlegenden Beitrag zum Verständnis endogener MHC-Klasse-II-restringierter Antigenpräsentation zu leisten. Da es mit den bisher verwendeten Modellsystemen nicht möglich war, eindeutige Aussagen über beteiligte zelluläre Strukturen zu machen, wurde ein neues Modellsystem etabliert, mit dem dieser Präsentationsweg besser untersucht werden kann.

Im Folgenden soll dieses Modellsystem im Vergleich zu den vorhandenen Modellen dargestellt werden, da in den Unterschieden der benutzten experimentellen Systeme in erster

Linie auch die Ursache für die teilweise divergierenden Ergebnisse verschiedener Gruppen zu suchen ist.

## **5.1 Experimentelle Systeme zur Charakterisierung des endogenen MHC-Klasse-II-Präsentationsweges**

Eine besonders wichtige Rolle für die Bewertung der Ergebnisse spielen die verwendeten Modellantigene, die antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und die eingesetzten Transfektions-, bzw. Infektionsverfahren.

### **5.1.1 Modellantigene**

Ein limitierender Faktor für das Studium endogener MHC-Klasse-II-Präsentationswege ist die Verfügbarkeit von CD4<sup>+</sup> T-Zellklonen, die Peptide zytoplasmatischer Proteine erkennen. Um dieses Problem zu umgehen, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen vorhandene Modellantigene (Hämagglutinin, Hühnerei Lysozym) so modifiziert, daß sie anstatt im vakuolären System (ER, Golgiapparat, etc.) im Zytoplasma lokalisiert sind. Für viele dieser ektopisch im Zytoplasma exprimierten Antigene (Hühnerei Lysozym, lambda leichte Kette von Antikörpern, HIV env-Protein, MHC-Klasse-I) konnte keine endogene Präsentation im Kontext von MHC-Klasse-II gefunden werden (Polydefkis et al., 1990; Weiss et al., 1991; Loss et al., 1993). Dagegen konnte für unveränderte zytosolische, bzw. nukleäre Proteine, wie das Nukleo- (NP) und Matrixprotein des Masern-Virus und ein Matrixprotein (M1) des Influenzavirus, eine endogene Präsentation von Peptiden auf MHC-Klasse-II nachgewiesen werden (Jacobson et al., 1989; Nuchtern et al., 1990; Guegen et al., 1996). Im Folgenden sollen Erklärungsmöglichkeiten für diese widersprüchlichen Ergebnisse aufgezeigt werden.

Das Zytoplasma und das vakuoläre System unterscheiden sich in ihrem physiologischen Milieu und in ihrer Ausstattung mit Chaperonen und Proteasen. Eine veränderte Degradation eines Proteins kann dazu führen, daß ein bestimmtes antigenes Peptid weniger effizient oder nicht mehr hergestellt wird (Übersicht bei Wubbolts und Neeffjes, 1999).

Bei der Bewertung der Daten, die mit modifizierten Modellantigenen erhalten wurden, muß folglich in Betracht gezogen werden, daß eine fehlende Erkennung durch einen T-Zellklon nur etwas über die Bildung eines bestimmten Peptides aussagt. Es ist durchaus vorstellbar, daß andere Peptide des gleichen Proteins gebildet und im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. Ein weiteres Problem liegt darin, daß ektopisch im Zytoplasma exprimierte Modellantigene häufig eine sehr kurze Halbwertszeit haben. So hatte die zytoplasmatische Form von Hühnerei-Lysozym eine Halbwertszeit von weniger als 5 Minuten. Durch die zusätzliche Verwendung unterschiedlich starker Promotoren (pCMV, bzw. SV40) für die Expression des Antigens ist vermutlich zu erklären, warum manche Gruppen eine Präsentation der zytosolischen Form von Hühnerei-Lysozym (HEL) im Kontext von MHC-Klasse-II nachweisen konnten (Brooks und McCluskey, 1993), andere jedoch nicht (Humbert et al., 1993).

Negative Ergebnisse sind also häufig eher mit technischen Problemen zu erklären, als mit einer Beschränkung des endogenen MHC-Klasse-II-Präsentationsweges auf wenige Modellsysteme.

Im Gegensatz zu diesen ektopisch im Zytoplasma exprimierten Antigenen erkennt der CD4<sup>+</sup> T-Zellklon 20-4/A4 ein Peptid des Proteins Neomycin-Phosphotransferase (NeoR), das von sich aus im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert ist. Sekundäre Modifikationen, welche die Interpretation der Ergebnisse komplizieren könnten, waren daher nicht notwendig. Durch Kontrollexperimente (Überstand-Transfer, Kokultivierung) konnte ausgeschlossen werden, daß NeoR in den Kulturüberstand und somit in den klassischen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg gelangt. Diese Ergebnisse belegen, daß NeoR direkten Zugang zu einem endogenen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg aus dem Zytoplasma hat.

### **5.1.2 Antigenpräsentierende Zellen**

Eine weitere Voraussetzung ist die Verfügbarkeit von APCs, die das restringierende MHC-Klasse-II-Molekül exprimieren. Da gut etablierte Zellkulturlinien in den meisten Fällen nicht die entsprechenden MHC-Moleküle tragen, werden häufig stabile Linien hergestellt, die das benötigte MHC-Klasse-II-Molekül überexprimieren (Brooks et al., 1991; Moreno et al., 1991; Humbert et al., 1993; Mukherjee et al., 2001). Ein limitierender Faktor für die richtige Faltung und den Transport dieser Moleküle aus dem ER ist die invariante Kette.

Eine Überexpression von MHC-Klasse-II-Molekülen kann dazu führen, daß eine Interaktion mit der invarianten Kette unterbleibt und die ansonsten durch CLIP verschlossene Antigenbindungstasche schon vorzeitig Peptide im ER binden kann (Newcomb und Cresswell, 1993; Übersicht bei Marelli-Berg und Lechler, 1999). Diese Möglichkeit muß insbesondere bei der Verwendung von Inhibitoren, die Hinweise auf eine vorzeitige Peptidbeladung von MHC-Klasse-II-Molekülen im endoplasmatischen Retikulum geben (Brefeldin A), mit in die Interpretation der Ergebnisse einbezogen werden.

Aus den genannten Gründen wurde in dem in dieser Arbeit etablierten Modellsystem vollständig auf eine Überexpression von MHC-Klasse-II verzichtet. Statt dessen wurden sowohl professionelle als auch nicht-professionelle APCs verwendet, die das restringierende MHC-Klasse-II-Molekül exprimieren. Somit konnten Artefakte, die durch Expression bestimmter Komponenten des Antigenpräsentationsweges in nicht-physiologischen Mengen entstehen können, ausgeschlossen werden.

### **5.1.3 Infektions- und Transfektionsmodelle**

Ein weiteres entscheidendes Kriterium für das Studium des alternativen MHC-Klasse-II-Präsentationsweges ist die Verfügbarkeit von antigenpräsentierenden Zellen, die das Modellantigen exprimieren und sich für die Untersuchung der Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen eignen.

Professionelle APCs, die konstitutiv sowohl MHC-Klasse-II als auch das Modellantigen exprimieren, sind für solche Untersuchungen ungeeignet, weil es in diesen Zellen zu einer kontinuierlichen MHC-Klasse-II-Beladung kommt und die MHC-Klasse-II/Peptid-Komplexe eine lange Halbwertszeit aufweisen. Die Beteiligung zellulärer Strukturen an neuen Beladungsvorgängen kann deshalb in solchen Zellen nur sehr eingeschränkt untersucht werden. Insbesondere beim Einsatz von Inhibitoren, die eine Peptidherstellung beeinflussen könnten (Lactacystin, Chloroquin, etc.), werden lange Einwirkzeiten benötigt (Humbert et al., 1993), die wiederum das Auftreten unspezifischer zytotoxischer Effekte begünstigen. Die MHC-Klasse-II-Beladung kann in professionellen APCs nur untersucht werden, wenn die Synthese des Antigens und damit die Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle neu einsetzt. Aufgrund der beschränkten Transfektionseffizienz wurden deshalb bevorzugt virale Systeme für den Gentransfer und die Expression des Antigens in professionellen APCs herangezogen (Gueguen et al., 1996; Fernandes et al., 2000).

Virale Gentransfer- und Expressionssysteme tragen jedoch wiederum ihre eigenen Schwierigkeiten in sich. Die Effizienz des Gentransfers viraler Systeme liegt häufig gerade darin begründet, daß die Expression viraler Proteine auf Kosten zellulärer Synthesewege optimiert ist. Virale Proteine greifen deshalb häufig in physiologische Prozesse ein (Proteinbiosynthese, Proteindegradation, etc.), was eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse erschwert. Von vielen Viren ist zudem bekannt, daß sie mit physiologischen Antigenpräsentationswegen interferieren können (Übersicht bei Alcamì und Koszinowski, 2000). Dies geht sogar so weit, daß erst aus der Interferenz viraler Proteine mit der Antigenpräsentation einzelne Schritte dieser komplizierten Wege aufgeklärt werden konnten. Weiterhin ist die Infektion ein komplexer biologischer Vorgang, der durch die Verwendung bestimmter Inhibitoren gestört werden kann. So wurde für das M1-Protein des Influenza-Virus bei Verwendung intakter Influenzaviren eine Inhibition der Präsentation im Kontext von MHC-Klasse-II durch Brefeldin A beobachtet (Nuchtern et al., 1990). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde postuliert, daß der endogene MHC-Klasse-II-Präsentationsweg dem klassischen MHC-Klasse-I-Weg ähnlich ist. Experimente, in denen das M1-Protein durch rekombinante Vaccinia-Viren in APCs eingebracht wurde, konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen und ließen vermuten, daß die Prozessierung im endosomalen System stattfindet (Jaraquemada et al., 1990; Gueguen et al., 1996). Während im letzten Fall ausgeschlossen wurde, daß Brefeldin A mit dem Infektionsprozeß interferierte, fehlten diese Kontrollen im ersten Fall.

In eigenen Experimenten mit rekombinanten Influenzaviren konnte gezeigt werden, daß sowohl Chloroquin als auch Brefeldin A die Infektionseffizienz von Zielzellen mit Influenza stark verminderten (nicht gezeigt). Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen sind somit wahrscheinlich durch Nebeneffekte des Inhibitors auf die Infektion und nicht auf eine Inhibition der Antigenpräsentation zurückzuführen.

Als Alternative zum Gentransfer durch virale Systeme wurde auch versucht, das Zytoplasma mit exogenen Proteinen durch die sogenannte hypertone Lyse pinozytotischer Vesikel zu beladen. Dies führt nach Aufnahme des extrazellulären Materials zum Platzen der endosomalen Vesikel und zur Freisetzung des Inhalts in das Zytoplasma (Chen et al., 1990; Mukherjee et al., 2001). Ein schwerwiegender Nachteil dieser Methode ist die Zerstörung der Endosomen und die Freisetzung endosomaler Proteasen in das Zytoplasma, wodurch nur sehr eingeschränkt Aussagen über den Antigenpräsentationsweg möglich sind.

Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß Teile des aufgenommenen Proteins im endosomalen System verbleiben und somit im klassischen MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg degradiert werden.

Die beschriebenen Probleme des viralen Gentransfers und der hypertonen Lyse wurden in der vorliegenden Arbeit auf zwei Wegen umgangen. Erstens wurden professionelle APCs eingesetzt (LCL 1.11), die sich durch Elektroporation hinreichend gut transfizieren lassen, um eine Erkennung durch den T-Zellklon zu gewährleisten. Zweitens wurde eine stabil mit dem Modellantigen transfizierte Nierenzellkarzinomlinie verwendet, in der die MHC-Klasse-II-Expression erst durch die Behandlung mit Interferon- $\gamma$  induziert werden kann. Somit besteht in beiden zellulären Systemen die Möglichkeit neue Beladungsvorgänge von MHC-Klasse-II-Molekülen zu studieren. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in unterschiedlichen Zelllinien, in die das Modellantigen mittels verschiedener Methoden eingebracht wurde, kann als interne Kontrolle und als Hinweis dafür gewertet werden, daß die eingesetzten Transfektionsverfahren die Antigenpräsentation nicht beeinflussen.

Zusammenfassend zeichnet sich das in dieser Arbeit verwendete experimentelle System durch eine minimale Beeinflussung sekundärer zellphysiologischer Prozesse aus, wodurch eine bessere Interpretation der erhaltenen Ergebnisse ermöglicht wird.

## **5.2 Der endogene MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg**

Obwohl es nur relativ wenige Publikationen gibt, in denen die molekularen Details des endogenen MHC-Klasse-II-Präsentationsweges näher untersucht werden, lassen sich zwei unterschiedliche Konzepte in der Interpretation der Ergebnisse erkennen. Das erste Konzept geht von einer Beteiligung von Schlüsselkomponenten des MHC-Klasse-I-Präsentationsweges (Proteasom, TAP-Transporter) am endogenen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg aus (Nuchtern et al., 1990; Chen et al., 1990; Lich et al., 2000; Mukherjee et al., 2001). Nach dem zweiten Konzept konvergieren der endogene und klassische MHC-Klasse-II-Präsentationsweg im endosomalen System (Jaraquemada et al., 1990; Gueguen et al., 1996). In den nächsten Abschnitten sollen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse im Kontext dieser beiden Hypothesen diskutiert werden.

### **5.2.1 Beteiligung von Schlüsselkomponenten des MHC-Klasse-I-Präsentationsweges am endogenen MHC-Klasse-II-Beladungsweg**

Als Argument für eine Beteiligung von Komponenten des MHC-Klasse-I-Präsentationsweges am endogenen MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg wurden hauptsächlich die Ergebnisse aus Experimenten mit chemischen Inhibitoren, die mit Schlüsselkomponenten dieses Präsentationsweges interferieren (Lactacystin, Brefeldin A, etc.), herangezogen. Für zwei Modellantigene (Glutamat-Decarboxylase und Ovalbumin) wurde eine Beteiligung zytoplasmatischer Proteasen an der Herstellung antigener Peptide für MHC-Klasse-II beschrieben (Lich et al., 2000; Mukherjee et al., 2001). Bei der Bewertung dieser Ergebnisse ist zu beachten, daß in beiden Studien experimentelle Ansätze gewählt wurden, die andere zellphysiologische Prozesse stark beeinflussen. Dies war zum einen das Einbringen des exogenen Proteins in das Zytoplasma durch hypertone Lyse der endosomalen Vesikel (Mukherjee et al., 2001) und zum anderen die Verwendung einer stabil mit dem Antigen transfizierten professionellen APC. Um im letzteren Fall Effekte der verwendeten Inhibitoren erkennen zu können, war es notwendig, bereits gebildete MHC-Klasse-II/Peptid-Komplexe durch Behandlung der Zellen mit Säure zu dissoziieren und die Zellen im Anschluß daran mit Inhibitoren zu behandeln. Da in dieser Studie keine funktionelle Negativkontrolle mitgeführt wurde (Modellantigen, dessen Präsentation nicht inhibiert werden sollte), kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Säurebehandlung, gefolgt von der Inkubation mit Inhibitoren, unspezifisch zu einer verminderten Antigenpräsentation führte.

Das in dieser Arbeit verwendete Modellsystem war dagegen so gewählt, daß aussagekräftige Kontrollexperimente möglich waren. Die Herstellung des NeoR-Peptides war weder vom Proteasom, noch von TPPII abhängig. Da die Präsentation eines parallel mitgeführten MHC-Klasse-I-restringierten Modellantigens (Tyrosinase) unter den gleichen Bedingungen inhibiert wurde, konnte ausgeschlossen werden, daß diese negativen Resultate durch eine fehlende Wirkung der verwendeten Inhibitoren zustande kamen. Gestützt werden die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse durch den Befund, daß bei einem anderen Modellantigen (Influenza M1-Protein) eine gezielte Degradation durch das Proteasom die endogene Präsentation auf MHC-Klasse-II verhindert (Gueguen et al., 1996). In den Arbeiten von Lich et al. (2000) und Mukherjee et al. (2001) wurde nicht untersucht, wie die im Zytoplasma hergestellten Peptide auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen werden.

Eine oft diskutierte Theorie ist ein Peptidimport in das ER über den TAP-Transporter, gefolgt von einer vorzeitigen Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen. Da durch die alleinige Inhibition des Proteasoms und TPPII nicht geprüft werden konnte, ob andere zytoplasmatische Proteasen an der Herstellung des NeoR-Peptides beteiligt sind, wurde eine stabil mit ICP47 transfizierte LCL 1.11-Zelllinie etabliert. In dieser Zelllinie ist die TAP-abhängige Antigenpräsentation komplett unterbunden, was funktionell durch die Inhibition der MHC-Klasse-I-restringierten Präsentation von Tyrosinase-Peptiden gezeigt wurde. Da es jedoch zu keiner Beeinflussung der Präsentation des NeoR-Peptides kam, konnte eine vorzeitige Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen mit dem NeoR-Peptid ausgeschlossen werden. In ähnlicher Weise konnte durch Verwendung einer TAP1-defizienten Zelllinie für im Zytoplasma exprimiertes Hämagglutinin nachgewiesen werden, daß die Präsentation unabhängig vom TAP-Transporter abläuft (Malnati et al., 1992). Zusätzlich dazu sprechen auch die mit Brefeldin A und DSG (partielle, bzw. keine Inhibition der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-II) erhaltenen Daten gegen eine Beteiligung der für die MHC-Klasse-I-Beladung notwendigen Komponenten am endogenen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg. Dies schließt aber nicht aus, daß es für verschiedene zytoplasmatische Proteine unterschiedliche Wege gibt, die zu einer Präsentation auf MHC-Klasse-II führen.

### **5.2.2 Konvergenz des endogenen und des klassischen MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweges im endosomalen System**

Ein wichtiges Argument für eine Konvergenz des endogenen und exogenen MHC-Klasse-II-Präsentationsweges in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten ist die von uns und anderen beobachtete Sensitivität des endogenen MHC-Klasse-II-restringierten Antigenpräsentationsweges gegenüber lysosomotropen Agentien (Chloroquin, Leupeptin, Pepstatin A). So konnte die endogene Präsentation eines Peptides des Influenza Matrix-Proteins (M1) durch Chloroquin unterbunden werden (Jaraquemada et al., 1990). Hierbei ist zu beachten, daß eine fehlende Inhibition durch die angeführten Inhibitoren nicht automatisch als Endosomen/Lysosomen-unabhängige Prozessierung gewertet werden kann, da diese Inhibitoren entweder nur mit bestimmten Proteasen (Leupeptin, Pepstatin A) oder nur mit späten Endosomen/Lysosomen interferieren (Chloroquin).

Dagegen ist der Proteinabbau in den schwach sauren frühen Endosomen nicht durch Chloroquin zu hemmen. Ein Beispiel für ein MHC-Klasse-II-restringiertes Antigen, dessen Beladung nicht durch Chloroquin gehemmt werden kann, ist Hämagglutinin (Pinet et al., 1995; Pinet et al., 1998), das auch in dieser Arbeit als Spezifitätskontrolle eingesetzt wurde. Für das NeoR-Modellantigen konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß eine Prozessierung in späten endosomalen/lysosomalen Kompartimenten durch Cystein-Proteasen (Chloroquin- und Leupeptin-Experimente) essentiell für die Herstellung des antigenen Peptides ist. Für Leupeptin war neben der Inhibition der Herstellung antigener Peptide (Hitzel et al., 1995) auch ein Einfluß auf die Degradation der invarianten Kette und somit auf die Reifung neu-synthetisierter MHC-Klasse-II-Moleküle beschrieben (Neefjes und Ploegh, 1992). Demnach wäre in RCC-Zellen nach Inkubation mit IFN $\gamma$  in Gegenwart von Leupeptin eine stark verminderte Menge an neu-synthetisierten MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Zelloberfläche zu erwarten. Durch FACST<sup>TM</sup>-Analyse konnte jedoch gezeigt werden, daß Leupeptin keine derartigen negativen Auswirkungen auf die MHC-Klasse-II-Expression auf RCC-Zellen nach Interferon- $\gamma$  Behandlung hatte. Weiterhin sind der Nachweis des NeoR-Proteins im endosomalen System und die Stabilisierung des Proteins in Lysosomen (Western-Transfer) in Gegenwart von Leupeptin gute Anhaltspunkte dafür, daß die beobachtete Inhibition auf fehlender NeoR-Prozessierung und nicht sekundären Effekten der Inhibitoren beruht. Darüber hinaus wurden unspezifische zytotoxische Effekte der Inhibitoren auf die Antigenpräsentation durch die parallel mitgeführten funktionellen Kontrollen (Tyrosinase, Hämagglutinin) ausgeschlossen. Da auch die Präsentation von exogenem zugeführtem Protein (Aufnahme in den klassischen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg) durch Chloroquin und Leupeptin in gleichem Ausmaß gehemmt wurde, sprechen die in dieser Arbeit erhaltenen Daten klar für eine Konvergenz des exogenen und endogenen MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweges in Endosomen/Lysosomen.

### **5.3 Transport des Proteins in das endosomale/lysosomale System**

Mögliche Wege für eine Aufnahme zytoplasmatischer Proteine in endosomale und lysosomale Kompartimente sind der direkte Import der Proteine in Lysosomen (Übersicht bei Cuervo und Dice, 1998) und die Autophagie-vermittelte Degradation. Keiner dieser Vorgänge wurde bisher im Zusammenhang mit endogener Antigenpräsentation untersucht.

Für die direkte Aufnahme von Proteinen in Lysosomen konnte eine Konsensus-Sequenz (KFERQ) ermittelt werden, die für diese Form der Aufnahme notwendig ist (Übersicht bei Dice, 1990). Sequenzvergleiche mit der NeoR-Proteinsequenz ergaben keinerlei Übereinstimmungen mit dieser Aminosäureabfolge. Die Auftrennung der Endosomen und Lysosomen zeigte eindeutig, daß der Import des NeoR-Proteins in endosomalen Vesikeln stattfindet und das Protein erst später in Lysosomen gefunden werden kann. Zusätzlich dazu hatte auch die Inhibition der Protein/Peptidbindung an das Hitzeschockprotein Hsc70, das mit diesen Transportvorgängen in Verbindung gebracht wird (Chiang et al., 1989; Nadler et al., 1992; Srivastava et al., 1994; Panjwani et al., 1999), keine Auswirkung auf die Antigenpräsentation. Diese Ergebnisse deuteten auf Autophagie als Importweg hin, da bekannt ist, daß Autophagosomen sowohl mit frühen als auch mit späten Endosomen fusionieren können (Gordon und Seglen, 1988; Liou et al., 1997; Berg et al., 1998). Die endogene Präsentation zytoplasmatischer Proteine unter Beteiligung von Autophagie wurde zwar postuliert, war aber bisher nicht nachgewiesen worden. Dies dürfte im wesentlichen daran liegen, daß mit Ausnahme morphologischer und biochemischer Daten aus Leberzellen der Ratte, nichts über den molekularen Mechanismus der Autophagie in höheren Eukaryonten bekannt ist. Alle in diesen Vorgang involvierten Proteine wurden im Modellsystem *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert. Sequenzvergleiche ergaben, daß es im humanen System homologe Proteine gibt (Mizushima et al., 1998) und erste Studien mit murinen und humanen Zellen konnten belegen, daß sie auch hier an Autophagie beteiligt sind (Mizushima et al., 1998; Kabeya et al., 2000; Mizushima et al., 2001). Die meisten der identifizierten Proteine sind für die Ausbildung der Autophagosomen-Membran notwendig (Übersicht bei Ohsumi, 2001). Eine Schlüsselrolle spielen insbesondere hApg5, hApg7, hApg12 und LC3 (hApg8).

Ein wichtiger Indikator für eine aktive Ausbildung von Autophagosomen ist die Überführung des LC3-Proteins von einer zytoplasmatischen Vorläuferform (LC3-I) in eine an die Autophagosomen-Membran gebundene Form (LC3-II) durch hApg5, hApg7 und hApg12.

Unter Einbeziehung dieser Daten konnte für die verwendeten Zelllinien gezeigt werden, daß Transkripte für diese Proteine vorhanden sind. Weiterhin konnte durch Verwendung eines LC3-spezifischen Antikörpers, mit dem beide Formen des Proteins identifiziert werden können, nachgewiesen werden, daß es in den Zellen zur aktiven Ausbildung von Autophagosomen kommt. Der Inhibitor der Wahl für Autophagie ist 3-Methyladenin (3-MA). Der dieser Inhibition zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist allerdings noch unbekannt.

Unter 3-MA Behandlung wird effizient die Ausbildung neuer Autophagosomen verhindert, ohne dabei in andere zelluläre Abläufe (insbesondere Endozytose und Vesikeltransport) einzugreifen (Seglen und Gordon, 1982). Im Falle des NeoR-Proteins hatte die Inkubation NeoR-transfizierter Zellen mit 3-MA eine starke Anreicherung des Proteins zur Folge. Durch die gleichzeitige Inhibition der Translation (Cycloheximid) konnte sichergestellt werden, daß der Grund für diese Anreicherung eine Inhibition der Degradation und nicht eine Stimulation der Transkription/Translation war. Zusätzlich dazu konnte sowohl auf biochemischer, als auch auf Ebene der Antigenpräsentation gezeigt werden, daß 3-MA den Import von NeoR in Endosomen verhindert und die Präsentation des NeoR-Peptides im Kontext von MHC-Klasse-II stark reduziert. Als Spezifitätskontrolle wurde exogen zugeführtes Protein verwendet, daß durch die direkte Aufnahme in Endosomen unabhängig von diesem Inhibitor sein sollte. Erwartungsgemäß hatte keine der verwendeten Inhibitorkonzentrationen einen signifikanten Einfluß auf die Präsentation des exogenen Proteins. Weiterhin wurde beobachtet, daß sich der Grad der Inhibition zwischen professionellen APCs (LCL 1.11: maximale Inhibition ca. 60%) und nicht-professionellen APCs (RCC 1.24-NeoR: maximale Inhibition ca. 90%) unterscheidet. Um sicherzustellen, daß die beobachtete Inhibition in LCL 1.11 auf die spezifische Wirkung des Inhibitors zurückzuführen ist, wurde Autophagie zusätzlich durch Wortmannin blockiert. Auch dieser Inhibitor unterdrückte die Präsentation des NeoR-Peptides in gleichem Ausmaß. Da nicht bekannt ist, welche physiologischen Stimuli in diesen Zelltypen die kontinuierliche Autophagie beeinflussen, ist es vorstellbar, daß die klassischen Inhibitoren (3-MA und Wortmannin) Autophagie nicht in allen Zellen mit gleicher Effizienz hemmen. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, daß es in professionellen APCs zusätzliche Mechanismen für endogene Antigenpräsentation gibt. Eine weitergehende Untersuchung auf biochemischer Ebene war in diesem Zelltyp aufgrund der sehr niedrigen Proteinexpression nicht möglich. Dennoch bleibt festzuhalten, daß zum ersten Mal die entscheidende Rolle der Autophagie für die endogene Präsentation zytosolischer Proteine sowohl in professionellen als auch in nicht-professionellen APCs demonstriert werden konnte. Außerdem ist es erstmals gelungen, alle bisher mit endogener Antigenpräsentation in Verbindung gebrachten zellulären Komponenten innerhalb eines experimentellen Systems zu untersuchen. Dies gewährleistet ein hohes Maß der Vergleichbarkeit der einzelnen Ergebnisse.

Die Untersuchung des Präsentationsweges in zwei unterschiedlichen Zelllinien unter gleichen Bedingungen und mit gleichem Ergebnis ist ein weiteres wichtiges Argument für die Validität der hier erhobenen Befunde.

## 5.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse geben Anlaß zu einer Vielzahl weitergehender Studien. Im etablierten NeoR-Modellsystem soll ergänzend zu den Antigenpräsentationsexperimenten mit den chemischen Inhibitoren die Aufnahme von NeoR in Autophagosomen durch elektronenmikroskopische Darstellung gezeigt werden. Weiterhin soll vor allem die Allgemeingültigkeit des Präsentationsweges für bereits etablierte (Influenza Matrix-Protein) und neue zytoplasmatische Modellantigene überprüft werden. Hierfür sollen CD4<sup>+</sup> T-Zellklone hergestellt werden, die Peptide dieser Proteine im Kontext von MHC-Klasse-II erkennen. Außerdem soll untersucht werden, inwieweit die endogene Präsentation nukleärer Proteine (z.B. Nukleoprotein des Masern-Virus) von dieser Form des Proteintransports in das endosomale System abhängt.

Des weiteren deuten die in dieser Arbeit erhaltenen Daten darauf hin, daß es zwischen dem endogenen MHC-Klasse-II- und dem klassischen MHC-Klasse-I-Präsentationsweg zu einer Konkurrenz um zytoplasmatische Antigene (Proteine) kommt. Um dies zu untersuchen, soll zusätzlich zu dem vorhandenen CD4<sup>+</sup> T-Zellklon 20-4/A4 versucht werden, einen CD8<sup>+</sup> NeoR-spezifischen T-Zellklon zu generieren. Wenn für das gleiche Antigen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellklone vorhanden sind, kann untersucht werden, inwieweit eine Inhibition des einen Präsentationsweges zu einer Verstärkung der Antigenpräsentation in dem anderen Präsentationsweg führt. Es wäre denkbar, daß in verschiedenen Zelltypen (professionelle- und nicht-professionelle APCs) aufgrund unterschiedlicher Aktivität der proteolytischen Systeme entweder die Proteasom- oder die Autophagie-vermittelte Degradation zytoplasmatischer Proteine überwiegt. Dies würde zu einer präferentiellen Herstellung MHC-Klasse-I-, bzw. MHC-Klasse-II-restringierter Peptide führen.

## 6 Zusammenfassung

Die endogene Präsentation von intrazellulären Antigenen auf MHC-Klasse-II-Molekülen ist von zentraler Bedeutung für eine Reihe immunologischer Prozesse. Die diesem Präsentationsweg zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind noch weitgehend unverstanden.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Abläufe zu leisten, die an diesem endogenen MHC-Klasse-II-Präsentationsweg beteiligt sind. Am Beispiel des zytoplasmatischen/nukleären Modellantigens Neomycin-Phosphotransferase (NeoR) und eines Modellantigen-spezifischen, MHC-Klasse-II-restringierten CD4<sup>+</sup> T-Zell Klons wurde der endogene Präsentationsweg in nicht-professionellen und professionellen antigenpräsentierenden Zellen untersucht.

Eine Beteiligung von Schlüsselkomponenten des MHC-Klasse-I-Präsentationsweges konnte durch die Verwendung chemischer und biologischer Inhibitoren ebenso ausgeschlossen werden, wie eine vorzeitige Beladung von neu-synthetisierten MHC-Klasse-II-Molekülen im endoplasmatischen Retikulum. Dagegen erwies sich die endogene Präsentation des Modellantigens abhängig von endosomaler/lysosomaler Prozessierung. Durch biochemische und zellbiologische Methoden konnte nachgewiesen werden, daß das Antigen als intaktes Protein in Endosomen/Lysosomen gelangt. Eine mögliche Sekretion des Antigens und anschließende Wiederaufnahme in endosomale Kompartimente konnte durch Zellkulturüberstand-Transferexperimente als Transportmechanismus ausgeschlossen werden. Durch Inhibitor-Studien und der Beschreibung der Endosomen als Eintrittsort des Antigens in das endosomale/lysosomale System konnte gezeigt werden, daß ein Signalsequenz-vermittelter Import in Lysosomen durch Hitzeschockproteine nicht als Mechanismus in Frage kommt. Dagegen wies die Expression Autophagie-assoziiierter Proteine in den verwendeten Zelllinien auf eine mögliche Beteiligung dieses zytoplasmatischen Abbauvorganges an der Präsentation des Antigens hin. Eine Inhibition der Autophagie führte zu einer Stabilisierung und Anreicherung des Proteins im Zytoplasma sowie zu einer verminderten Aufnahme des Antigens in das endosomale/lysosomale Kompartiment. Die verminderte Aufnahme korrelierte mit einer starken Abnahme der MHC-Klasse-II-restringierten Präsentation des Antigens. Diese Ergebnisse identifizieren Autophagie am Beispiel des Modellantigens NeoR als den verantwortlichen molekularen Mechanismus für die endogene MHC-Klasse-II-restringierte Antigenpräsentation.

## 7 Literatur

**Albert, M. L., B. Sauter and N. Bhardwaj** (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. Nature 392(6671): 86-9.

**Alcami, A. and U. H. Koszinowski** (2000). Viral mechanisms of immune evasion. Immunol Today 21(9): 447-55.

**Anderson, M. S. and J. Miller** (1992). Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. Proc Natl Acad Sci U S A 89(6): 2282-6.

**Armstrong, T. D., V. K. Clements, B. K. Martin, J. P. Ting and S. Ostrand-Rosenberg** (1997). Major histocompatibility complex class II-transfected tumor cells present endogenous antigen and are potent inducers of tumor-specific immunity. Proc Natl Acad Sci U S A 94(13): 6886-91.

**Arunachalam, B., U. T. Phan, H. J. Geuze and P. Cresswell** (2000). Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). Proc Natl Acad Sci U S A 97(2): 745-50.

**Avva, R. R. and P. Cresswell** (1994). In vivo and in vitro formation and dissociation of HLA-DR complexes with invariant chain-derived peptides. Immunity 1(9): 763-74.

**Bakke, O. and B. Dobberstein** (1990). MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. Cell 63(4): 707-16.

**Beninga, J., K. L. Rock and A. L. Goldberg** (1998). Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. J Biol Chem 273(30): 18734-42.

**Berg, T. O., M. Fengsrud, P. E. Stromhaug, T. Berg and P. O. Seglen** (1998). Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. J Biol Chem 273(34): 21883-92.

**Bevan, M. J.** (1976). Minor H Antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. J Immunol 117(6): 2233-38.

**Bevec, T., V. Stoka, G. Pungercic, I. Dolenc and V. Turk** (1996). Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. J Exp Med 183(4): 1331-8.

**Bochtler, M., L. Ditzel, M. Groll, C. Hartmann and R. Huber** (1999). The proteasome. Annu Rev Biophys Biomol Struct 28: 295-317.

**Bonifacino, J. S. and A. M. Weissman** (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. Annu Rev Cell Dev Biol 14: 19-57.

- Braciale, T. J., L. A. Morrison, M. T. Sweetser, J. Sambrook, M. J. Gething and V. L. Braciale** (1987). Antigen presentation pathways to class I and class II MHC-restricted T lymphocytes. Immunol Rev 98: 95-114.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-54.
- Brichard, V., A. Van Pel, T. Wolfel, C. Wolfel, E. De Plaen, B. Lethe, P. Coulie and T. Boon** (1993). The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. J Exp Med 178(2): 489-95.
- Brooks, A., S. Hartley, L. Kjer-Nielsen, J. Perera, C. C. Goodnow, A. Basten and J. McCluskey** (1991). Class II-restricted presentation of an endogenously derived immunodominant T-cell determinant of hen egg lysozyme. Proc Natl Acad Sci U S A 88(8): 3290-4.
- Brooks, A. G. and J. McCluskey** (1993). Class II-restricted presentation of a hen egg lysozyme determinant derived from endogenous antigen sequestered in the cytoplasm or endoplasmic reticulum of the antigen presenting cells. J Immunol 150(9): 3690-7.
- Busch, R., R. C. Doebele, N. S. Patil, A. Pashine and E. D. Mellins** (2000). Accessory molecules for MHC class II peptide loading. Curr Opin Immunol 12(1): 99-106.
- Carbone, F. R. and M. J. Bevan** (1990). Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. J Exp Med 171(2): 377-87.
- Castellino, F. and R. N. Germain** (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(1): 73-88.
- Castellino, F., F. Zappacosta, J. E. Coligan and R. N. Germain** (1998). Large protein fragments as substrates for endocytic antigen capture by MHC class II molecules. J Immunol 161(8): 4048-57.
- Chardin, P. and F. McCormick** (1999). Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. Cell 97(2): 153-5.
- Chen, B. P., A. Madrigal and P. Parham** (1990). Cytotoxic T cell recognition of an endogenous class I HLA peptide presented by a class II HLA molecule. J Exp Med 172(3): 779-88.
- Chiang, H. L., S. R. Terlecky, C. P. Plant and J. F. Dice** (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. Science 246(4928): 382-5.
- 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.

**Chicz, R. M., R. G. Urban, W. S. Lane, J. C. Gorga, L. J. Stern, D. A. Vignali and J. L. Strominger** (1992). Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. Nature 358(6389): 764-8.

**Craiu, A., M. Gaczynska, T. Akopian, C. F. Gramm, G. Fenteany, A. L. Goldberg and K. L. Rock** (1997). Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. J Biol Chem 272(20): 13437-45.

**Cresswell, P.** (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. Annu Rev Immunol 12: 259-93.

**Cuervo, A. M., and Dice, J.F.** (1998). Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. J Mol Med. 76: 6-12.

**Deng, H., R. Apple, M. Clare-Salzler, S. Trembleau, D. Mathis, L. Adorini and E. Sercarz** (1993). Determinant capture as a possible mechanism of protection afforded by major histocompatibility complex class II molecules in autoimmune disease. J Exp Med 178(5): 1675-80.

**Dice, J. F.** (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. Trends Biochem Sci 15(8): 305-9.

**Diederichsen, A. C., A. C. Stenholm, O. Kronborg, C. Fenger, J. C. Jensenius, J. Zeuthen, P. B. Christensen, T. Kristensen and A. C. Ostenhom** (1998). Flow cytometric investigation of immune-response-related surface molecules on human colorectal cancers. Int J Cancer 79(3): 283-7.

**Dongre, A. R., S. Kovats, P. deRoos, A. L. McCormack, T. Nakagawa, V. Paharkova-Vatchkova, J. Eng, H. Caldwell, J. R. Yates, 3rd and A. Y. Rudensky** (2001). In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. Eur J Immunol 31(5): 1485-94.

**Dunn, W. A., Jr.** (1990). Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. J Cell Biol 110(6): 1923-33.

**Fenteany, G., R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey and S. L. Schreiber** (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. Science 268(5211): 726-31.

**Fernandes, D. M., L. Vidard and K. L. Rock** (2000). Characterization of MHC class II-presented peptides generated from an antigen targeted to different endocytic compartments. Eur J Immunol 30(8): 2333-43.

**Fling, S. P., B. Arp and D. Pious** (1994). HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. Nature 368(6471): 554-8.

**Fruh, K., K. Ahn, H. Djaballah, P. Sempe, P. M. van Endert, R. Tampe, P. A. Peterson and Y. Yang** (1995). A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. Nature 375(6530): 415-8.

**Gavioli, R., T. Frisan, S. Vertuani, G. W. Bornkamm and M. G. Masucci** (2001). c-myc overexpression activates alternative pathways for intracellular proteolysis in lymphoma cells. Nat Cell Biol 3(3): 283-8.

**Geier, E., G. Pfeifer, M. Wilm, M. Lucchiari-Hartz, W. Baumeister, K. Eichmann and G. Niedermann** (1999). A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. Science 283(5404): 978-81.

**Glas, R., M. Bogyo, J. S. McMaster, M. Gaczynska and H. L. Ploegh** (1998). A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. Nature 392(6676): 618-22.

**Gordon, P. B. and P. O. Seglen** (1988). Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. Biochem Biophys Res Commun 151(1): 40-7.

**Grande, A. G., 3rd, P. J. Lehner, P. Cresswell and T. Spies** (1997). Regulation of MHC class I heterodimer stability and interaction with TAP by tapasin. Immunogenetics 46(6): 477-83.

**Gueguen, M. and E. O. Long** (1996). Presentation of a cytosolic antigen by major histocompatibility complex class II molecules requires a long-lived form of the antigen. Proc Natl Acad Sci U S A 93(25): 14692-7.

**Hartl, F. U.** (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature 381(6583): 571-9.

**Hilders, C. G., J. G. Houbiers, H. H. van Ravenswaay Claasen, R. W. Veldhuizen and G. J. Fleuren** (1993). Association between HLA-expression and infiltration of immune cells in cervical carcinoma. Lab Invest 69(6): 651-9.

**Hitzel, C., P. van Endert and N. Koch** (1995). Acquisition of peptides by MHC class II polypeptides in the absence of the invariant chain. J Immunol 154(3): 1048-56.

**Hoeger, P. H., M. A. Tepper, A. Faith, J. A. Higgins, J. R. Lamb and R. S. Geha** (1994). Immunosuppressant deoxyspergualin inhibits antigen processing in monocytes. J Immunol 153(9): 3908-16.

**Humbert, M., P. Bertolino, F. Forquet, C. Rabourdin-Combe, D. Gerlier, J. Davoust and J. Salamero** (1993). Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of secreted and endoplasmic reticulum resident antigens requires the invariant chains and is sensitive to lysosomotropic agents. Eur J Immunol 23(12): 3167-72.

**Hunt, D. F., H. Michel, T. A. Dickinson, J. Shabanowitz, A. L. Cox, K. Sakaguchi, E. Appella, H. M. Grey and A. Sette** (1992). Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. Science 256(5065): 1817-20.

- Jackson, P. A., M. A. Green, C. G. Marks, R. J. King, R. Hubbard and M. G. Cook** (1996). Lymphocyte subset infiltration patterns and HLA antigen status in colorectal carcinomas and adenomas. Gut 38(1): 85-9.
- Jacobson, S., R. P. Sekaly, C. L. Jacobson, H. F. McFarland and E. O. Long** (1989). HLA class II-restricted presentation of cytoplasmic measles virus antigens to cytotoxic T cells. J Virol 63(4): 1756-62.
- Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport, M.** (1999). Immunobiology. London, Elsevier Science.
- Jaraquemada, D., M. Marti and E. O. Long** (1990). An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. J Exp Med 172(3): 947-54.
- Jay, G., Jay, F.T., Chang, C., Friedman, R.M., and Levine, A.S.** (1978). Tumor-specific transplantation antigen: Use of Ad2+ND1 hybrid virus to identify the protein responsible for simian virus 40 tumor rejection and its genetic origin. Proc Natl Acad Sci U S A 75: 3055-59.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi and T. Yoshimori** (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. Embo J 19(21): 5720-8.
- Klein, L. and B. Kyewski** (2000). Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. Curr Opin Immunol 12(2): 179-86.
- Kloetzel, P. M.** (2001). Antigen processing by the proteasome. Nat Rev Mol Cell Biol 2(3): 179-87.
- Koopmann, J. O., J. Albring, E. Huter, N. Bulbuc, P. Spee, J. Neefjes, G. J. Hammerling and F. Momburg** (2000). Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. Immunity 13(1): 117-27.
- Kropshofer, H., A. B. Vogt, C. They, E. A. Armandola, B. C. Li, G. Moldenhauer, S. Amigorena and G. J. Hammerling** (1998). A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. Embo J 17(11): 2971-81.
- Lamb, C. A., J. W. Yewdell, J. R. Bennink and P. Cresswell** (1991). Invariant chain targets HLA class II molecules to acidic endosomes containing internalized influenza virus. Proc Natl Acad Sci U S A 88(14): 5998-6002.
- Lechler, R., G. Aichinger and L. Lightstone** (1996). The endogenous pathway of MHC class II antigen presentation. Immunol Rev 151: 51-79.
- Lich, J. D., J. F. Elliott and J. S. Blum** (2000). Cytoplasmic processing is a prerequisite for presentation of an endogenous antigen by major histocompatibility complex class II proteins. J Exp Med 191(9): 1513-24.

- Liljedahl, M., O. Winqvist, C. D. Surh, P. Wong, K. Ngo, L. Teyton, P. A. Peterson, A. Brunmark, A. Y. Rudensky, W. P. Fung-Leung and L. Karlsson** (1998). Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8(2): 233-43.
- Liou, W., H. J. Geuze, M. J. Geelen and J. W. Slot** (1997). The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol* 136(1): 61-70.
- Lippincott-Schwartz, J., L. Yuan, C. Tipper, M. Amherdt, L. Orci and R. D. Klausner** (1991). Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 67(3): 601-16.
- Loss, G. E., Jr. and A. J. Sant** (1993). Invariant chain retains MHC class II molecules in the endocytic pathway. *J Immunol* 150(8 Pt 1): 3187-97.
- Malnati, M. S., M. Marti, T. LaVaute, D. Jaraquemada, W. Biddison, R. DeMars and E. O. Long** (1992). Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* 357(6380): 702-4.
- Manici, S., T. Sturniolo, M. A. Imro, J. Hammer, F. Sinigaglia, C. Noppen, G. Spagnoli, B. Mazzi, M. Bellone, P. Dellabona and M. P. Protti** (1999). Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11. *J Exp Med* 189(5): 871-6.
- Manoury, B., E. W. Hewitt, N. Morrice, P. M. Dando, A. J. Barrett and C. Watts** (1998). An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation. *Nature* 396(6712): 695-9.
- Marelli-Berg, F. M. and R. I. Lechler** (1999). Antigen presentation by parenchymal cells: a route to peripheral tolerance? *Immunol Rev* 172: 297-314.
- Mellman, I. and R. M. Steinman** (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106(3): 255-8.
- Mizushima, N., H. Sugita, T. Yoshimori and Y. Ohsumi** (1998). A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem* 273(51): 33889-92.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Hatano, Y. Kobayashi, Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Tokuhisa, Y. Ohsumi and T. Yoshimori** (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152(4): 657-68.
- Moreno, J., D. A. Vignali, F. Nadimi, S. Fuchs, L. Adorini and G. J. Hammerling** (1991). Processing of an endogenous protein can generate MHC class II-restricted T cell determinants distinct from those derived from exogenous antigen. *J Immunol* 147(10): 3306-13.
- Moretti, S., C. Pinzi, E. Berti, A. Spallanzani, A. Chiarugi, V. Boddi, U. M. Reali and B. Giannotti** (1997). In situ expression of transforming growth factor beta is associated with melanoma progression and correlates with Ki67, HLA-DR and beta 3 integrin expression. *Melanoma Res* 7(4): 313-21.

- Morrison, L. A., A. E. Lukacher, V. L. Braciale, D. P. Fan and T. J. Braciale** (1986). Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. J Exp Med 163(4): 903-21.
- Mosse, C. A., L. Meadows, C. J. Luckey, D. J. Kittlesen, E. L. Huczko, C. L. Slingluff, J. Shabanowitz, D. F. Hunt and V. H. Engelhard** (1998). The class I antigen-processing pathway for the membrane protein tyrosinase involves translation in the endoplasmic reticulum and processing in the cytosol. J Exp Med 187(1): 37-48.
- Mukherjee, P., A. Dani, S. Bhatia, N. Singh, A. Y. Rudensky, A. George, V. Bal, S. Mayor and S. Rath** (2001). Efficient presentation of both cytosolic and endogenous transmembrane protein antigens on mhc class ii is dependent on cytoplasmic proteolysis. J Immunol 167(5): 2632-41.
- Mumberg, D., P. A. Monach, S. Wanderling, M. Philip, A. Y. Toledano, R. D. Schreiber and H. Schreiber** (1999). CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. Proc Natl Acad Sci U S A 96(15): 8633-8.
- Nadeau, K., S. G. Nadler, M. Saulnier, M. A. Tepper and C. T. Walsh** (1994). Quantitation of the interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin and analogs with Hsc70 and Hsp90. Biochemistry 33(9): 2561-7.
- Nadler, S. G., M. A. Tepper, B. Schacter and C. E. Mazzucco** (1992). Interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin with a member of the Hsp70 family of heat shock proteins. Science 258(5081): 484-6.
- Nakagawa, T., W. Roth, P. Wong, A. Nelson, A. Farr, J. Deussing, J. A. Villadangos, H. Ploegh, C. Peters and A. Y. Rudensky** (1998). Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. Science 280(5362): 450-3.
- Nakagawa, T. Y., W. H. Brissette, P. D. Lira, R. J. Griffiths, N. Petrushova, J. Stock, J. D. McNeish, S. E. Eastman, E. D. Howard, S. R. Clarke, E. F. Rosloniec, E. A. Elliott and A. Y. Rudensky** (1999). Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. Immunity 10(2): 207-17.
- Neat, C. E., M. S. Thomassen and H. Osmundsen** (1981). Effects of high-fat diets on hepatic fatty acid oxidation in the rat. Isolation of rat liver peroxisomes by vertical-rotor centrifugation by using a self-generated, iso-osmotic, Percoll gradient. Biochem J 196(1): 149-59.
- Neefjes, J. J. and H. L. Ploegh** (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(2): 411-6.
- Nelson, C. A., I. Vidavsky, N. J. Viner, M. L. Gross and E. R. Unanue** (1997). Amino-terminal trimming of peptides for presentation on major histocompatibility complex class II molecules. Proc Natl Acad Sci U S A 94(2): 628-33.
- Newcomb, J. R. and P. Cresswell** (1993). Characterization of endogenous peptides bound to purified HLA-DR molecules and their absence from invariant chain-associated alpha beta dimers. J Immunol 150(2): 499-507.

- Norbury, C. C., M. F. Princiotta, I. Bacik, R. R. Brutkiewicz, P. Wood, T. Elliott, J. R. Bennink and J. W. Yewdell** (2001). Multiple antigen-specific processing pathways for activating naive CD8+ T cells in vivo. J Immunol 166(7): 4355-62.
- Nuchtern, J. G., W. E. Biddison and R. D. Klausner** (1990). Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. Nature 343(6253): 74-6.
- Ogrinc, T., I. Dolenc, A. Ritonja and V. Turk** (1993). Purification of the complex of cathepsin L and the MHC class II-associated invariant chain fragment from human kidney. FEBS Lett 336(3): 555-9.
- Ohsumi, Y.** (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. Nat Rev Mol Cell Biol 2(3): 211-6.
- Oxenius, A., M. F. Bachmann, P. G. Ashton-Rickardt, S. Tonegawa, R. M. Zinkernagel and H. Hengartner** (1995). Presentation of endogenous viral proteins in association with major histocompatibility complex class II: on the role of intracellular compartmentalization, invariant chain and the TAP transporter system. Eur J Immunol 25(12): 3402-11.
- Pamer, E. and P. Cresswell** (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. Annu Rev Immunol 16: 323-58.
- Panjwani, N., O. Akbari, S. Garcia, M. Brazil and B. Stockinger** (1999). The HSC73 molecular chaperone: involvement in MHC class II antigen presentation. J Immunol 163(4): 1936-42.
- Pardoll, D. M. and S. L. Topalian** (1998). The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. Curr Opin Immunol 10(5): 588-94.
- Pertoft, H.** (2000). Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. J Biochem Biophys Methods 44(1-2): 1-30.
- Pertoft, H., T. C. Laurent, T. Laas and L. Kagedal** (1978). Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). Anal Biochem 88(1): 271-82.
- Pierre, P. and I. Mellman** (1998 a). Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. Cell 93(7): 1135-45.
- Pierre, P. and I. Mellman** (1998 b). Exploring the mechanisms of antigen processing by cell fractionation. Curr Opin Immunol 10(2): 145-53.
- Pieters, J.** (2000). MHC class II-restricted antigen processing and presentation. Adv Immunol 75: 159-208.
- Pinet, V., M. Vergelli, R. Martin, O. Bakke and E. O. Long** (1995). Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. Nature 375(6532): 603-6.
- Pinet, V. M. and E. O. Long** (1998). Peptide loading onto recycling HLA-DR molecules occurs in early endosomes. Eur J Immunol 28(3): 799-804.

- Polydefkis, M., S. Koenig, C. Flexner, E. Obah, K. Gebo, S. Chakrabarti, P. L. Earl, B. Moss and R. F. Siliciano** (1990). Anchor sequence-dependent endogenous processing of human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160 for CD4+ T cell recognition. J Exp Med 171(3): 875-87.
- Qi, L., J. M. Rojas and S. Ostrand-Rosenberg** (2000). Tumor cells present MHC class II-restricted nuclear and mitochondrial antigens and are the predominant antigen presenting cells in vivo. J Immunol 165(10): 5451-61.
- Rammensee, H. G., Bachmann, J., Stevanovic, S** (1997). MHC Ligands and Peptide Motifs. Springer Verlag.
- Rammensee, H. G., K. Falk and O. Rotzschke** (1993). MHC molecules as peptide receptors. Curr Opin Immunol 5(1): 35-44.
- Rechsteiner, M., C. Realini and V. Ustrell** (2000). The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. Biochem J 345(Pt 1): 1-15.
- Riese, R. J., P. R. Wolf, D. Bromme, L. R. Natkin, J. A. Villadangos, H. L. Ploegh and H. A. Chapman** (1996). Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. Immunity 4(4): 357-66.
- 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: 392-4.
- Rock, K. L., Gamble, S., Rothstein, L., Gramm, C., Benacerraf, B.** (1991). Dissociation of b2-microglobulin leads to the accumulation of a substantial pool of inactive class I MHC heavy chains on the cell surface. Cell 65: 611-20.
- Rock, K. L. and A. L. Goldberg** (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. Annu Rev Immunol 17: 739-79.
- Rock, K. L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang and A. L. Goldberg** (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. Cell 78(5): 761-71.
- Rodriguez, A., A. Regnault, M. Kleijmeer, P. Ricciardi-Castagnoli and S. Amigorena** (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. Nat Cell Biol 1(6): 362-8.
- Rudensky, A., P. Preston-Hurlburt, S. C. Hong, A. Barlow and C. A. Janeway, Jr.** (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. Nature 353(6345): 622-7.
- Sambrook, J., Fritsch E.F., and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sant, A. J.** (1994). Endogenous antigen presentation by MHC class II molecules. Immunol Res 13(4): 253-67.

**Schmid, S. L.** (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. Annu Rev Biochem 66: 511-48.

**Schrader, J. W., and Edelman, G.M.** (1977). Joint recognition by cytotoxic T cells of inactivated Sendai virus and products of the major histocompatibility complex. J Exp Med 145: 523-39.

**Schroter, C. J., M. Braun, J. Englert, H. Beck, H. Schmid and H. Kalbacher** (1999). A rapid method to separate endosomes from lysosomal contents using differential centrifugation and hypotonic lysis of lysosomes. J Immunol Methods 227(1-2): 161-8.

**Seglen, P. O. and P. Bohley** (1992). Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. Experientia 48(2): 158-72.

**Seglen, P. O. and P. B. Gordon** (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 79(6): 1889-92.

**Shen, Z., G. Reznikoff, G. Dranoff and K. L. Rock** (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. J Immunol 158(6): 2723-30.

**Shi, G. P., J. A. Villadangos, G. Dranoff, C. Small, L. Gu, K. J. Haley, R. Riese, H. L. Ploegh and H. A. Chapman** (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. Immunity 10(2): 197-206.

**Sigal, L. J., S. Crotty, R. Andino and K. L. Rock** (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. Nature 398(6722): 77-80.

**Simons, J. W., E. M. Jaffee, C. E. Weber, H. I. Levitsky, W. G. Nelson, M. A. Carducci, A. J. Lazenby, L. K. Cohen, C. C. Finn, S. M. Clift, K. M. Hauda, L. A. Beck, K. M. Leiferman, A. H. Owens, Jr., S. Piantadosi, G. Dranoff, R. C. Mulligan, D. M. Pardoll and F. F. Marshall** (1997). Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. Cancer Res 57(8): 1537-46.

**Sloan, V. S., P. Cameron, G. Porter, M. Gammon, M. Amaya, E. Mellins and D. M. Zaller** (1995). Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. Nature 375(6534): 802-6.

**Srivastava, P. K., H. Udono, N. E. Blachere and Z. Li** (1994). Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. Immunogenetics 39(2): 93-8.

**Stoltze, L., M. Schirle, G. Schwarz, C. Schroter, M. W. Thompson, L. B. Hersh, H. Kalbacher, S. Stevanovic, H. G. Rammensee and H. Schild** (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. Nat Immunol 1(5): 413-8.

**Stromhaug, P. E., T. O. Berg, M. Fengsrud and P. O. Seglen** (1998). Purification and characterization of autophagosomes from rat hepatocytes. Biochem J 335(Pt 2): 217-24.

**Stryhn, A., Pedersen, L.O., Romme, T., Olsen, A.C., Nissen, M.H., Thorpe, C.J., and Buus, S.** (1996). pH dependence of MHC class I-restricted peptide presentation. J Immunol 156: 4191-97.

**Swanson, J. A., and Watts, C.** (1995). Macropinocytosis. Trends Cell Biol. 5: 428.

**Teter, S. A. and D. J. Klionsky** (2000). Transport of proteins to the yeast vacuole: autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting, and role of the vacuole in degradation. Semin Cell Dev Biol 11(3): 173-9.

**Townsend, A., C. Ohlen, J. Bastin, H. G. Ljunggren, L. Foster and K. Karre** (1989). Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. Nature 340(6233): 443-8.

**Trieb, K., T. Lechleitner, S. Lang, R. Windhager, R. Kotz and S. Dirnhofer** (1998). Evaluation of HLA-DR expression and T-lymphocyte infiltration in osteosarcoma. Pathol Res Pract 194(10): 679-84.

**Turley, S. J., K. Inaba, W. S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R. M. Steinman and I. Mellman** (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. Science 288(5465): 522-7.

**Uebel, S., W. Kraas, S. Kienle, K. H. Wiesmuller, G. Jung, R. Tampe, D. Beinert and L. Neumann** (1997). Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries Structure of the viral TAP-inhibitor ICP47 induced by membrane association. Proc Natl Acad Sci U S A 94(17): 8976-81.

**Vanbuskirk, A., B. L. Crump, E. Margoliash and S. K. Pierce** (1989). A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 heat shock family. J Exp Med 170(6): 1799-809.

**Villadangos, J. A. and H. L. Ploegh** (2000). Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? Immunity 12(3): 233-9.

**Vogt, A. B. and H. Kropshofer** (1999). HLA-DM - an endosomal and lysosomal chaperone for the immune system. Trends Biochem Sci 24(4): 150-4.

**Wang, R. F.** (2001). The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. Trends Immunol 22(5): 269-76.

**Wang, R. F., X. Wang, A. C. Atwood, S. L. Topalian and S. A. Rosenberg** (1999). Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. Science 284(5418): 1351-4.

**Watts, C.** (2001). Antigen processing in the endocytic compartment. Curr Opin Immunol 13(1): 26-31.

**Weiss, S. and B. Bogen** (1991). MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen. Cell 64(4): 767-76.

**Wiktor, T. J., P. C. Doherty and H. Koprowski** (1977). In vitro evidence of cell-mediated immunity after exposure of mice to both live and inactivated rabies virus. Proc Natl Acad Sci U S A 74(1): 334-8.

**Wolfel, T., A. Van Pel, V. Brichard, J. Schneider, B. Seliger, K. H. Meyer zum Buschenfelde and T. Boon** (1994). Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. Eur J Immunol 24(3): 759-64.

**Wood, S. A., J. E. Park and W. J. Brown** (1991). Brefeldin A causes a microtubule-mediated fusion of the trans-Golgi network and early endosomes. Cell 67(3): 591-600.

**Wubbolts, R. and J. Neefjes** (1999). Intracellular transport and peptide loading of MHC class II molecules: regulation by chaperones and motors. Immunol Rev 172: 189-208.

**Yewdell, J. W. and J. R. Bennink** (1999 a). Mechanisms of viral interference with MHC class I antigen processing and presentation. Annu Rev Cell Dev Biol 15: 579-606.

**Yewdell, J. W., Norbury, C:C., Bennink, J.R.** (1999 b). Mechanisms of Exogenous Antigen Presentation by MHC Class I Molecules in Vitro and in Vivo: Implications for Generating CD8+ T Cell Responses to Infectious Agents, Tumors, Transplants, and Vaccines. Adv Immunol 73: 1-77.

**Yewdell, J. W., Bennink, J.R., and Hosaka, Y.** (1988). Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes. Science 239: 637-40.

**Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty** (1979). MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. Adv Immunol 27: 51-177.

## 8 Anhang

### A) Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	micro
Abb.	Abbildung
AEP	Aspartyl-Endoprotease
APC	antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
β <sub>2</sub> -M	β <sub>2</sub> -Mikroglobulin
BiP	ER residentes Chaperon („binding protein“)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CIIV	MHC-Klasse-II Vesikel
cDNA	komplementäre DNA
CHX	Cycloheximid
CIP	„calf intestine phosphatase“
CLIP	MHC-Klasse-II-assoziiertes Peptid der invarianten Kette
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CTP	Cytidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	dendritische Zelle(n)
DTAF	Dichlorotriazenyl Amino Fluorescein
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DL	Tageslicht („day light“)
DOC	Deoxycholin-Essigsäure
DSG	Methyldeoxyspergualin

DTT	Dithiothreitol
ECL	„enhanced chemoluminescence“
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetracetat
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
Endo.	Endosomen
ER	endoplasmatisches Retikulum
exo.	exogen
FACS	„fluorescence activated cell sorting“
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
xg	fache Erdbeschleunigung
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GILT	Interferon- $\gamma$ induzierbare Thiolreduktase
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
Golgi	Golgi-Apparat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
hApg	humanes Homolog des S. cerevisiae „Autophagie related protein“
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HLA	Humanes Leukozytenantigen
Hsc	„heat shock cognate protein“ (konstitutive Form)
Hsp	Hitzeschockprotein (induzierbare Form)
ICP47	Protein des humanen Herpes Simplex Virus
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Il	Interleukin
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter

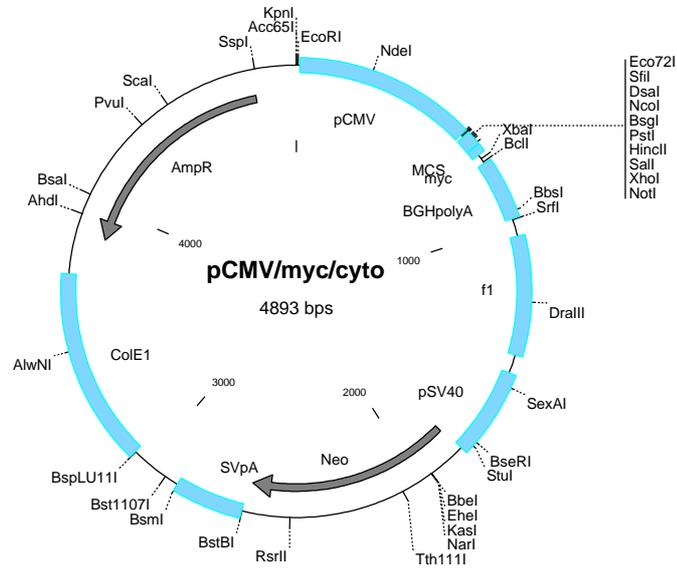
Lamp	Lysosomen assoziiertes Membranprotein
LC3	„microtubule associated protein 1 light chain 3“ Protein
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
li	invariante Kette
liP	Degradationsprodukte der invarianten Kette
LMP	Protein des Proteasoms („low molecular weight protein“)
Lyso.	Lysosomen
M	Molar
MIIC	MHC-Klasse-II Kompartiment
3-MA	3-Methyladenin
MDCK	„Madin-Darby-Canine Kidney“-Zellen
mF	Millifarad
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mHA	Minor-Histocompatibilitätsantigen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten („messenger“) Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEAA	Nicht essentielle Aminosäuren
NeoR	Neomycin-Phosphotransferase Resistenzgen
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAPC	professionelle APC
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
P <sub>cmv</sub>	Promotor des CMV-Virus

PFA	Paraformaldehyd
PFU	Polymerase mit „proof reading“ Kapazität
pg	Picogramm
PGPH	Proteolytische Aktivität des Proteasoms (Peptidyl post Glutamyl)
PI	Propidiumjodid
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p. Tr	nach Transfektion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RCC	Nierenkarzinomzelllinie („renal carcinoma cell“)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions PCR
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAP	„transporter associated with antigen processing“
TBS	Tris-gepufferte Saline
TE	Tris-EDTA Puffer
TEC	Thymuskortex-Epithelzellen
TEMED	N,N,N',N', Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TM	Transmembran-Domäne
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TPPII	Protease Komplex („tripeptidyl peptidase II“)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
Tween 20	Poly(oxyethylen) <sub>n</sub> -Sorbitan-Monolaurat
U	Enzymeinheit (Unit)
Ub	Ubiquitin
ü/N	über Nacht
ÜS	(Kultur)überstand
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

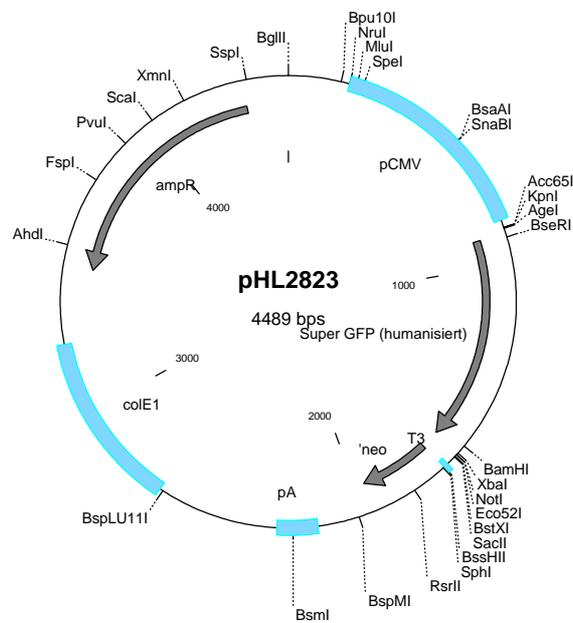
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
YT	Hefeextrakt (yeast tryptone extract)

## B) Vektorkarten

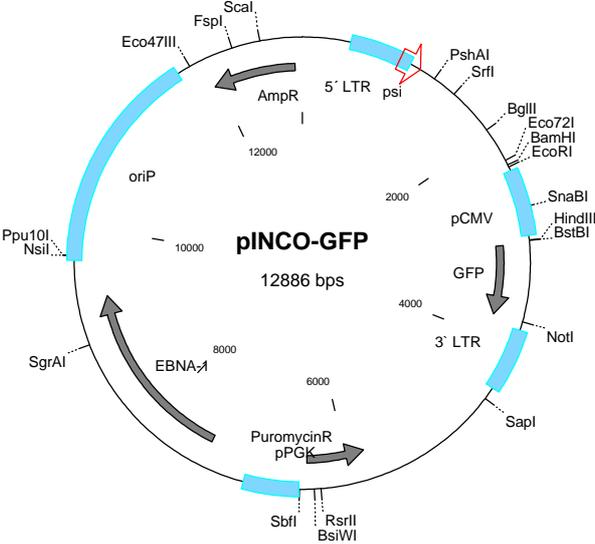
### a) pCMV/myc/cyto



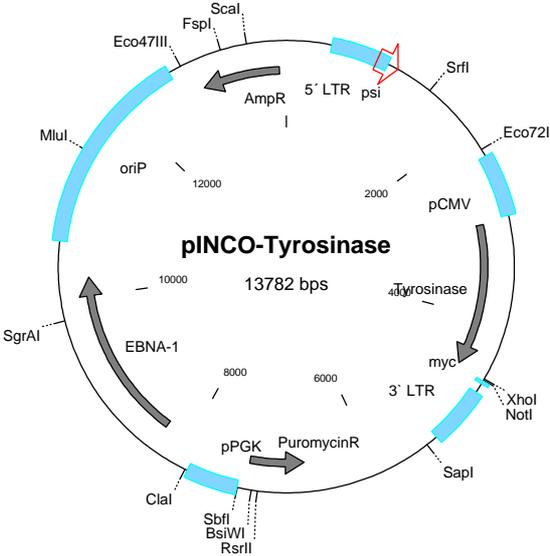
### b) pHL 2823



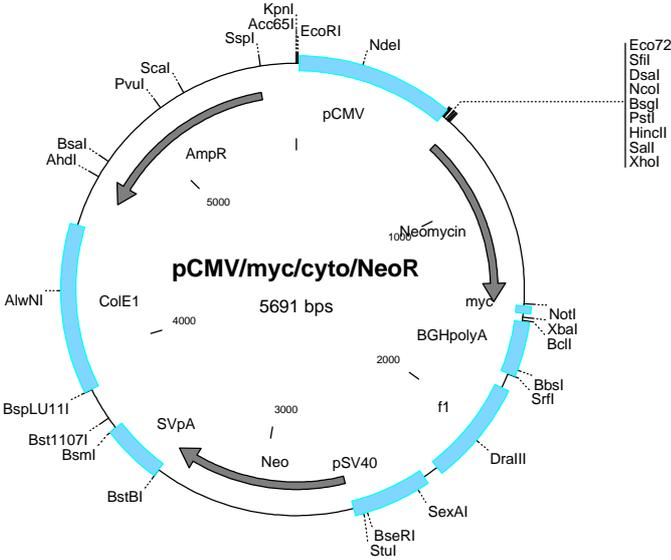
c) pINCO-GFP



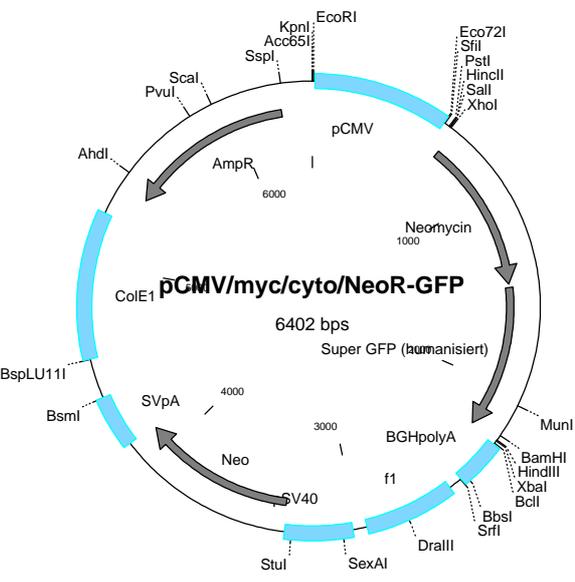
d) pINCO-Tyrosinase



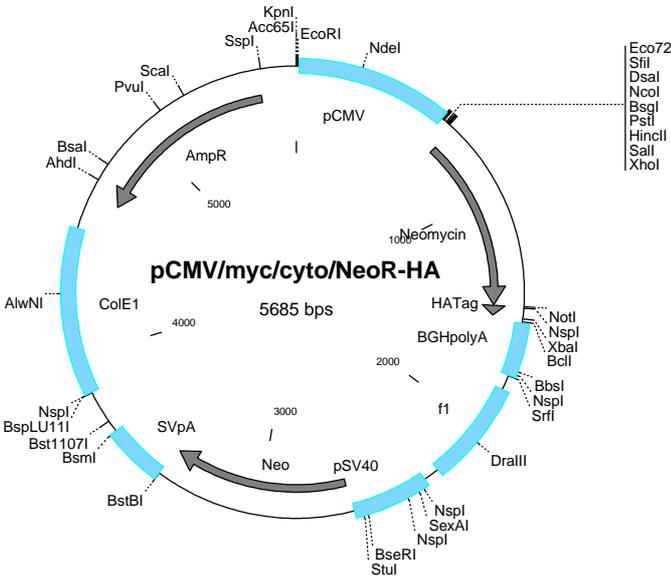
e) pCMV/myc/cyto/NeoR



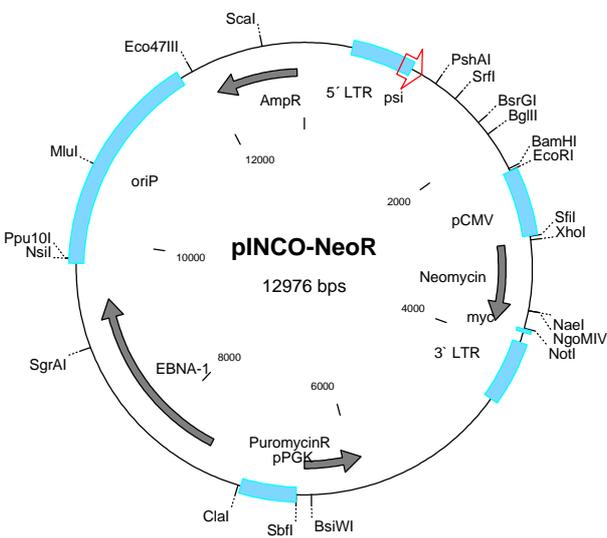
f) pCMV/myc/cyto/NeoR-GFP



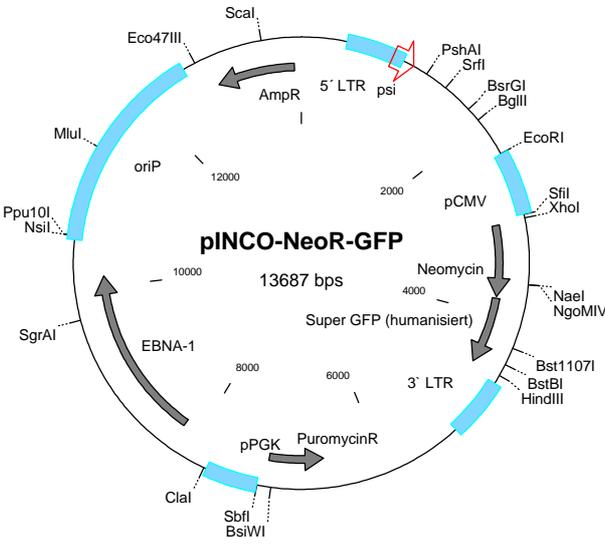
g) pCMV/myc/cyto/NeoR-HA



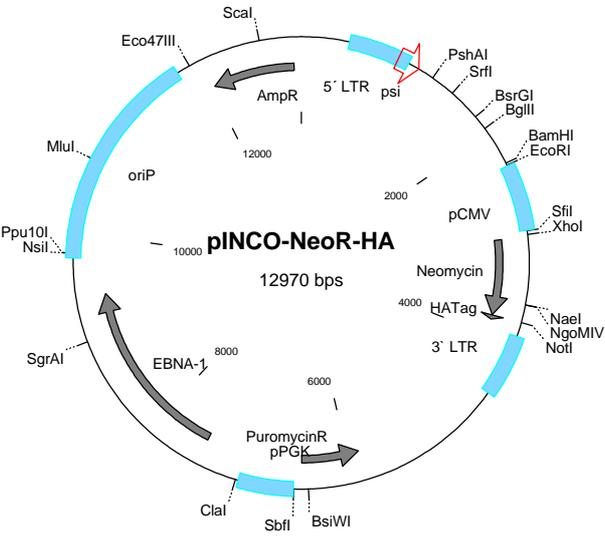
h) pINCO-NeoR



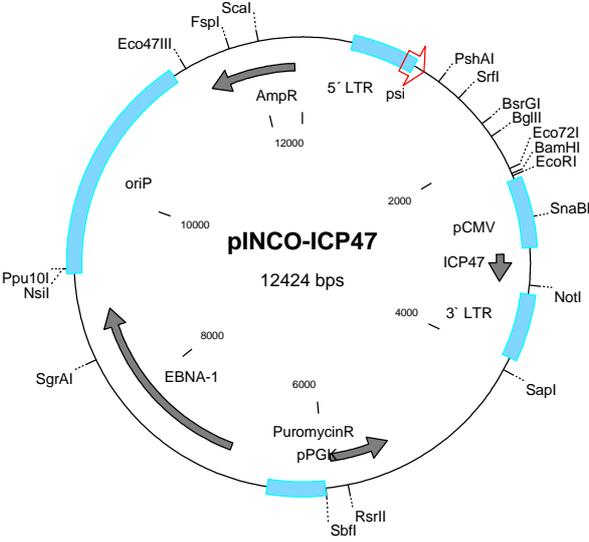
i) pINCO-NeoR-GFP



j) pINCO-NeoR-HA



k) pINCO-ICP47



## C) Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name, Vorname: Nimmerjahn, Falk

Geburtsdatum: 09.10.1972

Geburtsort: Kulmbach

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

### Bildungsweg

---

1979-1983    Grundschule Thurnau

1983-1992    Caspar-Vischer-Gymnasium Kulmbach

Abschluß: Abitur

1992-1993    Grundwehrdienst in Bayreuth und Weiden

1993-1995    Grundstudium der Biologie an der Universität Bayreuth

Abschluß: Vordiplom

1995-1998    Hauptstudium der Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

Abschluß: Diplom in Biologie (Dipl. Biol. Univ.)

Note: 1,0 „mit Auszeichnung bestanden“

Titel der Diplomarbeit:

*Erzeugung kombinatorischer Banken von rekombinanten Fab-Antikörperfragmenten im Phage Display System und Isolation Stat3-spezifischer Fab-Fragmente*

Seit 1999    Promotion am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH

am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik,

Prof. Dr. G.W. Bornkamm

Titel der Arbeit:

*Untersuchungen zum Mechanismus endogener MHC-Klasse-II-restringierter Antigenpräsentation*

## **D) Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Georg W. Bornkamm für die Überlassung des Themas und die guten Arbeitsbedingungen an seinem Institut. Vor allem aber möchte ich mich für das große Interesse an meiner Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

In gleichem Maße möchte ich Dr. Josef Mautner danken. Nirgendwo sonst hätte ich mehr über Immunologie, die Planung von Experimenten und die Einschätzung von Ergebnissen lernen können als in Deinem Labor. Insbesondere möchte ich mich für die immerwährende Unterstützung und die anregenden Gespräche (fachlich und privat) bedanken.

Auch bei Prof. Dirk Eick möchte ich mich für das konstante Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme der offiziellen Betreuung mit allen damit verbundenen Aufgaben bedanken.

Bei Prof. G. Hobom, Prof. P.G. Pelici, Prof. H.G. Rammensee, Prof. Yoshimori und Dr. Holm Bussler möchte ich mich für die Bereitstellung von Materialien bedanken.

Bei Dr. Uta (The Boss) Behrends möchte ich mich für die ständige Unterstützung, die anregenden Diskussionen und ihr Organisationstalent bedanken.

Dagmar (X-Scully-X) Pich, Slavoljub Milosevic und Diana Dudziak möchte ich für die abwechslungsreiche und entspannte Zeit danken – ohne Euch wäre das Ganze nur halb so schön gewesen (und es gäbe nie Milch zum Kaffee und Kaffee zur Milch und so weiter....).

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und meiner Freundin Diana, ohne deren ständige Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.