

Induktion von Immunantworten durch
Immunisierung mit Fusionsproteinen
aus Sequenzen der Invarianten Kette
und des Hühnereiweißlysozyms

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Angelika Maria Schneiders

aus Zell/Mosel

Bonn (April) 2003

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

1. Referent: Prof. Dr. N. Koch
2. Referent: Prof. Dr. W. Kolanus

Tag der Promotion:

	<u>Seite:</u>
Abkürzungen	IV-VI
1. Einleitung	1
1.1 Antigenprozessierung und –präsentation	1
1.2 Die Rolle der Invarianten Kette bei der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation	3
1.3 DNA-Vakzinierung	6
1.4 Immunologie der DNA-Vakzinierung	6
1.5 Zielsetzung der Arbeit	10
2. Material und Methoden	12
<u>2.1 Molekularbiologische Methoden</u>	<u>12</u>
2.1.1 Plasmide	12
2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA	13
2.1.3 Herstellung von DNA-beschichteten Schläuche für die DNA-Vakzinierung mittels Gene Gun	14
2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	14
2.1.5 Modifikationen von DNA-Fragmenten	15
2.1.6 PCR-Mutagenese und Klonierung der rekombinanten li-Moleküle	15
2.1.7 Fusions-PCR und TOPO-Klonierung	17
2.1.8 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation durch Hitzeschock	17
<u>2.2 Zellbiologische Methoden</u>	<u>18</u>
2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen	18
2.2.2 Transiente Expression rekombinanter Proteine in COS7 Zellen	19
2.2.3 Stabile Transfektion von Fibroblasten	19
2.2.4 Isolation von Milzzellen	20
2.2.5 T-Zell Proliferationstest	20
2.2.6 IL-2 abhängiger Proliferationstest	21
2.2.7 FACS Analyse	22
<u>2.3 Biochemische Methoden</u>	<u>22</u>
2.3.1 Biosynthetische Markierung zellulärer Proteine und Immunpräzipitation	22
2.3.2 Behandlung immunpräzipitierter Glykoproteine mit Endoglykosidase H	23
2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli	24
2.3.4 Proteinnachweis durch Western Blot Analyse	25

<u>2.4</u>	<u>Tierexperimente</u>	<u>26</u>
2.4.1	DNA-Injektion mittels Gene Gun	26
2.4.2	Nachweis von HEL-spezifischen Antikörpern durch ELISA	<u>26</u>
<u>2.5</u>	<u>Verwendete Computersoftware und Datenbanken</u>	<u>27</u>
3.	Ergebnisse	28
<u>3.1.</u>	<u>Beschreibung und Charakterisierung der rekombinanten Fusionsproteine</u>	<u>28</u>
	<u>li-HEL</u>	
3.1.1	Expression der rekombinanten li-HEL Fusionsproteine	30
3.1.2	Assoziation von MHC Klasse II Molekülen mit den rekombinanten li-HEL Molekülen	31
3.1.3	Nachweis von SDS-stabilen MHC Klasse II Molekülen	32
3.1.4	Nachweis Peptid-beladener MHC Klasse II Moleküle auf der Zelloberfläche	34
3.1.5	In vitro Antigenpräsentation der rekombinanten li-HEL Moleküle	35
3.1.6	Antigenpräsentation mit den rekombinanten li-HEL Molekülen, die zwei verschiedene HEL-Epitope besitzen	37
3.1.7	Zusammenfassung der Ergebnisse der Fusionsproteine li-HEL	39
<u>3.2</u>	<u>Beschreibung und Charakterisierung der rekombinanten Fusionsproteine</u>	<u>40</u>
	<u>HEL-Tri</u>	
3.2.1	Expression der rekombinanten HEL-Tri Moleküle	42
3.2.2	Assoziation der HEL-Tri Moleküle mit der murinen Invarianten Kette	43
3.2.3	Transport der HEL-Tri Moleküle aus dem ER in den Golgi-Komplex	44
3.2.4	Sekretion der rekombinanten HEL-Tri Proteine	45
3.2.5	In vitro Antigenpräsentation mit den rekombinanten HEL-Tri Molekülen	46
3.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse der Fusionsproteine HEL-Tri	48
<u>3.3</u>	<u>Vakzinierung von C3H Mäusen mit li-HEL und HEL-Tri DNA</u>	<u>48</u>
3.3.1	In vitro Antigenpräsentation nach DNA-Vakzinierung	49
3.3.2	Detektion einer humoralen Immunantwort nach DNA-Vakzinierung	49
3.3.2.1	Antikörpernachweis nach einmaliger und mehrmaliger DNA-Vakzinierung	52
3.3.2.2	Antikörpernachweis nach DNA-Vakzinierung mit rekombinanten HEL-Tri Vektoren mit und ohne ER-Signalsequenz	54
3.3.2.3	Vergleich der humoralen Immunantwort nach Vakzinierung mit HEL und HEL-Tri DNA	55

4.	Diskussion	57
4.1	Untersuchungen zur Bedeutung der Affinität und der Position der T-Zellepitope bei li-Fusionsmolekülen	57
4.2	Untersuchungen zur Beladung der MHC Klasse II Moleküle mit zwei unterschiedlichen T-Zellepitopen	59
4.3	Fusionsproteine bestehend aus einer antigenen Sequenz und der Trimerisierungsdomäne assoziieren mit der Invarianten Kette und gelangen in den MHC Klasse II Prozessierungsweg	62
4.4	Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort mit Fusionsproteinen nach DNA-Vakzinierung	63
5.	Zusammenfassung	67
6.	Literaturverzeichnis	68
	Danksagung	76
	Lebenslauf	77
	Erklärung	78

Abkürzungen

aa	Aminosäure(n) A = Alanin, C = Cystein, D = Asparaginsäure, E = Glutaminsäure, F = Phenylalanin, G = Glycin, H = Histidin, I = Isoleucin, K = Lysin, L = Leucin, M = Methionin, N = Asparagin, S = Serin, T = Threonin, V = Valin, W = Thryptophan, Y = Thyrosin
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-azino-di(3-ethylenbenzothiazolin sulfon-6)-diammoniumsalsz
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Amoniumpersulfat
BCR	B-Zellrezeptor
bp (kb)	Basenpaare (kilobasen)
bzw.	beziehungsweise
β-ME	beta-Mercaptoethanol
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CBS	class II binding site
cDNA	komplementäre DNA
CD	Cluster of differentiation (cell surface marker)
Ci (μCi)	Curie (Mikrocurie)
CMV	Cytomegalovirus
cpm	Impulse (counts) pro Minute
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
DC	dendritische Zelle
ddW	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified minimal medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethyldiaminotetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszyteometer)
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothionat

g (mg, µg, ng)	Gramm (Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm)
GBS	groove binding site
HEL	Hühnereiweißlysozym (hen egg lysozyme)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'(Ethansulfonsäure)
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRP	Horseradish Peroxidase
Ig(G)	Immunglobulin (Klasse G)
Ii	Invariante Kette
IL	Interleukin
l (ml, µl)	Liter (Milliliter, Mikroliter)
m (mm, µm, nm)	Meter (Millimeter, Mikrometer, Nanometer)
M (mM, µM, pM)	molar (mikromolar, mikromolar, picomolar)
mAk	Monoklonaler Antikörper
MeOH	Methanol
MHC	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (major histocompatibility complex)
MIIC	MHC Klasse II Kompartiment
min	Minute
MW	Molekulargewicht
NP-40	Nonidet P-40
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge von x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS ⁻	Phosphat-gepufferte Saline ohne Mg ²⁺ - und Ca ²⁺ -Ionen
PBS	Peptide binding site
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPO	2,5-Diphenyloxzol
PVDF	Polyvinyl Difluorid
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institut-Medium
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde(n)
Std.	Stunde(n)
SV 40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAP	Peptidtransporter (transporter associated with antigen presentation)

TBS	Tris-gebufferte Saline
TCR	T-Zellreptor
TE	Tris-EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tri	Trimerisierungsdomäne der Invarianten Kette
Tris	Tris-(Hydroxymethy)-Aminoethan
U (mU)	Einheit (Unit, Milliunit)
u.a.	unter anderem
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	Zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Antigenprozessierung und -präsentation

Extrazelluläre Proteine werden durch Phagozytose, Rezeptor-vermittelte Endozytose und Pinozytose aufgenommen und in sauren Vesikeln intrazellulär in kurze Peptide zerlegt. Einige dieser Peptide können an MHC (major histocompatibility complex) Moleküle binden. Ein Komplex aus Peptid und MHC Klasse II Molekül wird an die Zelloberfläche transportiert und dem Immunsystem präsentiert. Peptide, die im Cytoplasma produziert werden, werden durch MHC Klasse I Moleküle präsentiert. In der vorliegenden Arbeit wird die Antigenpräsentation durch MHC Klasse II Moleküle behandelt.

Erste Hinweise, dass die Antigenprozessierung im endozytotischen Abbauweg stattfindet, ergaben sich durch Inhibitionsversuche mit schwachen Basen wie Ammoniumchlorid, die den pH-Wert in den Endosomen und Lysosomen veränderten und endosomale Proteasen inhibierten, woraufhin eine verminderte Antigenprozessierung beobachtet werden konnte (Harding et al., 1991).

Unter Antigenprozessierung versteht man den Biosyntheseweg der MHC Klasse II Moleküle und deren anschließende Ausreifung. Gleichzeitig werden durch die Degradation von Antigenen Peptide erzeugt.

Die MHC Klasse II Moleküle werden im ER synthetisiert und bestehen aus zwei Typ I-Transmembranglykoproteinketten (α -Kette = 34 kDa und β -Kette 29 kDa), die nicht-kovalent verbundene $\alpha\beta$ -Dimere bilden. Am carboxyterminalen Ende bilden die MHC Klasse II Dimere eine Peptid-Bindungsgrube, in der Polypeptide mit einer Länge von mindestens 8 Aminosäuren gebunden werden können (Rudensky et al., 1991).

Unmittelbar nach der Einlagerung der neu synthetisierten MHC Klasse II Moleküle in die ER-Membran assoziieren sie mit der Invarianten Kette (Ii) (Kvist et al., 1982). MHC Klasse II $\alpha\beta$ -Dimere werden von der Invarianten Kette zu den endosomalen Kompartimenten eskortiert.

Die Degradation der endozytotisch aufgenommenen Antigene im endosomalen/lysosomalen Kompartiment liefert Peptide, mit denen die neu synthetisierten MHC Klasse II Moleküle beladen werden. Die Abbildung (Abb.) 1.1 zeigt schematisch die Antigenprozessierung und -präsentation mit MHC Klasse II Molekülen. Thymus-abhängige (T)-Lymphozyten zirkulieren ständig in der Blutbahn und durchwandern kontinuierlich die lymphatischen Organe auf der Suche nach einem

passenden Peptid-MHC. Dieser MHC-Peptid-Komplex wird auf der Zelloberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) präsentiert.

Zur T-Zellproliferation und -differenzierung werden zwei Signale benötigt. Zum einen müssen die T-Zellrezeptoren (TCR) auf der Zelloberfläche der T-Lymphozyten den Peptid-MHC erkennen, zum anderen ist ein sogenanntes kostimulatorisches Signal zur Aktivierung der Antigen-spezifischen T-Zelle erforderlich.

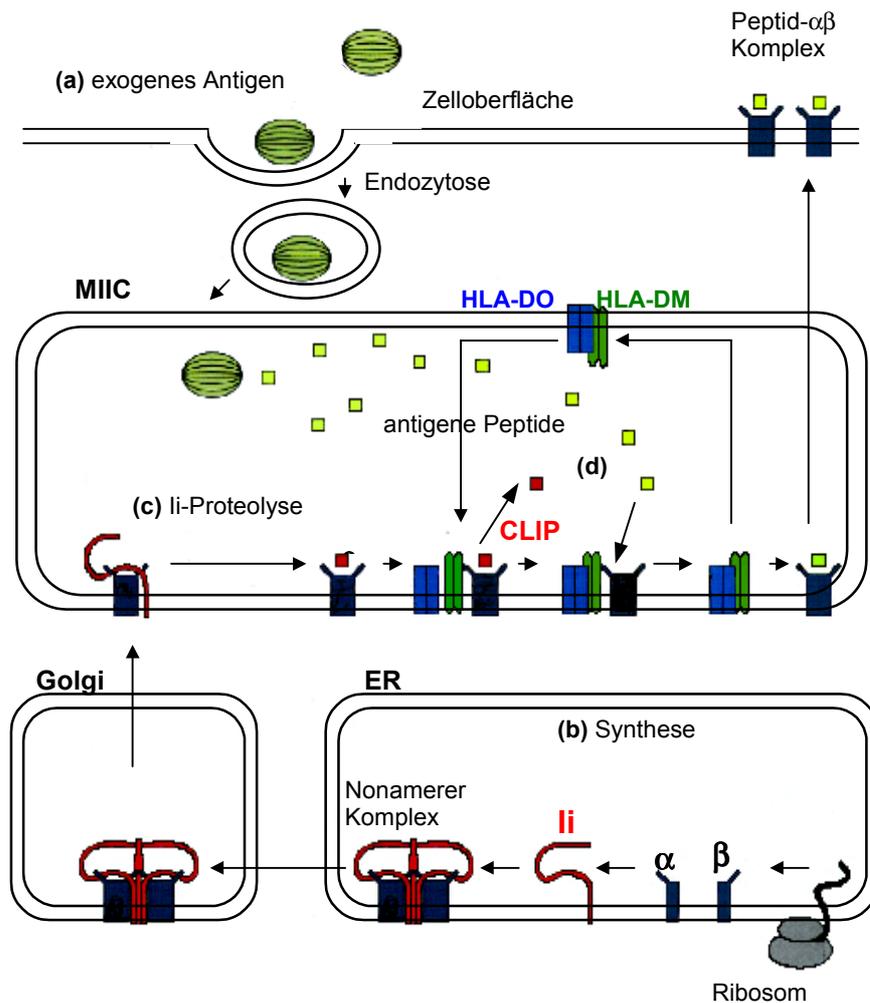


Abb. 1.1 MHC Klasse II Antigenprozessierung:

(a) MHC Klasse II Moleküle präsentieren Peptide von exogenen, endozytotisch aufgenommenen Antigenen. (b) α - und β -Kette der MHC Klasse II Moleküle und die Invariante Kette werden im ER synthetisiert und bilden den nonameren Komplex aus jeweils drei MHC Klasse II Heterodimeren und drei Molekülen der Invarianten Kette. (c) Der nonamere Komplex wird zu dem endosomalen/lysosomalen MHC Klasse II Kompartiment (MIIC) transportiert. Dort wird die Invariante Kette bis auf ein Peptidfragment (CLIP) degradiert. (d) Das CLIP-Fragment verbleibt in der Bindungsgrube der Klasse II Moleküle, bis es durch ein antigenspezifisches Peptid ausgetauscht wird. Dieser Austausch wird von HLA-DM katalysiert. Zur Antigenpräsentation werden Peptid-beladene MHC Klasse II Moleküle an die Zelloberfläche transportiert. (Abbildung entnommen aus Seliger et al., 2000)

1.2. Die Rolle der Invarianten Kette bei der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation

Der effiziente Zusammenbau von MHC Klasse II Molekülen und die Präsentation von antigenen Peptiden wird durch die Chaperon- und Transportfunktion der Invarianten Kette gefördert.

Die Bedeutung der Invarianten Kette beim Zusammenbau der MHC Klasse II Moleküle wurde an Untersuchungen mit Ii-defizienten Mäusen deutlich. Ii-defiziente Mäuse besitzen eine verminderte Anzahl von MHC Klasse II Molekülen auf der Zelloberfläche, da die meisten der gebildeten MHC Klasse II Moleküle im ER verbleiben (Bikoff et al., 1993; Viville et al., 1993). Die MHC Klasse II Moleküle besitzen eine atypische Konformation und bilden mit ER-ständigen Chaperonen Aggregate (Marks et al., 1990; Bonnerot et al., 1994).

Die verschiedenen funktionellen Domänen der Invarianten Kette, wie die cytosolische Domäne, die MHC Klasse II Bindungsdomäne und die Trimerisierungsdomäne spielen eine wichtige Rolle beim Transport und der Beladung von MHC Klasse II Molekülen mit antigenen Peptiden.

Direkt nach ihrer Synthese im ER bildet die Invariante Kette Trimere (Roche et al., 1991), die während des Zusammenbaus mit Calnexin assoziiert sind (Anderson und Cresswell, 1994). Die Trimerisierungsdomäne der Invarianten Kette befindet sich am C-Terminus (aa 118-192) und ragt in das Lumen des ER hinein (Bertolino et al. 1995; Jasanoff et al., 1995). Sie besteht aus drei α -Helices. Jeweils drei Helices von drei Ii-Molekülen bilden zusammen das Grundgerüst des trimeren Komplexes, das von sechs α -Helices umgeben und stabilisiert wird (Jasanoff et al., 1998). Anschließend binden drei MHC Klasse II Proteine an das Ii-Trimer, und es entsteht der nonamere Komplex ($\alpha\beta_3Ii_3$) aus drei Ii-Molekülen und drei $\alpha\beta$ -Dimeren. Erst wenn der nonamere Komplex vollständig ist, wird er von Calnexin freigesetzt und vom ER durch das Trans-Golgi Netzwerk zu den endosomalen/lysosomalen Kompartimenten sortiert (Roche et al., 1991).

Während des Transports durch den Golgi-Apparat werden die MHC Klasse II Moleküle und die Invariante Kette posttranslational modifiziert. Im Trans-Golgi Netzwerk werden die Ii/MHC Klasse II Komplexe in bestimmte Vesikel sortiert, die dann direkt zu endosomalen/lysosomalen MHC Klasse II Beladungskompartimenten (MIIC) transportiert werden (Geuze, 1998). Zwei Leucin-Isoleucin Motive in der cytosolischen Domäne (aa 1-20) der Invarianten Kette sind für die Sortierung in das endosomale/lysosomale Kompartiment verantwortlich (Bakke und Nordeng, 1999).

Im ER befinden sich viele noch nicht vollständig gefaltete Polypeptide aus Biosynthesevorgängen. Durch Blockierung der Peptidbindungsgrube der Klasse II Moleküle verhindert die Invariante Kette eine Beladung von MHC Klasse II mit Polypeptiden, die sich bereits im ER befinden (Hitzel et al., 1995; Busch et al., 1996). Die MHC Klasse II Bindungsdomäne (CBS = class II binding site, aa 81-109) (Freisewinkel et al., 1993) der Invarianten Kette ist für die Assoziation von MHC Klasse II Molekülen und Invarianter Kette verantwortlich. Man unterscheidet zwei Regionen in der MHC Klasse II Bindungsdomäne der Invarianten Kette. Erstens die promiskuitive Bindungsstelle (PBS), und zweitens die GBS-Region (groove binding site) (Siebenkotten et al., 1998).

MHC Moleküle sind hochpolymorph, und man kennt mittlerweile 629 humane Klasse II Allele (Stand Januar 2003, aus Datenbank: [www.ebi.ac.uk.imgt.hla.stats.html](http://www.ebi.ac.uk/imgt.hla.stats.html)). Die starke Bindung der Invarianten Kette mit den verschiedenen MHC Klasse II Allotypen wird durch die hochkonservierte PBS-Region (aa 81-87) der Invarianten Kette vermittelt (Stumptner und Benaroch, 1997; Siebenkotten et al., 1998).

Aminosäuren der GBS-Region (aa 91-99) interagieren mit Aminosäuren der Peptid-Bindungsgrube der MHC Klasse II Moleküle und verhindern die Bindung von Polypeptiden (Siebenkotten et al., 1998).

Nachdem der nonamere Komplex vom Trans-Golgi Netzwerk zu den endosomalen/lysosomalen Kompartimenten gelangt ist, wird die Invariante Kette schrittweise degradiert. Die Degradation der Invarianten Kette durch saure Hydrolasen findet im MHC Klasse II Kompartiment (MIIC) statt (Peters et al., 1990; Benaroch et al. 1995; Geuze, 1998).

Aspartat- und Cysteinproteasen spalten Aminosäuren am C-Terminus der Invarianten Kette unmittelbar vor der Trimerisierungsdomäne, und der nonamere Komplex zerfällt. Die degradierte Invariante Kette ist aber immer noch mit einem MHC Klasse II Molekül assoziiert. Nach weiterer Degradation am C-Terminus bis zur MHC Klasse II Bindungsdomäne der Invarianten Kette findet man ein 10 kDa großes li-Fragment (lip10) an den Klasse II Molekülen (Villadangos et al., 1997; Nakagawa et al., 1999). Anschließend findet eine N-terminale Degradation der Invarianten Kette bis auf Peptidgröße statt. Nur noch das CLIP-Fragment (= class II assoziiert invariant chain peptides, aa 81-104) verbleibt in der Bindungsgrube der MHC Klasse II Moleküle (Romagnoli und Germain, 1994; Avva und Cresswell, 1994; Cresswell, 1996).

Die endosomale Cysteinprotease Cathepsin S ist hauptsächlich an der Degradation zu CLIP beteiligt (Shi et al., 1999). In Cathepsin S-defizienten Mäusen kam es zu einer großen Anhäufung von lip10/MHC Klasse II Intermediaten (Driessen et al., 1999; Villadangos und Ploegh, 2000).

Solange sich das CLIP-Fragment an MHC Klasse II Molekülen befindet, ist dieser Komplex vor enzymatisch-aktiven Proteasen geschützt (Ghosh et al., 1995). Das CLIP-Fragment in der Bindungsgrube der MHC Klasse II Moleküle wird in dem späten MIIC Kompartiment durch ein antigenes Peptid ausgetauscht. Dieser Austausch wird von dem MHC Molekül HLA-DM katalysiert. (Denzin und Cresswell, 1995; Brocke et al., 2002). MHC Klasse II Moleküle, die mit antigenen Peptiden beladen sind, gelangen durch Exozytose der endosomalen/lysosomalen Vesikel auf die Zelloberfläche und können via TCR-Kontakt T-Lymphozyten aktivieren.

Durch verschiedene Translationsstarts und alternatives Spleißen existiert die Invariante Kette in verschiedenen Isoformen (Yamamoto et al., 1985; Koch et al. 1987). Die murine Invariante Kette kommt als 31 kDa schweres Glykoprotein mit 215 Aminosäuren und als 41 kDa schweres Glykoprotein mit 279 Aminosäuren vor. Die 41 kDa schwere Isoform der murinen Invarianten Kette entsteht durch alternatives Spleißen des Exons 6b, das eine 64 Aminosäure lange Thyroglobulindomäne enthält (Koch et al., 1987). Die endosomale Cystein-Protease Cathepsin L bindet an dieses Fragment der Invarianten Kette (Guncar et al., 1999).

Cathepsin L ist an der Hydrolyse langer Polypeptidketten beteiligt und wird vor allem in Makrophagen und cortikalen Thymusepithelzellen exprimiert (Nakagawa et al., 1998, 1999).

Zur Funktion der Thyroglobulindomäne der Invarianten Kette gibt es unterschiedliche Erklärungen. Die Thyroglobulindomäne der Invarianten Kette ist ein starker Inhibitor für die Cysteinprotease Cathepsin L. Diese Domäne bindet das enzymatisch aktive Cathepsin L, wodurch der MHC-II41 Komplex länger bestehen bleibt (Bevec et al., 1996). Auch Arunachalam und Mitarbeiter (Arunachalam et al., 1994) beobachteten eine längere Halbwertszeit der 41kDa Isoform in Endosomen im Gegensatz zu der 31kDa Isoform der Invarianten Kette, die keine Cathepsin L-Inhibitor-domäne besitzt.

Neuere Untersuchungen zeigten, dass die 64 aa lange Thyroglobulindomäne eine Rolle bei der Stabilisierung und Reifung der enzymatisch aktiven Form des Cathepsin L besitzt (Lennon-Dumenil et al., 2001). Durch Bindung der Thyroglobulindomäne an das enzymatisch-aktive Zentrum des Cathepsin L kann das Enzym nicht von anderen Proteasen oder autoproteolytisch in den Endosomen degradiert werden.

Zudem stabilisiert die Interaktion der Thyroglobulindomäne mit reifem Cathepsin L dieses bei neutralem pH-Wert. In dieser Form wird reifes Cathepsin L von Makrophagen in den extrazellulären Raum sezerniert. Dort kann Cathepsin L bei neutralem pH-Wert Elastin degradieren und die extrazelluläre Matrix im Zuge einer Entzündungsreaktion auflockern (Fiebiger et al., 2002).

1.3. DNA-Vakzinierung

Der Transfer von „nackter“ DNA in einen Organismus wurde bereits 1966 von Ito (Ito et al., 1966) durch Injektion von Nukleinsäuren des Papillomavirus unter die Haut von Kaninchen durchgeführt. 1990 wurde ein Reportergen in einem Plasmid-Vektor in den Muskel von Mäusen injiziert und eine Expression des Gens nachgewiesen (Wolff et al., 1990).

Die Methode der DNA-Vakzinierung mit DNA-beschichteten Goldpartikeln wurde erstmals in den 80er Jahren zur Transfektion von Pflanzenzellen eingesetzt (Bruce et al., 1989). In den 90er Jahren wurde die Methode weiterentwickelt und an Säugerzellen angewendet (Zelenin et al., 1989; Wolff et al., 1992). Mit einem als Gene Gun bezeichneten Gerät gelang es 1990 Yang und seinen Mitarbeitern (Yang et al., 1990) die physikalische Barriere der Haut, das Stratum corneum, zu überwinden und lebende Versuchstiere mit Reportergen-DNA zu transfizieren. 1992 wurden zum ersten Mal Antikörper gegen ein fremdes Gen nach DNA-Partikel-Beschuss mittels Gene Gun nachgewiesen (Tang et al., 1992).

1.4 Immunologie der DNA-Vakzinierung

Humorale und zelluläre Immunantworten können durch Immunisierung mit Antigen-exprimierenden Plasmiden ausgelöst werden. Die DNA-Immunisierung induziert Antigen-spezifische Antikörper, T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen. Für die Aktivierung der verschiedenen Effektorwege der adaptiven Immunabwehr müssen bestimmte Strukturen auf Antigen-präsentierenden Zellen erkannt werden: CD4+ T-Helferzellen erkennen Peptid-MHC Klasse II Komplexe, zytotoxische T-Zellen erkennen Peptid-MHC Klasse I Komplexe, und lösliche Antigene werden durch den B-Zellrezeptor (BCR) erkannt.

DNA-Vakzine sind in der Lage, sowohl somatische Zellen als auch Immunzellen direkt zu transfizieren. Die DNA-Goldpartikel penetrieren die Haut und dringen je nach Größe der verwendeten Goldpartikel 0,1 bis 5 mm tief in die Haut ein. Dabei werden Zellen in der Epidermis (Oberhaut) und der Dermis (bindegewebige Unterhaut) mit Plasmid-DNA transfiziert. Die Antigenexpression findet vor allem in den Keratinocyten und Langerhanszellen in der Epidermis aber auch in geringem Umfang in Fibroblasten und Makrophagen der Dermis statt (Eisenbraun et al., 1993).

Nach Beschuss durch DNA-beschichtete Goldpartikel werden in der Epidermis Keratinocyten, Fibroblasten und dendritische Zellen mit Plasmid-DNA transfiziert

(Cohen et al., 1998). Bereits acht Stunden nach der Gene Gun Vakzinierung wurde eine Expression des Antigens in den transfizierten Keratinozyten beobachtet (Torres et al., 1997). Anschließend sekretieren die Keratinozyten das Plasmid-kodierte Antigen, sofern dieses eine ER-Signalsequenz besitzt.

Die sezernierten Antigene werden von Langerhans Zellen, einer speziellen Variante dendritischer Zellen in der Haut, aufgenommen. Diese Antigen-präsentierenden Zellen phagozytieren das Antigen und schleusen es in den endosomalen/lysosomalen Antigenprozessierungsweg ein (Torres et al., 1997; Cohen et al., 1998) und präsentieren anschließend antigene Peptide auf MHC Klasse II Molekülen. Daraufhin wandern dendritische Zellen zu den afferenten Lymphknoten in der Nähe (Randolph et al., 1999).

Zehn Tage nach einer DNA-Vakzinierung wurden Antigen-spezifische dendritische Zellen in den „draining“ Lymphknoten lokalisiert (Akbari et al., 1999). Dort werden die Peptid-MHC Klasse II Komplexe von passenden T-Zellrezeptoren der zirkulierenden CD4+ T-Zellen erkannt. Antigen-präsentierende Zellen, wie dendritische Zellen, besitzen die erforderlichen kostimulatorischen Moleküle (B7.1, B7.2, CD 40), um CD4+ T-Zellen zur Differenzierung anzuregen, woraufhin aktivierte CD4+ T-Helferzellen entstehen.

Einige dendritischen Zellen (<2%) in der Haut werden direkt durch den Beschuss mit DNA-beschichteten Goldpartikeln transfiziert (Akbari et al., 1999). Die Plasmid-DNA integriert nicht in das Wirtsgenom (Wolff et al., 1990) und verbleibt episomal im Cytoplasma. Cytoplasmatisch exprimiertes Antigen wird auf MHC Klasse I Molekülen präsentiert. Peptid-MHC Klasse I Moleküle auf dendritischen Zellen werden von CD8+ T-Zellen erkannt, die zu cytotoxischen T-Zellen (CTL) differenzieren. Um zu cytotoxischen T-Effektorzellen zu werden, benötigen die CD8+ T-Zellen zusätzlich den Kontakt ihrer CD40-Rezeptoren mit CD40-Liganden (CD154) auf CD4+ T-Helferzellen. Diesen speziellen Rezeptor-Liganden Kontakt zwischen CD4+ T-Zellen und zu aktivierenden Zellen nennt man T-Zellhilfe. An der Differenzierung von naiven T-Zellen sind außerdem noch Zytokine, die von den CD4+ T-Helferzellen ausgeschüttet werden, beteiligt.

Zytotoxische CD8+ T-Effektorzellen entstehen auch, wenn exogen aufgenommenes lösliches Antigen (z.B. von Keratinozyten oder dendritischen Zellen selbst sezerniert) in den MHC Klasse I Prozessierungsweg gelangt. Dieser Mechanismus, auch als „cross-presentation“ bekannt (Heath und Carbone, 2001), hat auch bei der DNA-Vakzinierung Bedeutung (Gurunathan et al., 2000). Cytotoxische T-Lymphozyten, die

durch cross-presentation entstanden sind, benötigen zur Aktivierung ebenfalls T-Zellhilfe von CD4+ Zellen (Chan et al., 2001; Thalhamer et al., 2001).

Die Keratinozyten besitzen wie alle somatischen Zellen MHC Klasse I Moleküle und können auf diesen Peptide präsentieren. Bei der DNA-Immunisierung spielt dieser Mechanismus keine Rolle, da die meisten somatischen Zellen keine kostimulatorischen Moleküle besitzen, die CD8+ Zellen aktivieren könnten (Torres et al., 1997).

Das sezernierte Antigen aus somatischen oder dendritischen Zellen wird von B-Zellen durch die Bindung an einen Antigen-spezifischen B-Zellrezeptor (BCR) aufgenommen, in den endosomalen/lysosomalen Kompartimenten degradiert und auf MHC Klasse II Molekülen präsentiert. B-Zellen benötigen ebenfalls als zweites kostimulatorisches Signal die T-Zellhilfe von aktivierten CD4+ T-Helferzellen. Erst nach T-Helferzell-Kontakt proliferieren und differenzieren sie zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen.

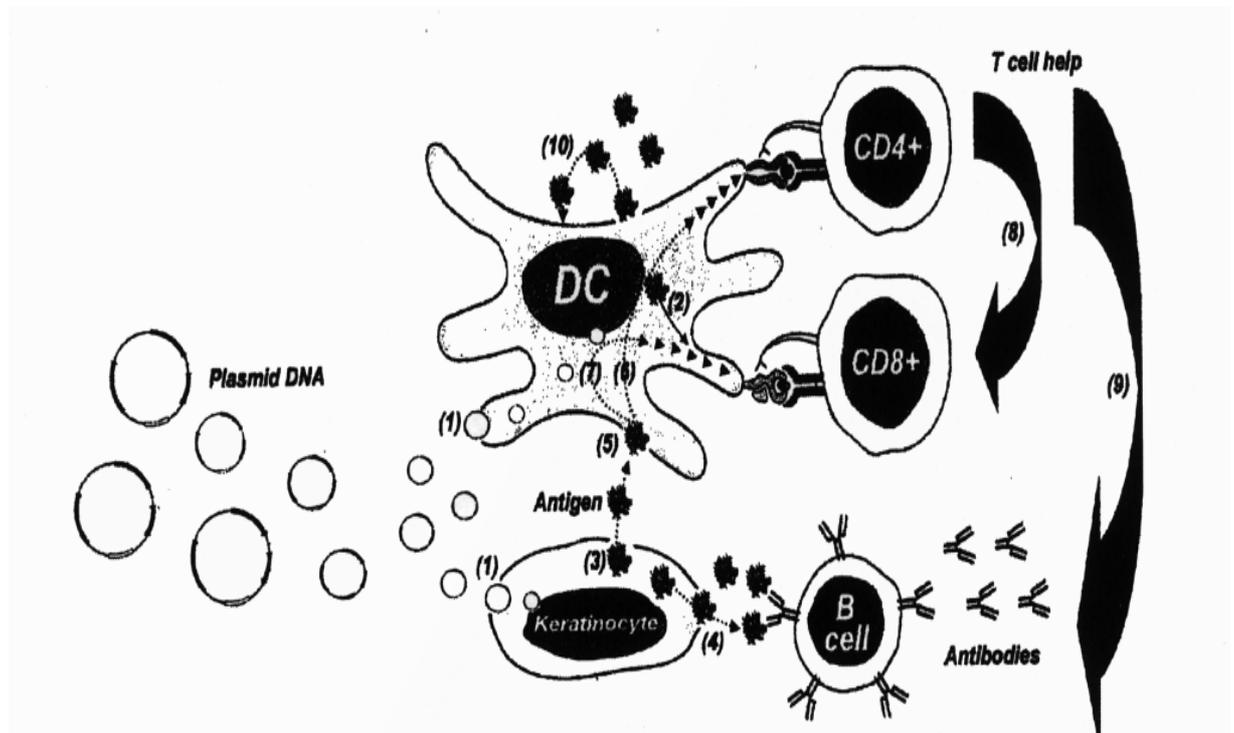


Abb1.2 Mechanismus der Antigenpräsentation nach DNA-Vakzinierung:

(1) Direkte Transfektion von dendritischen Zellen (DC) und Keratinozyten. (2) Endogenes Protein wird nach Transfektion von DCs auf MHC Klasse I Moleküle präsentiert. (3) Transfizierte Keratinozyten sezernieren das Plasmid-kodierte Antigen, das von B-Zellen (4) und DCs (5) aufgenommen wird. (6) In den Endosomen wird das Antigen degradiert und als Peptid auf MHC Klasse II Molekülen präsentiert oder gelangt durch (7) „Crosspräsentation“ in den MHC Klasse I Weg. T-Helferzellen aktivieren CD8+ cytotoxische T-Zellen (8) und B-Zellen (9). (10) Transfizierte DCs exprimieren ebenfalls lösliches Antigen. (Abbildung entnommen aus Thalhamer et al., 2001)

CD4⁺ T-Helferzellen (Th) sind die zentralen Zellen des Immunsystems, die über den Verlauf einer Immunreaktion entscheiden. Naive CD4⁺ T-Zellen werden von dendritischen Zellen aktiviert und differenzieren zu T-Helferzellen. Man unterscheidet zwei funktionale Klassen von T-Helferzellen: Th₁- und Th₂-Zellen. Ihre Aktivierung wird von der Antigendichte, kostimulatorischen Molekülen und Cytokinen beeinflusst (Murphy und Reiner, 2002).

Th₁- und Th₂-Zellen sezernieren unterschiedliche Cytokine, die auf verschiedene Zellen des Immunsystems wirken. Th₁-Zellen schütten vor allem die Cytokine Interferon (IFN)- γ und Tumor-Nekrosefaktor (TNF)- β aus. Th₁-Zellen vermitteln eine zelluläre Immunität, weil sie mittels IFN- γ und TNF- β vor allem Makrophagen aktivieren können. Aktivierte Makrophagen sind in der Lage, eine Entzündungsreaktion im Gewebe auszulösen und andere Immunzellen, wie natürliche Killerzellen, zu stimulieren.

Th₂-Zellen produzieren die Cytokine Interleukin (IL)-4 und IL-5. Dadurch werden B-Zellen aktiviert und vor allem eine humorale Immunantwort induziert.

Untersuchungen haben gezeigt, dass die DNA-Dosis und die immunstimulatorischen Cytokine die Ausrichtung der Differenzierung der T-Helferzellen beeinflussen. Nach DNA-Immunisierung mit der Gene Gun entstehen vor allem Th₂-Zellen, die sich durch eine höhere Antikörperproduktion auszeichnen, während bei salinen Injektionen von Plasmid-DNA bevorzugt Th₁-Antworten entstehen (Feltquate et al., 1997).

Es ist noch unklar, wie die DNA-Immunisierung die Ausbildung der verschiedenen T-Helferzelltypen beeinflusst. Welcher T-Helferzelltyp gebildet wird, hängt nicht vom Weg (intradermal oder intramuskulär) der DNA-Immunisierung ab. Zur Zeit wird eine dosisabhängige Differenzierung diskutiert (Feltquate et al., 1997; Cohen et al., 1998). Um vergleichbare Immunantworten zu induzieren, wird 100 bis 1000 mal mehr DNA bei der intramuskulären DNA-Injektion gegenüber der Gene Gun Immunisierung benötigt (Akbari et al., 1999). Große Mengen von Plasmid-DNA haben einen immunstimulatorischen Effekt. Bakterielle DNA enthält unmethylierte Cytosin-phosphat-Guanosin-dinucleotide (CpG), die mit zwei flankierenden Purinen am 5' Ende und zwei Pyrimidinen am 3' Ende die sogenannten CpG-Oligonukleotide Motive bilden. CpG-Motive können dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen direkt stimulieren (Krieg et al., 1995; Sato et al., 1996). Plasmidvektoren sind bakteriellen Ursprungs und enthalten v.a. in den Antibiotikaresistenzgenen (z.B. Ampicillinresistenz) CpG-Oligonukleotid-Motive (Klinman et al., 1996; Feltquate et al., 1999). Die Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen durch CpG-Motive resultiert in der Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen wie IFN- γ und IL-12, die eine Differenzierung zu Th₁-Zellen und eine zelluläre Immunantwort bewirken.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Zur Auslösung einer Antigen-spezifischen Immunantwort ist die Beladung von MHC Klasse II Molekülen mit antigenen Peptiden notwendig.

Vor Beginn der Arbeit war bekannt, dass durch rekombinante Fusionsmoleküle aus der Invarianten Kette und antigenen Sequenzen, T-Zellepitope in den MHC Klasse II Prozessierungsweg eingeführt werden können. In dieser Arbeit sollte der Mechanismus der Prozessierung rekombinanter Antigene untersucht werden und eine Optimierung von B- und T-Zellreaktionen erreicht werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Antigenbeladung von MHC Klasse II Molekülen mit verschiedenen Fusionsmolekülen aus Invarianter Kette und antigenen Epitopen des Hühnereiweißlysozyms (HEL) untersucht werden. Es wurden Ii-Fusionsmoleküle hergestellt, die entweder in der MHC Klasse II Bindungsdomäne oder am C-Terminus der Invarianten Kette ein antigenes HEL-Epitop besitzen. Damit sollte *in vitro* die Bedeutung der Positionierung von antigenen Epitopen in bestimmten Regionen der Invarianten Kette bei der MHC-Beladung untersucht werden.

Die Präsentation von verschiedenen antigenen Peptiden könnte wegen des unterschiedlichen Bindungsverhaltens an MHC Klasse II Moleküle in Konkurrenz zueinander stehen. Die Konkurrenz zwischen Epitopen mit unterschiedlicher Affinität innerhalb eines Ii-Fusionsmoleküls sollte anhand von *in vitro* Antigenpräsentationsassays untersucht werden.

Die Frage, ob sich T-Zellantworten nach DNA-Vakzinierung mit Ii-Epitop-Fusionsmolekülen auslösen lassen, sollte innerhalb dieser Arbeit ebenfalls geklärt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten neue Fusionsproteine aus der Trimerisierungsdomäne der Invarianten Kette und der kompletten antigenen Sequenz des Hühnereiweißlysozyms hergestellt und auf ihre Fähigkeit, in den MHC Klasse II Prozessierungsweg zu gelangen, untersucht werden.

In vitro sollte festgestellt werden, ob diese Fusionsmoleküle über eine Interaktion mit der Trimerisierungsdomäne der Wildtyp Invarianten Kette zu den endosomalen/lysosomalen Beladungskompartimenten sortiert werden. Dazu sollten biochemische Experimente durchgeführt werden, die nachweisen, dass die rekombinanten Proteine in den Golgiapparat transportiert werden und eine Sekretion stattfindet. *In vitro* Antigenpräsentationsversuche sollten zeigen, dass die rekombinanten Fusionsproteine spezifische T-Zellen aktivieren können und sie sich eignen, um als DNA-Vakzine eingesetzt werden zu können.

Durch das zielgerichtete Einschleusen von Antigenen mittels Fusionsproteinen, bestehend aus dem Antigen und der Trimerisierungsdomäne der Invarianten Kette, sollten bevorzugt CD4+ Immunantworten in Versuchstieren induziert werden. Um die

Antikörperantwort bei einer DNA-Vakzinierung zu verbessern, benötigen B-Zellen den Kontakt zu aktivierten CD4+ T-Zellen.

In Tierversuchen sollte untersucht werden, ob sich diese Fusionsmoleküle als DNA-Vakzine eignen und eine spezifische T-Zellantwort und eine Antikörperantwort auslösen. Bei der Induktion der humoralen Antwort sollte die Bedeutung der Sekretion der Fusionsmoleküle überprüft werden. Welche Bedeutung die Trimerisierungsdomäne und die Cathepsin L-Inhibitor-domäne bei der Antikörperantwort haben, sollte durch vergleichende *in vivo* DNA-Vakzinierungsexperimente untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Methoden wurden, falls nicht gesondert aufgeführt, nach Sambrook & Russell, Molecular cloning, 2001 oder mit Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.1.1 Plasmide

pcEXV-3: Die li-HEL Konstrukte, I-A^k α -Kette und I-A^k β -Kette, die für die biochemischen Untersuchungen benutzt wurden, befanden sich im eukaryontischen pcEXV-3 Expressionsvektor (Miller und Gemain, 1986). Dieser 3 kb große Vektor besitzt einen SV-40 Promotor und Enhancer, Signale zum Spleißen und zur Polyadenylierung, einen prokaryotischen Replikationsursprung (pBR322 ori) und ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion.

pcDNA3.1(-) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA): Die rekombinanten li-HEL Moleküle und HEL-Tri Moleküle, die für Transfektion von Zelllinien und die DNA-Vakzinierung benutzt wurden, befanden sich im pcDNA3.1(-) Plasmid. Dieser 5,4 kb große Vektor enthält alle Elemente zur Expression in Bakterien (f1 Ori, T7 Promotor, Ampicillinresistenzgen). Ebenso besitzt der Vektor die Elemente zur Expression der klonierten Sequenzen in Säugerzellen (CMV Promotor/Enhancer, BGH Polyadenylierungssignal) und ein Neomycinresistenzgen (mit SV40 Ori/Promotor, SV40 Polyadenylierungssignal). Das Neomycinresistenzgen ist bakteriellen Ursprungs und codiert für zwei Aminoglykosid 3' Phosphotransferase Enzyme (APH) und ist auch in Säugerzellen aktiv. Es schützt die transfizierten Zellen vor Glykosidantibiotika wie Neomycin (für Prokaryonten) und Geneticin (für Eukaryonten). Geneticin (G418 Sulfat) inhibiert die Elongation der Proteinbiosynthese.

pcDNA3.1/V5-HisTOPO (Invitrogen): Dieser 5,5 kb große Vektor unterscheidet sich in den Elementen für die pro- und eukaryontische Expression nicht vom pcDNA3.1(-) Vektor. Er besitzt zusätzlich kovalent gebunden am 5' und 3' Ende der linearisierten multiplen Klonierungsseite die Topoisomerase I des Vaccinia Virus. Topoisomerase spaltet Phosphodiesterbrücken von doppelsträngiger DNA nach 5'CCTTT-Motiven im Vektor und bindet kovalent mit dem Thyrosylrest an Phosphatgruppen der aufgespaltenen DNA-Stränge. Hydroxylgruppen am 3' und 5' Ende des Adenin von

doppelsträngiger DNA eines PCR-Produkts spalten die Phospho-Thyrosyl-Bindungen zwischen Enzym und DNA. Das Enzym wird freigesetzt und zwischen der DNA des PCR-Produkts und dem Vektor werden Phosphodiesterbrücken ausgebildet. Dadurch ist die direkte Klonierung von PCR-Produkten möglich. Außerdem besitzt der Vektor am 3' Ende der Klonierungsseite nach einem Zwischenstück von 65 bp ein V5-Epitop und ein Hexa-Histidin-Epitop.

pCR II TOPO (Invitrogen): Dieser Vektor (Größe 3,9 kb) ist ein reiner Klonierungsvektor und besitzt ebenfalls eine kovalent gebundene Topoisomerase am 5' und 3' Ende der multiplen Klonierungsseite. Dieser Vektor besitzt nur prokaryotische Replikations- bzw. Expressionselemente und ein Ampicillinresistenzgen.

2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

a.) Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA

Eine Bakterieneinzelkolonie wird in 3 ml LB-Medium ÜN bei 37 °C unter schütteln inkubiert. 1,5 ml dieser Bakterienkultur werden bei 13 000 rpm für 1 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wird anschließend in 200 µl 10 mM Tris-Puffer (20 µg RNase/ml) resuspendiert. Lysiert wird mit 400 µl 0,1 N NaOH, 0,5 % SDS in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH: 7,9) für 5 min bei RT und neutralisiert mit 300 µl 7,5 M Natriumacetat-Lösung bei +4 °C. Zelltrümmer, Proteine und genomische Bakterien-DNA werden durch 5 minütiges Abzentrifugieren bei 13000 rpm entfernt. Die Plasmid-DNA im Überstand wird mit 500 µl Isopropanol gefällt und anschließend erneut für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird mit 100 %igem Ethanol gewaschen und in destilliertem Wasser (ddW) resuspendiert.

b.) Präparation von großen Mengen Plasmid-DNA

Große Mengen Plasmid DNA wurden durch Verwendung von Nucleobond PC 100 und PC 500 Kits (Fa. Machery-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben gewonnen. Endotoxin-freie Plasmid-DNA wurde ebenfalls mit einem Kit (Nucleobond PC 500 - EF, Fa. Machery-Nagel) isoliert und für die DNA-Vakzinierung benutzt. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde im Photometer bei 260 nm bestimmt.

2.1.3 Herstellung von DNA-beschichteten Schläuchen für die Vakzinierung mittels Gene Gun

Bei der intradermalen DNA-Vakzinierung mit der Gene Gun (Fa. BioRAD, München) werden DNA-beschichtete Goldpartikel durch Heliumdruck in die Haut geschossen. Dafür müssen Goldpartikel mit Plasmid-DNA beschichtet werden und auf die Innenseite von Polypropylen-Schläuchen (Fa. BioRAD, München) aufgebracht werden. Ein Schlauch von ca. 70 cm Länge wird in eine Rotationsapparatur eingespannt und unter Stickstoffzufuhr (Flußrate 350 ml/min) getrocknet. 25 mg Gold mit einem Durchmesser von 1 µm werden mit 200 µl 50 mM Spermidin-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 100 µg Plasmid-DNA gemischt. Unter leichtem Schütteln wird 200 µl 1 M CaCl₂-Lösung zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Das DNA-Goldgemisch wird dreimal mit wasserfreien 100 %igem Ethanol (Merck, Darmstadt) gewaschen und anschließend in 3 ml 100 %igem Ethanol mit 50 µg/ml Polyvinylpyrrolidon (PVP) aufgenommen, kräftig gemischt, in eine Spritze aufgezogen und zügig in den getrockneten Schlauch gegeben. Nachdem sich die DNA-Goldpartikel (5-10 min) am Boden des Schlauches abgesetzt haben wird das Ethanol/PVP-Gemisch wieder abgesaugt. Der Schlauch wird unter Rotation und Stickstoffzufuhr getrocknet und anschließend mit einem Schneidegerät in Stücke von 1 cm Länge geschnitten, die jeweils 0,5 mg Gold mit 2 µg DNA beinhalten. Diese Schlauchstücke können in das Reservoir der Gene Gun eingespannt werden. Alle zur Herstellung der Gold-DNA-beschichteten Schläuche benötigten Reagenzien und Apparate wurden, falls nicht anders bezeichnet, von der Fa. BioRAD (München) bezogen.

2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

PCR-Produkte oder durch Restriktionsverdau entstandene DNA-Fragmente wurden in einem 0,8 oder 1 % TAE (40 mM Tris, 10 mM NaAc, 1 mM EDTA, pH: 7,8)-Agarosegel mit 0,25 % Ethidiumbromid bei 130 V aufgetrennt unter UV-Licht ausgeschnitten und in Natriumjodid-Puffer (4,5 M NaJ) bei 55 °C geschmolzen. Die Isolierung erfolgte mit dem Gene clean®-Kit von MoBio Lab (USA). Hierbei wird die DNA unter hohen Salzkonzentrationen an Glasmilchpartikel gebunden und anschließend mit destilliertem Wasser eluiert.

2.1.5 Modifikation von DNA-Fragmenten

a.) Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen wurden eingesetzt, um Plasmidvektoren zu linearisieren, und die Fragmentlängen der DNA-Konstrukte nach Klonierung zu überprüfen. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma NEB (USA), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und Roche Diagnostik (Mannheim) bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt.

b.) Dephosphorylierung der 5' Enden linearisierter DNA

Um die Effizienz der Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA zu erhöhen wurde der zuvor linearisierte DNA-Vektor (100-200 ng) mit einer Einheit alkalischer Phosphatase (Fa. Roche) nach Herstellerangaben versetzt. Dabei werden die endständigen 5'-Phosphatgruppen des linearisierten Vektors entfernt. Durch Hitzeinaktivierung (+65 °C, 5 min) wurde das Enzym anschließend deaktiviert.

c) Ligation

T4-DNA Ligase wurde von der Firma NEB bezogen und zur Ligation von DNA-Fragmenten in die entsprechenden Vektoren eingesetzt. Dabei wurde das zu ligierende Fragment im 3-5 fachen molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt und über Nacht bei +16 °C oder 1 Std. bei RT inkubiert.

2.1.6 PCR-Mutagenese und Klonierung der rekombinanten li-Moleküle

Die verwendeten cDNA Konstrukte li-HEL (außer li-HEL_Δsw, li-HEL_Δws) befinden sich im pcEXV-Plasmid Vektor und wurden von K. Knieke (Diplomarbeit, Bonn 1998) kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung von stabilen Zelllinien und für die DNA-Immunisierung wurden die li-HEL Konstrukte in den pcDNA3.1(-) Vektor umkloniert. Das HEL-Tri31 Molekül im pcDNA3.1(-) Vektor wurde von S.Thiel hergestellt.

Alle weiteren cDNA Konstrukte befinden sich im pcDNA3.1(-) Vektor und wurden durch Fusions-PCR hergestellt. Dazu wurden folgende Primer und Oligonukleotide verwendet, die von den Firmen Sigma-Ark (Steinheim), MWG Biotech (Ebersberg) oder Metabion (Martinsried) bezogen wurden.

1. Primer für die Herstellung von li-HEL Δ sw

T7: 5'-AAT ACG ACT CAC TAT AG-3'

BGH-revers: 5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'

HEL49-62-li: 5'-GGA TCG ACT GAT TAC GGA ATC CTA CAG ATC AAC TCG AGG
TGG TCC ATG GAT AAC ATG CTC CTT GG-3'HEL49-62-li-revers: 5'-GGA TTC CGT AGT CAG TCG ATC CAA GCT TCA TGC
GAA GGC TCT-3'2. Primer für die Herstellung von li-HEL Δ ws

T7: 5'-AAT ACG ACT CAC TAT AG-3'

BGH-revers: 5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'

HEL-34-45-li: 5'-TTC GAA TCT AAT TTT AAT ACA CAA GCA ACT AAT AGA TCC
ATG GAT AAC ATG CTC CTT GG-3'HEL-34-45-li-revers: 5'-GTA TTA AAA TTA GAT TCG AAA AGC TTC ATG CGA AGG
CTC TC-3'3. Primer für die Herstellung von HEL-Tri41

HEL-N-Term: 5'-GAT CTC TAG ACT CGA GAT GAG GTC TTT GCT AAT C-3'

HEL-C-Term-Tri-revers: 5'-CTG GGT CAT GTT GCC GTA CAG CCG GCA GCC-3'

Tri31N-Term: 5'-GAT CAG AGG CTG CCG GCT GTA CGG CAA CAT GAC CCA G-3'

PrimEx8-revers: 5'-CAC AGG AGA GCA GGG GG-3'

BGH-revers: 5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'

4. Primer für die Herstellung von HELnoLeader und HEL-Tri41noLeader

HELnoLeader: 5'-GAT CCC CCT GAC CAT GAA AGT CTT TGG ACG ATG TGA G-3'

BGH-revers: 5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'

Für die PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

1 μ l	10 ng cDNA
5 μ l	PCR-Puffer 10x mit (NH ₄) ₂ SO ₄ (MBI)
3 μ l	MgCl ₂ 25 mM (MBI)
0,75 μ l	DMSO
1 μ l	Primer 50 pM
1 μ l	Reverser Primer 50 pM
1 μ l	Taq-Polymerase (MBI)
2,5 μ l	dNTP-MIX je 5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (MBI)
Ad 50 μ l	ddW

Die PCR wurde im allgemeinen mit folgendem Programm durchgeführt:

- | | | | |
|----|-------|----------|---------------|
| 1. | 95 °C | 5 min | |
| 2. | 95 °C | 30 sec * | Denaturierung |
| 3. | 52 °C | 30 sec * | Annealing |
| 4. | 68 °C | 1 min * | Elongation |
| 5. | 68 °C | 5 min | |
| 6. | +4 °C | PAUSE | |
- *30 Wiederholungen

2.1.7 Fusions-PCR und TOPO-Klonierung

Für die Klonierung der rekombinanten li-HEL Moleküle und der HEL-Tri Moleküle diente li41 cDNA und hen egg lysozyme cDNA als Ausgangsprodukt. Mittels PCR wurden zunächst die einzelnen Fragmente in getrennten Reaktionen hergestellt und in der anschließenden Fusions-PCR beide Fragmente fusioniert, da die Primer eine komplementäre Sequenz am 5' Ende besitzen, die mit der Sequenz des zweiten Fusionsfragments übereinstimmt. Die Fusions-PCR enthielt jeweils 10 ng des 1. und 2. PCR-Produkts als Template. Das Fusions-PCR-Produkt wurde in den Zwischenvektor pPCRII (Invitrogen) nach Herstellerangaben kloniert. Nach PCR mit Taq-Polymerasen besitzen die amplifizierte Fragmente einen Adenin-Überhang. Der linearisierte Vektor besitzt am 5' und 3' Ende einen Thymidin-Überhang und eine kovalent gebundene Topoisomerase, die die Ligation des Vektors mit dem PCR-Produkt katalysiert. Mittels flankierender EcoRI-Schnittstellen konnte das PCR-Produkt aus dem Zwischenvektor herausgeschnitten werden und in den pcDNA3.1(-) Vektor eingebracht werden.

2.1.8 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation durch Hitzeschock

Folgender Bakterienstamm wurde für die Klonierung der li-HEL Moleküle in den pcDNA3.1(-) Vektor benutzt:

Escherischia coli (E.coli) DH5 α (Hanahan et al. 1985):

Genotyp: F⁻, ϕ 80 Δ lacZM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺), supE44, relA1, deoR, Δ (lacZ[']IAargF)U169

Für die Klonierung des li-HEL Δ sw, des li-HEL Δ ws, des HEL-Tri41, des HEL-Tri41 no Leader, des HEL und des HEL no Leader Moleküls wurde der Bakterienstamm E.coli F TOP10 verwendet.

Genotyp F TOP10 (Invitrogen): F⁻, ϕ 80 Δ lacZM15, recA1, endA1, nupG, galU, galK, rpsL(Str^R), araD139 Δ (araleu)7697, lacX74, mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC).

Alle hergestellten rekombinanten Plasmid-DNAs wurden mittels Hitzeschock (1 min bei 42 °C) in die chemisch kompetenten Bakterien eingebracht, und da alle Vektoren das Ampicillinresistenzgen tragen mit Ampicillin selektioniert. Die transformierten Bakterien wurden in LB-Medium (Difco, USA) oder LB-Agar (1,5 %) in Gegenwart von 100 μ g Ampicillin/ml (Sigma-Aldrich) kultiviert.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle verwendeten Suspensionszelllinien (A20, 3A9, 3B11, CTLL-2) wurden in RPMI 1640 Medium, 10 % FCS (Conco-Lab, Wiesbaden), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 50 μ M β -Mercaptoethanol, 100 μ g/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin bei 37 °C, 5 % CO₂ in feuchter Atmosphäre kultiviert. CTLL-2 Zellen benötigen zum Wachstum IL-2 (Sigma-Aldrich), das dem kompletten Medium in einer Konzentration von 1 ng/ml zugefügt wurde. Primäre Milzlymphozyten wurden ebenfalls in RPMI 1640 mit gleichen Zusätzen, aber mit 8 % FCS, mit 50 μ g/ml Gentamycin (Sigma-Aldrich) und mit 0,25 μ g/ml Amphotericin B (Biochrom, Berlin) gehalten. Adhärenz wachsende Zellen wurden in DMEM Medium 10 % FCS (Biochrom, Berlin), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 10 mM HEPES, 100 μ g/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin mit 4,5 g/ml Glukose (COS7) oder 1,5 g/ml Glukose (Fibroblasten) ebenfalls bei 37 °C, 5 % CO₂ in feuchter Atmosphäre kultiviert. Durch regelmäßige mikroskopische Kontrolle wurde ein bakterien- und pilzfreies Wachstum sichergestellt und die Zellen alle zwei bis drei Tage passagiert. Die Medien und die Zellzusätze wurden von der Fa. BioWitthaker-Cambrex (Belgien) bezogen.

Tab.2.1 verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
COS7	Adhärenzte Affennierenzellen, SV40 transformiert	DSMZ ACC 60
KK18	Adhärenzte Fibroblasten (L-Zellen) aus C3H Maus, stabil mit muriner MHC Klasse II (I-A ^K) transfiziert, Selektion durch HAT; dieser Subklon zeichnet sich durch sehr geringe Mengen endogener li aus	Landais et al., 1986
3A9	T-Zellhybridom, erkennt HEL-Epitop 46-61 auf I-A ^K Molekül	Allen et al., 1984
3B11	T-Zellhybridom, erkennt HEL-Epitop 34-45 auf I-A ^K Molekül	Adorini et al., 1988
CTLL-2	IL-2 abhängiges CTL-Lymphom, aus C57BL/6 Mäusen isoliert	Baker et al., 1979
A20-2J	B-Zelllymphom aus BALB/c Mäusen MHC: H2 ^d Haplotyp	Robinson et al., 1983

2.2.2 Transiente Expression rekombinanter Proteine in COS7 Zellen

0,5 · 10⁶ COS7 Zellen wurden zwei bis vier Stunden vor Transfektion in eine Vertiefung einer 6-well Schale mit 2 ml Kompletmedium ausplattiert. 1 bis 3 µg Plasmid-DNA wurde in 100 µl DMEM-Medium ohne Zusätze verdünnt und nach Zugabe eines liposomalen Transfektionsmittels (DOSPER, FuGENE 6, Fa. Roche) im Verhältnis von 3:1 (Transfektionsmittel : DNA) 20 min bei RT inkubiert und anschließend zu den COS7 Zellen gegeben. Diese wurden für weitere 24-48 Std. kultiviert und anschließend für biochemische Analysen verwendet.

2.2.3 Stabile Transfektion von Fibroblasten

Die stabile Transfektion von L-Fibroblasten (KK18) erfolgte mit der Calciumpräzipitatmethode. Dazu wurden 5 · 10⁵ L-Zellen in einer Petrischale (10 cm Durchmesser) ausgesät und in DMEM-Kompletmedium 24 Std. kultiviert. Insgesamt maximal 20 µg Plasmid-DNA wurden in sterilem Wasser (ad 450 µl) und 50 µl 2,5 M CaCl₂ verdünnt. Durch Zugabe von 500 µl zweifach-konzentrierter HBS-Lösung (0,280 M NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 0,05 M HEPES, pH: 7,0) und Inkubation von einer Stunde unter leichtem Schütteln bilden sich feine Calciumphosphat-Kristalle, an die sich DNA anheftet. Anschließend wird das Präzipitat zu den L-Zellen, die vier Stunden

zuvor mit frischem Medium versorgt wurden, gegeben. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1 mg/ml Geneticin (Sigma-Aldrich) selektioniert. Alle drei Tage wurde das Medium (mit 1 mg/ml Geneticin) gewechselt und nach ca. 10 Tagen waren die ersten resistenten Zellklone zu sehen. Die gesamten transfizierten Zellen wurden passagiert, vermehrt und mit 0,5 mg/ml Geneticin kultiviert.

2.2.4 Isolation von Milzzellen

Nachdem den Mäusen exorbital Blut zur Gewinnung von Serum entnommen wurde, erfolgte die Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation und die Entnahme der Milz. Um die Milzlymphozyten zu gewinnen wurde die Milz durch ein steriles Zellsieb (70 µm Nylon, Falcon BD, USA) gedrückt und anschließend die Milzzellsuspension zweimal mit eiskaltem RPMI 1640 ohne Zusätze gewaschen. Die Erythrozyten wurden durch einen hypertonen Puffer (0,15 M NH₄Cl, 0,01 M KHCO₃, 0,01 mM Na₂EDTA) zum Platzen gebracht (Inkubation 30 min +4° C) und die Zelltrümmer und das Hämoglobin durch anschließendes zweimaliges Waschen entfernt. 2·10⁵ Milzzellen (in 100 µl Kompletmedium) wurden pro Vertiefung in eine 96 U-well Platte pipettiert und im T-Zellproliferationstest eingesetzt.

2.2.5 T-Zell Proliferationstest

Die Milz enthält viele verschiedene Sorten von Immunzellen vor allem aber B- und T-Lymphozyten. Nach der Aktivierung teilt sich ein Lymphozyt. Diese klonale Expansion der Lymphozyten ist charakteristisch für die adaptive Immunabwehr und wird auch durch Impfungen hervorgerufen. Einige Antigen-spezifische Lymphozyten bleiben nach der Impfung erhalten und können bei erneuter Aktivierung durch das Antigen wiederum proliferieren. Für die Aktivierung von T-Zellen sind zwei Signale notwendig, die Erkennung von Peptid-beladenen MHC Klasse II Molekülen auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) durch den Antigen-spezifischen T-Zellrezeptor und ein costimulatorisches Signal. Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen sind Antigen-präsentierende Zellen, die in der Milz vorkommen und T-Zellen zur klonalen Expansion veranlassen können. Drei bis zehn Tage nach der DNA-Vakzinierung wurden die Milzzellen entnommen (siehe 2.2.3) und im Proliferationstest eingesetzt. 2·10⁵ Zellen wurden mit 100µl HEL-Protein Lösung (10 µg/ml HEL-Protein, Sigma-Aldrich, in RPMI Kompletmedium) 96 Std. bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Es wurden jeweils drei parallele Ansätze mit und ohne Antigen pipettiert. Nach Zugabe von 1 mCi

³H-Thymidin (Amersham, Braunschweig) wurden die Zellen weitere 16-18 Stunden kultiviert. Die Antigen-spezifischen proliferierenden Zellen bauen bei der Zellteilung das radioaktive ³H-Thymidin in die sich replizierende DNA ein. Die so markierten Zellen werden mittels einer Vakuumpumpe und eines Harvesters (Canberra-Packard, Dreiech) auf Glasfaserfilter, an der die DNA haften bleibt, geerntet. Anschließend werden die Filter durch Aufbringen eines speziellen Wachses (Meltilex, Wallac/PerkinElmer, Belgien) szintilliert und die β -Strahlung (im β -counter, Wallac/Perkin-Elmer) als count pro Minute (cpm) gemessen. Die β -Strahlung ist direkt proportional zur Menge des eingebauten Thymidin-Isotops und ein Maß für die Proliferation der T-Zellen. Die Differenz (Δ cpm) der gemessenen Strahlung der Proben mit Antigen und ohne Antigen ergibt die HEL-spezifische Proliferation der Milzzellen immunisierter Mäuse.

Δ cpm = (cpm Milzzellen mit HEL-Antigen) – (cpm Milzzellen ohne HEL-Antigen)

2.2.6 IL-2 abhängiger Proliferationstest

Aktiviert, proliferierende T-Zellen schütten nach Stimulation durch Antigen-präsentierende Zellen IL-2 aus. Zunächst werden stabil mit I-A^k und den li-HEL bzw. HEL-Tri Molekülen transfizierte Fibroblasten in einer Konzentration von 10⁵ Zellen zusammen mit 10 μ g/ml HEL-Protein 24 Std. bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10⁴ T-Lymphomzellen. Die 3A9 T-Lymphomzellen erkennen das HEL-Epitop aa 46-61 und die 3B11 T-Lymphomzellen erkennen das HEL-Epitop aa 34-45 jeweils präsentiert durch das murine MHC Klasse II Molekül I-A^k. Nach weiteren 24 Std. Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurde die Mikrotiterplatte bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert und 100 μ l des Zellüberstandes in eine neue 96-well Mikrotiterplatte überführt. 5·10³ CTLL-2 Zellen in 100 μ l Vollmedium (ohne IL-2 Zusatz) wurden hinzugegeben und 24 Std. im Brutschrank kultiviert. Die CTLL-2 Zellen wurden 3 Tage vor Zugabe des Überstandes mit 1 ng/ml IL-2 gefüttert. Zu den CTLL-2 Zellen mit dem Zellüberstand der T-Lymphomzellen wurde 0,5 mCi ³H-Thymidin geben und, wie bereits unter 2.2.4 beschrieben, die proliferierenden ³H-Thymidin-markierten Zellen geerntet und die β -Strahlung als cpm bestimmt. Alle Ansätze wurden als Dreifachmessung bestimmt. Als Kontrolle dienten CTLL-2 Zellen, die mit rekombinantem IL-2 (2 ng/ml) inkubiert wurden.

2.2.7 FACS Analyse

Im Durchflusszytometer (FACS = Fluorescence activated cell sorter) wird das Streulicht einzelner Zellen analysiert. Die zu untersuchenden Zellen können mittels Fluorochromen oder Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper definiert werden. MHC Klasse II Moleküle werden auf der Zelloberfläche mit monoklonalen Primärantikörpern detektiert und mittels eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpers angefärbt.

KK18-Fibroblasten, die bereits mit dem murinen MHC Klasse II Molekül I-A^k transfiziert waren, wurden zusätzlich mit den verschiedenen Ii-HEL Molekülen stabil transfiziert, selektioniert und im FACS auf die MHC Klasse II Oberflächenexpression analysiert. Es wurden 10^6 transfizierte Fibroblasten mit dem anti I-A^k Antikörper 17-227 (siehe Tab. 2.2) in einer Verdünnung von 1:1000 in FACS-Puffer (PBS, 2 % FCS, 0,01% NaN₃) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit einem Fluoresceinisothionat (FITC)-gekoppelten Zweitanikörper (goat anti mouse-FITC, Dianova, Hamburg) für 15 min bei +4 °C inkubiert, wodurch die MHC Klasse II Moleküle auf der Zelloberfläche angefärbt wurden. Anschließend wurde die FITC-Fluoreszenz im Kanal 1 des Durchflusszytometers gemessen. Nach statistischer Auswertung von 10000 lebenden Zellen wird die Fluoreszenzintensität als MFI (mean fluorescence intensity) in einem Histogramm dargestellt und ist proportional zur Anzahl der angefärbten Oberflächenmoleküle. Die Messung im Durchflusszytometer erfolgte mit identischen Einstellungen aller Parameter eines Ansatzes, wobei jeweils Doppelansätze gemessen wurden.

2.3. Biochemische Methoden

2.3.1 Biosynthetische Markierung zellulärer Proteine und Immunpräzipitation

Ca. $5 \cdot 10^6$ transient transfizierte COS7 Zellen wurden mit PBS abgewaschen und für 1 Std. bei 37 °C in 500 µl Methionin-freiem RPMI Medium (Biochrom), 10 % dialysiertem FCS (Gibco, BD, Heidelberg), 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin und 10 mM Hepes inkubiert. Die zellulären Proteine wurden durch Zugabe von 30 µCi ³⁵S-Methionin (Amersham) 10-30 min markiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen bei -20 °C eingefroren. Die markierten Zellen wurden mit 1 % NP40 in TBS-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH: 7,5) 1 mM PMSF und 1 mM Aprotinin (Sigma-Aldrich) für 30 min auf Eis lysiert. Zelltrümmer wurden durch einminütige Zentrifugation (13000 rpm) aus dem Lysat entfernt. Für den Nachweis von SDS-

stabilen Dimeren werden die Zellen nach der radioaktiven Markierung für weitere 6 Std. in Kompletmedium kultiviert und anschließend lysiert. Proteine wurden durch spezifische Antikörper und Protein A-Sepharose (Amersham) über Nacht bei +4 °C präzipitiert. Nach dreimaligem Waschen (TBS-Puffer mit 0,1 % NP40) wurde das Präzipitat mit einem SDS- und DTT-haltigen Probenpuffer (62,5 mM Tris, 50 mM DTT, 2,3 % SDS, 10 % Glycerol, 0,1 % Bromphenol Blau, pH: 6,8) versetzt. Durch Erhitzen (95 °C, 5 min) in Probenpuffer wurden die Bindungen zwischen markierten Proteinen und Antikörpern gelöst. Die markierten Proteine können anschließend in einem SDS-Acrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Tabelle 2.2 Antikörper, die zur Immunpräzipitation und im Western Blot eingesetzt wurden:

Antikörper	Spezifität	Art und Konzentration des Antikörpers	Referenz
In-1	N-Terminus(aa1-29) murine li	mAk Ratte, IgG2a, Hybridomüberstand 20fach konzentriert	Koch et al., 1982
MAR 18.5	Ratten IgG	mAk Ratte, IgG2a, Hybridomüberstand 20fach konzentriert	Lanier et al., 1982
17-227	I-A ^k Molekül	mAk Maus , IgG2a, Hybridomüberstand 20fach konzentriert	Lemke et al., 1979
10.2.16	I-A ^k β-Kette	mAk Maus , IgG2a, Hybridomüberstand 20fach konzentriert	Oi et al., 1978
Anti-V5	V5-Epitop: -Gly-Lys-Pro-Ile-pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr-	mAk Maus, IgG2a	Fa. Invitrogen
anti-HEL-Serum	HEL-Protein	Polyklonales Kaninchenserum 10mg/ml HEL-spezifische Ak	Fa. Chemicon

2.3.2 Behandlung immunpräzipitierter Glykoproteine mit Endoglykosidase (Endo) H

Nach ihrer Synthese im ER werden viele Proteine posttranslational modifiziert und Zuckerseitenketten N-glykosidisch angehängt. Endoglykosidase H spaltet N-gebundene Zuckerseitenketten von modifizierten Proteinen ab. Die N-glykolisierten Proteine im ER sind gegenüber Endoglykosidase H sensitiv. Im Golgi-Apparat werden diese N-gebundenen Zuckerseitenketten weiter modifiziert, so dass sie gegenüber

Endo H resistent werden, d.h. nicht mehr von Endoglykosidase H gespalten werden können. Für biochemische Untersuchungen werden 18 µl des Zelllysats oder 18 µl in destilliertem Wasser resuspendierte, immunpräzipitierte ³⁵S-markierte Proteine (an Protein A-Sepharose gebunden) mit jeweils 2 µl 10x Denaturierungspuffer (5 % SDS, 10 % β-ME, NEB) versetzt und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Nach Zentrifugation (1 min, 13000 rpm) wird der abgekühlte Überstand mit 3 µl Puffer G5 (0,5 M Natriumcitrat, NEB) und 3,5 µl Endo H (rekombinant, 100000 U, NEB) ad 30 µl ddW zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend können die Proteine in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli

³⁵S-markierte Proteine oder Proteine aus Zelllysaten transfizierter Zellen können aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden. Proteine werden durch das Detergenz SDS denaturiert und negativ geladene SDS-Moleküle binden an die hydrophoben Gruppen proportional zu dem Molekulargewicht des Proteins, wodurch die Eigenladung des Proteins überlagert wird.

Das im Probenpuffer ebenfalls enthaltene DTT reduziert die inter- und intramolekularen Disulfidbrücken und läßt Proteine in ihre Untereinheiten bzw. monomere Formen zerfallen. An der Grenze zwischen großporigem Sammelgel (Acrylamidanteil von 4 %) und höherprozentigem Trenngel (Acrylamidanteil 12 % oder 16 %) werden die Proteine fokussiert und anschließend im elektrischen Feld (120 V) nach ihrer Größe aufgetrennt. 30 %iges Acrylamid/Bisacrylamid (Verhältnis 37,5:1) wurde von der Fa. BioRAD (München) bezogen und alle verwendeten Lösungen und SDS-Gele nach Herstellerangaben hergestellt. Folgende Proteinmarker wurden verwendet: Kaleidoscope Prestained Standards (BioRAD): 7,1; 18,1; 31,8; 41,3; 89; 131; 210 kDa; Prestained Protein Marker, broad range (NEB): 6,5; 16,5; 25; 32,5; 47,5; 62; 83; 175 kDa und der ¹⁴C-Proteinmarker (Amersham): 14,3; 30; 46; 66; 97,4; 220 kDa.

Autoradiographie nach Bonner und Lansky

Zur Verstärkung der im Acrylamid-Gel gebundenen Radioaktivität wird das Gel 30 min mit DMSO entwässert und anschließend in 20 % PPO/DMSO weitere 30 min inkubiert. Das DMSO wird durch Wässern des Gels für 30 min entfernt. Die gewässerten Gele werden unter Vakuum getrocknet. Das eingelagerte PPO bewirkt die Verwandlung der energiereichen Strahlung in eine für den Röntgenfilm (Kodak BiomaxMR, Amersham) empfindliche Strahlung.

2.3.4 Proteinnachweis durch Western Blot Analyse

Beim Blotten werden die negativ-geladenen Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Die Proteine binden durch hydrophobe Wechselwirkungen an eine Nitrozellulosemembran. Ca. eine Millionen adhärenente Zellen werden mit EDTA-Lösung (0,5 mM in PBS) vom Kulturgefäß abgelöst und zweimal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wird in 30 µl Lyse-Puffer (TBS, 1% NP40, 1 mM Aprotinin, 1 mM PMSF) für 60 min bei +4 °C lysiert und abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Anschließend wird der Überstand mit reduzierendem vierfach-konzentrierten Probenpuffer versetzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in der SDS-PAGE. Anschließend wird das Acrylamidgel für 15 min gewässert.

Die Übertragung auf die Membran erfolgte in einer Halbtrockenkammer (BioRAD) auf eine mit Transferpuffer (48 mM Tris base, 39 mM Glycin, 0,0375% SDS, 20% Methanol)-getränkte Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel) für 45-60 min bei 20 V und 0,8 x cm² des Gels mA. Die unbesetzten Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran werden nach dem Transfer durch ein Blockierungsreagenz (Roti-Block 1:10 in PBS, Fa. Roth, Karlsruhe) abgesättigt (Inkubation 1 Std. bei RT).

Der Primärantikörper wird ebenfalls in Roti-Block verdünnt und ÜN bei +4°C inkubiert. Als Primärantikörper wurden die in Tab. 2.2 aufgeführten Antikörper benutzt. Konzentrierte Hybridomüberstände wurden 1:100 bis 1:1000 verdünnt, polyklonale Kaninchenseren wurden 1:10000 in 0,5 g D-Glukose und 0,5 ml Glycerol pro 10 ml Roti-Block-PBS verdünnt. Nach mehrmaligem, intensiven Waschen der Membran mit PBS/0,2 % Tween 20 wurde die Membran mit Peroxidase- oder Horse-radish-Peroxidase (HRP)-gekoppeltem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:3000 bis 1:10000) in Roti-Block-PBS für 1,5 Std. bei RT inkubiert (siehe auch Tab. 2.3). Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol und löst eine Chemilumineszenz aus, dessen Lichtentwicklung auf einem Film (X-OMAT blue, Kodak) gemessen werden kann.

Tab. 2.3 Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse

Sekundär-Antikörper	Spezifität	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus Ig HRP	goat anti mouse Ig	1:3000	DAKO, Hamburg P0744
Anti-Maus Ig HRP	rabbit anti mouse whole IgG molecule	1:10000 für WB	Sigma-Aldrich A0944
Anti-Ratte Ig HRP	rabbit anti rat Ig	1:3000	DAKO P0450
Anti-Kaninchen Ig Peroxidase	goat anti mouse whole IgG molecule	1:10 000	Sigma-Aldrich A0545

2.4 Tierexperimente

Alle Tierexperimente wurden mit dem Mausstamm C3H He durchgeführt, die Tiere wurden von Harlan Winkelmann (Borchen) bezogen. Der C3H He Inzucht-Mausstamm zeichnet sich durch folgende genetische Merkmale aus: MHC Locus H2^K. Die Tierversuche wurden von der Bezirksregierung Köln (AZ 50.203.2-BN 23, 37/01) genehmigt.

2.4.1 DNA-Injektion mittels Gene Gun

C3H He Mäuse wurden im Alter von 6-8 Wochen immunisiert. Die Tiere wurden in Gruppen aufgeteilt und jeweils mit einem DNA-Konstrukt geimpft. Es waren jeweils gleich viele männliche und weibliche Tiere in einer Gruppe. Das Fell der Tiere wurde im Bereich des unteren Abdomen rasiert, und mit einem Heliumdruck von 300 psi wurde jeweils einmal 2 µg DNA gebunden an Goldpartikel mit einem Durchmesser von 1 µm mit der Gene Gun intradermal appliziert. Die Tiere wurden bei der Prozedur nicht narkotisiert, da die DNA-Vakzinierung durch ballistischen Transfer ohne Verletzungen erfolgt, man erkennt lediglich eine leichte Rötung, die nach einigen Stunden nicht mehr vorhanden ist. Bei Mehrfachimmunisierungen wurden die Tiere jeweils im Abstand von 10 Tagen immunisiert. Die Milzzellen zum Nachweis von HEL-spezifischen proliferierenden T-Zellen wurden 4-10 Tage nach der letzten Impfung entnommen (siehe 2.2.4). Vor der Organentnahme wurde den Tieren exorbital Blut entnommen, welches bei 37 °C für 5 min zum Gerinnen gebracht wurde. Das Serum, durch Zentrifugation (10 min, 2000 rpm) von den festen Bestandteilen getrennt, wurde anschließend bei -20 °C gelagert. Bei einmaliger Immunisierung erfolgte die Serumgewinnung 19-21 Tage nach der Impfung.

2.4.2 Nachweis von HEL-spezifischen Antikörpern durch ELISA

Zum Nachweis von HEL-spezifischen Antikörpern aus dem Serum der geimpften Mäuse wurde ein enzyme linked immune adsorbent assay (ELISA) durchgeführt. Lyophilisiertes HEL-Protein wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml in Coating Puffer (0,1 M Na₂HPO₄, pH: 9) gelöst. Jeweils 50 µl dieser Lösung wurde in eine Polysterol-ELISA Platte (Falcon, BD, Heidelberg) pipettiert, an die die Proteine ÜN bei +4 °C in der feuchten Kammer binden. Die ELISA-Platte wird einmal mit PBS gewaschen und die ungesättigten Bindungen der Platte mit Roti-Block (1:10 in PBS) bei 37 °C für eine Stunde abgedeckt. Die Mausseren werden 1:100 bis 1:10 000 in PBS verdünnt und

jeweils 50 µl als Dreifachansatz in die Platte gegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde intensiv fünfmal mit PBS/0,1 % Tween 20 gewaschen. Ein Peroxidase gekoppelter-Sekundärantikörper gegen Mausimmunglobuline (A0944, Sigma-Aldrich) wurde 1:10000 in PBS/BSA verdünnt und wiederum für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Als Substrat/Farblösung wurde nach dreimaligem Waschen 0,01 % H₂O₂ in 1 mg/ml ABTS in Citratpuffer (40 mM Citrat, 60 mM Na₂HPO₄, pH: 4-5) zugeben. H₂O₂ wird durch das Enzym Peroxidase zu 2OH⁻ Ionen reduziert und dabei der Farbstoff ABTS von hellgrün zu dunkelgrün oxidiert. Der enzymatische Farbumschlag wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA Reader (DynaTech, Heidelberg) gemessen. Zur Bestimmung der absoluten Konzentration von HEL-spezifischen Antikörpern wurde ein aufgereinigtes anti-HEL Serum mit bekannter HEL-Antikörperkonzentration (10 mg/ml, Chemicon, USA) ebenfalls im ELISA eingesetzt und die Steigung der Eichgerade (x = Antikörperkonzentration, Y = OD₄₀₅) zur Berechnung der absoluten Konzentration von HEL-spezifischen Antikörpern benutzt.

2.5 Verwendete Computersoftware und Datenbanken

Für die Tabellenkalkulation, die Darstellung der Diagramme und die statistischen Auswertungen wurden die Programme Excel 2000 (Microsoft Corporation, USA) und PRIZM Version 3 (GraphPad Software Inc., USA) verwendet. Kontinuierliche Parameter zwischen den einzelnen Gruppen wurden, da sie nicht normalverteilt waren, mit den Mann-Witney-U-Test verglichen. Wahrscheinlichkeiten $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen. Für die Darstellung und Auswertung der FACS-Analysen wurde das Programm WinMDI 3.1 (von Josef Trotter) verwendet. Zur Vorhersage von T-Zellepitopen wurde das Programm SYFPEITI von H.G. Rammensee (www.syfpeiti.de) benutzt.

3. Ergebnisse

3.1 Beschreibung und Charakterisierung der rekombinanten Fusionsproteine (Ii-HEL) aus der Invarianten Kette und den antigenen Epitopen des Hühnereiweißlysozoms

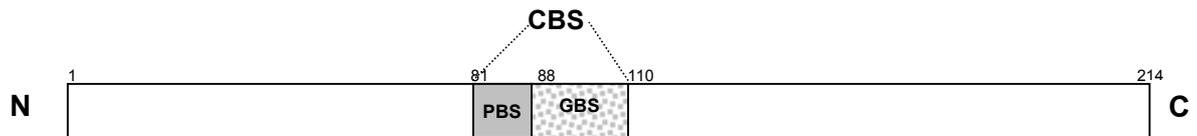
Die rekombinanten Moleküle, die aus der Sequenz der Invarianten Kette Ii31 und den antigenen Epitopen des Hühnereiweißlysozoms (HEL) bestehen werden als Ii-HEL bezeichnet. Über das Sortierungssignal der cytosolischen Domäne der Invarianten Kette sollen die Ii-HEL Fusionsproteine in den MHC Klasse II Prozessierungsweg eingeführt werden.

Die MHC Klasse II Bindungsdomäne (CBS = class II binding site) der Invarianten Kette ist für die Assoziation der Invarianten Kette mit MHC Klasse II Molekülen verantwortlich. Die CBS-Region besteht aus einer promiskuitiven Bindungsseite (PBS, aa 81-87), die für die Assoziation an die verschiedenen MHC Klasse II Allele verantwortlich ist und einem Grube-bindenden Segment (GBS, aa 91-99), das mit der Peptidbindungsgrube der MHC Klasse II Moleküle interagiert.

Bei vier der rekombinanten Fusionsmoleküle wurde die GBS-Region der Ii31 durch ein T-Zellepitop des Hühnereiweißlysozoms ersetzt (siehe Abb. 3.1). Bei drei weiteren Ii-HEL Konstrukten wurden antigene Sequenzen des Hühnereiweißlysozoms hinter das letzte kodierende Exon (Exon 8) der Invarianten Kette kloniert. Es wurden fünf verschiedene rekombinante Moleküle hergestellt, die zwei antigene HEL-Sequenzen besitzen, jeweils in der GBS-Region und am C-Terminus. Bei zwei dieser rekombinanten Moleküle wurde die PBS-Region (bezeichnet mit Δ) deletiert.

Als Antigene wurden verschiedene, bereits bekannte CD4⁺ T-Zellepitope des Hühnerweißlysozoms, die an das murine MHC Klasse II Molekül I-A^k binden, ausgewählt. Das HEL-Epitop 49-62 mit der Aminosäuresequenz **G S T D Y G I L Q I N S R Y** bindet mit hoher Affinität an das murine MHC Klasse II Molekül I-A^k. Die verkürzte Sequenz dieses Epitops HEL 52-61 (Aminosäuresequenz **D Y G I L Q I N S R**) bindet mit mittlerer Affinität an das I-A^k Molekül. Der Austausch der Aminosäure Leucin (L) gegen Isoleucin (I) in Position 56 des mutierten HEL-Epitops 52-61 vermindert nicht die Bindungsaffinität an das MHC Klasse II Molekül I-A^k, sondern beeinflusst die TCR-Erkennung. Das HEL-Epitop 34-45 (**F E S N F T Q A T N R**) bindet mit niedrigerer Affinität als die Epitope 49-62 und 52-61 an die Aminosäureseitenketten in der Bindungsgrube von I-A^k. Anhand dieser Ii-Fusionsmoleküle, die unterschiedlich affine HEL-Epitope besitzen, sollte *in vitro* untersucht werden, ob eine Konkurrenz der Epitope stattfindet und ob dabei die Position der antigenen Sequenz in der Invarianten Kette eine Rolle spielt.

Murine Invariante Kette li31:



Rekombinante li-HEL Moleküle:

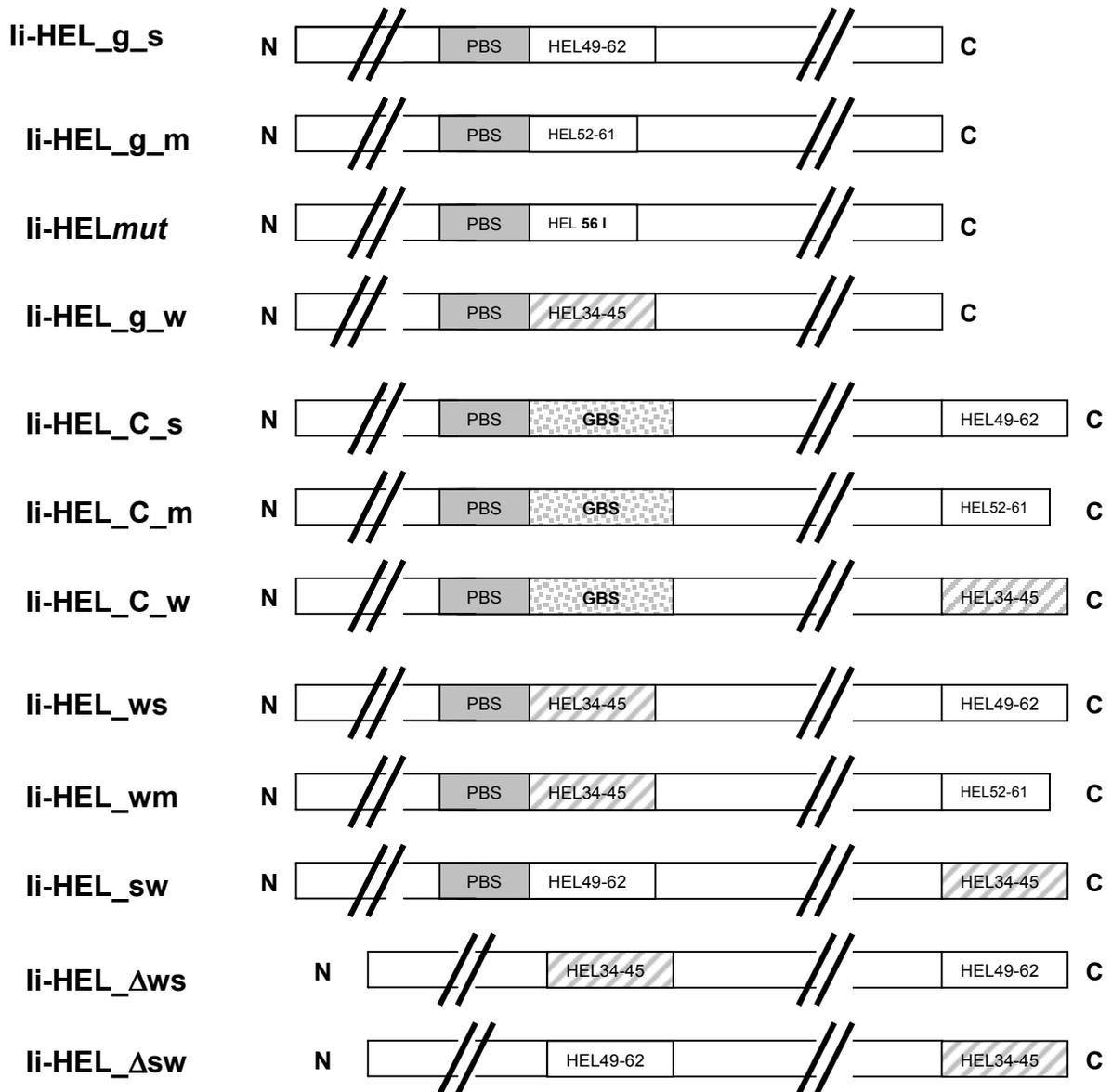


Abb. 3.1 Schematische Darstellung und Nomenklatur der murinen li31 und der li-HEL Proteine.

Die Grube-bindende Region (GBS) der li31 wurde gegen ein antigenes T-Zell-Epitop ausgetauscht. Hinter das letzte Codon der li31 wurde ebenfalls ein HEL-Epitop angehängt. Die li-HEL Moleküle wurden wie folgt bezeichnet: Befindet sich die antigene HEL-Sequenz in der Grube-bindenden Region der li wurde das Konstrukt mit dem Buchstaben *_g* versehen. Wenn sich das antigene HEL-Epitop am C-Terminus der li befindet, wurde das Konstrukt mit *_C* bezeichnet. Anschließend folgt ein Buchstabe für das HEL-Epitop. Es wurde zwischen dem hoch affinen (*s* = strong) HEL-Epitop 49-62 –GSTDYGIHQINSR– und dem minimalen (*m*) Epitop HEL 52-61 –DYGIHQINSR– und dem schwach bindenden (*w* = weak) HEL-Epitop 34-45 –FESNFTQATNR– unterschieden. Bei li-HEL Konstrukten mit zwei Epitopen wurde das Epitop in der GBS zuerst genannt und danach das am C-Terminus (z.B. li-HEL_{sw}). Die li-HEL Moleküle ohne die PBS-Region werden mit Δ z.B. als li-HEL_{Δsw} bezeichnet.

3.1.1 Expression der rekombinanten li-HEL Fusionsproteine

Es sollte überprüft werden, ob die Fusionsproteine aus Invarianter Kette und HEL-Epitop (li-HEL) im eukaryotischen Zellsystem exprimiert werden können. COS7 Zellen wurden transient mit jeweils 1 µg Plasmid-DNA der murinen Invarianten Kette li31 oder der li-HEL Konstrukte transfiziert. COS7 Zellen besitzen keine MHC Klasse II Moleküle und keine Invariante Kette. Die Expression der rekombinanten li-HEL Proteine in COS7 Zellen wurde mittels radioaktiver biosynthetischer Markierung, Immunpräzipitation und anschließender SDS-PAGE untersucht. Abbildung 3.2 zeigt die Expression aller li-HEL Moleküle und der murinen Invarianten Kette li31 mit einer Größe von 31 kDa. Die verschiedenen rekombinanten li-HEL Konstrukte besitzen ebenfalls ein Molekulargewicht von ca. 31 kDa, außer den Proteinen li-HEL_g_w, li-HEL_wm und li-HEL_ws, deren Banden liegen etwa 3 kDa höher als der Wildtyp (wt) der Invarianten Kette (li31). Die Größendifferenzen der li-HEL Konstrukte entstehen vermutlich durch unterschiedliche Beladung der Moleküle mit SDS. An dem Präzipitat untransfizierter COS7 Zellen erkennt man, dass Proteine aus COS7 Zellen mit dem In-1 Antikörper nicht präzipitiert werden. Bei den schwachen Banden unterhalb der li31 bzw. li-HEL handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte.

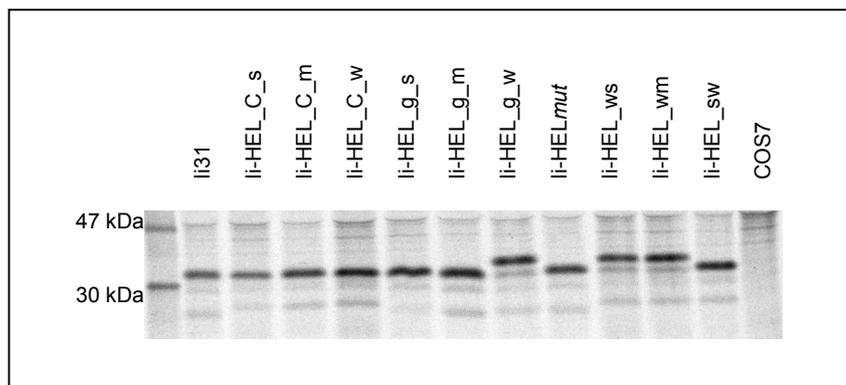


Abb. 3.2 Überprüfung der Expression der rekombinanten li-HEL Proteine in COS7 Zellen. 24 Std. nach der Transfektion mit Plasmid-DNA wurden die COS7 Zellen mit 30 µCi ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert und anschließend mit NP40 lysiert. Die Proteine aus den Zelllysaten wurden mit dem anti-li-Antikörper In-1 präzipitiert und elektrophoretisch in einem 12 % SDS-Gel auftrennt und fluorographisch detektiert.

Die Expression der rekombinanten li-HEL_Δsw und li-HEL_Δws Moleküle wurde ebenfalls durch transiente Transfektion von COS7 Zellen und SDS-PAGE (ohne Abbildung) überprüft. Das Molekulargewicht der li-HEL_Δsw und li-HEL_Δws Proteine liegt bei ca. 32 kDa, da die Moleküle keine PBS-Region aber zwei HEL-Epitope besitzen.

3.1.2 Assoziation von MHC Klasse II Molekülen mit den rekombinanten li-HEL Molekülen

Die Invariante Kette und MHC Klasse II Moleküle assoziieren unmittelbar nach ihrer Synthese im ER und bilden einen nonameren Komplex. Die promiskuitive Bindungsstelle (PBS) der Invarianten Kette bildet eine Interaktionsseite für MHC Klasse II Moleküle. Die PBS-Region ist in den hier vorgestellten rekombinanten li-HEL Konstrukten vorhanden und grenzt an die nachfolgende antigene HEL-Sequenz. Durch Koexpression der rekombinanten li-HEL Konstrukte mit MHC Klasse II Molekülen in COS7 Zellen sollte untersucht werden, ob die rekombinanten li-HEL Konstrukte MHC Klasse II Moleküle binden können. Die Assoziation von rekombinanten li-HEL Molekülen und murinem MHC Klasse II Molekül I-A^k wurde anhand von Kopräzipitationen biosynthetisch, radioaktiv markierter Proteine überprüft.

Eine Assoziation von I-A^k mit allen rekombinanten li-HEL Molekülen, die die PBS-Region besitzen, ist in Abb. 3.3 zu sehen. Man erkennt zwischen den α - und β -Ketten der I-A^k Moleküle eine dritte Bande, die entweder der murinen Wildtyp li31 oder den rekombinanten li-HEL Molekülen entspricht. In den Spuren der li-HEL_{g_w}, li-HEL_{wm} und li-HEL_{ws} Konstrukte erkennt man keine mittlere Bande, weil die li-HEL Bande die gleiche Größe wie die α -Bande von I-A^k besitzt. Dies konnte durch Größenvergleich parallel separierter li-HEL und I-A^k Moleküle gezeigt werden (nicht abgebildet).

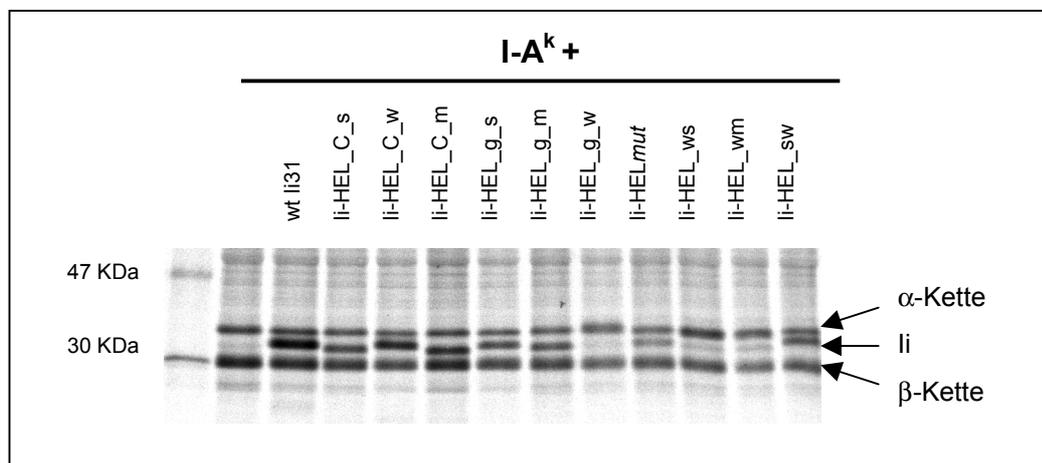


Abb. 3.3 Kopräzipitation von murinen MHC Klasse II Molekülen I-A^k und den rekombinanten li-HEL Konstrukten. SDS-PAGE der murinen li31, der rekombinanten li-HEL Proteine und der murinen MHC Klasse II Molekülen I-A^k nach transienter Koexpression in COS7 Zellen und Immunopräzipitation mit dem anti- I-A^k Antikörper 17-227.

3.1.3 Nachweis von SDS-stabilen MHC Klasse II Molekülen

Die α - und β -Ketten von MHC Klasse II Molekülen bilden stabile Komplexe mit hoch affinen, antigenen Peptiden. Die Stabilität dieser Komplexe ist von Reaktionsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur und denaturierendem Agens abhängig. Bei Raumtemperatur, einem pH-Wert von 6,8 und dem Zusatz von SDS findet man bei ca. 50 kDa ein Signal, das dem SDS-stabilen Komplex aus Peptid, α - und β -Kette von MHC Klasse II Molekülen entspricht. Durch Temperaturerhöhung dissoziiert der stabile Komplex wieder in die einzelnen Bestandteile. Alle rekombinanten li-HEL Konstrukte, die das hoch affine, antigene HEL-Epitop 49-62 (s) und das verkürzte HEL-Epitop 52-61 (m) besitzen, bilden zusammen mit I-A^K SDS-stabile Komplexe mit einer Größe von 50 kDa wie in Abb. 3.4 bei ungekochten Proben des li-HEL_g_s Moleküls exemplarisch gezeigt wurde. Erhitzt man die Probe auf 95°C, dissoziieren die stabilen Komplexe in ihre Einzelkomponenten.

Es werden SDS-stabile Komplexe mit li-HEL Proteinen gebildet, die das hoch affine HEL-Epitope am C-Terminus oder in der Grube-bindenden Region von der Invarianten Kette besitzen (siehe Tabelle 3.1). SDS-stabile Dimere findet man ebenfalls mit dem rekombinanten li-HEL^{mut} Protein, dessen TCR-Erkennungsstelle mutiert wurde. Die li-HEL Proteine mit dem schwach affinen HEL-Epitope 34-45 bilden mit α - und β -Kette von I-A^K keine SDS-stabilen Dimere, obwohl diese Moleküle die PBS-Region der Invarianten Kette besitzen. Bei den li-HEL Konstrukten mit zwei HEL-Epitopen findet man bei dem rekombinanten li-HEL_sw, das das hoch affine Epitop in der GBS besitzt, SDS-stabile Dimere. Bei den li-HEL Konstrukten mit dem schwach bindenden Epitop in der GBS und mit den hoch affinen Epitopen s (HEL 49-62) oder m (HEL 52-61) am C-Terminus kann man ebenfalls SDS-stabile Komplexe erkennen.

Tab. 3.1 Bildung von SDS-stabilen Dimeren

li-HEL Moleküle	HEL-Epitop	SDS-stabile Dimere
li-HEL_g_s	49-62	ja
li-HEL_g_m	52-61	ja
li-HEL ^{mut}	52-61, 56L	ja
li-HEL_g_w	34-45	nein
li-HEL_C_s	49-62	ja
li-HEL_C_m	52-61	ja
li-HEL_C_w	34-45	nein
li-HEL_wm	34-45, 52-61	ja
li-HEL_ws	34-45, 49-62	ja
li-HEL_Δws	34-45, 49-62	ja
li-HEL_sw	49-62 34-45	ja
li-HEL_Δsw	49-62 34-45	ja

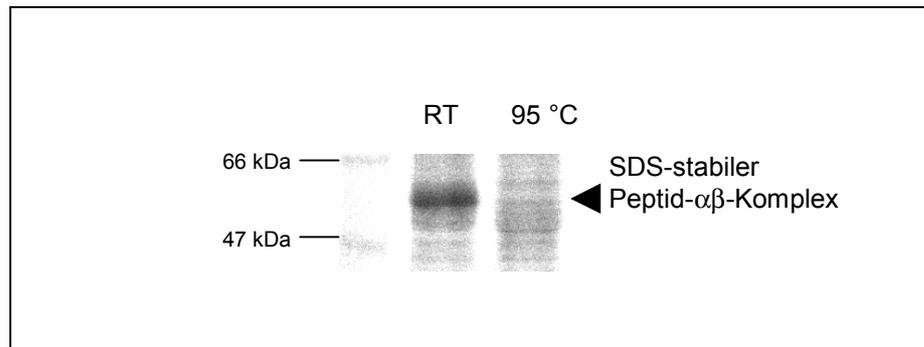


Abb. 3.4 Das hoch affine, antigene HEL-Epitope 49-62 bildet SDS-stabile Dimere mit dem murinen MHC Klasse II Molekül I-A^k. SDS-Page von I-A^k und li-HEL_g_m nach transienter Transfektion in COS7 Zellen. Proteine aus ³⁵S-Methionin markierten Zelllysaten wurden mit dem anti-I-A^k Antikörper 17-227 präzipitiert und anschließend mit einem SDS-haltigen Probenpuffer bei RT 60 min inkubiert oder bei 95°C 5 min erhitzt.

Die rekombinanten li-HEL Moleküle, die keine PBS-Region besitzen (li-HEL_Δsw, li-HEL_Δws) bilden ebenfalls mit I-A^k SDS-stabile αβ-Peptid-Komplexe, wie im Western Blot in Abbildung 3.5 zu sehen ist. Die SDS-stabilen Komplexe, die mit dem li-HEL_ws bzw. li-HEL_Δws Molekül gebildet werden, besitzen ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa. Während die li-HEL_sw bzw. li-HELΔsw Moleküle mit I-A^k einen Komplex von ca. 50 kDa bilden. Bei dem murinen MHC Klasse II Molekül I-A^k und I-E^k existieren zwei verschiedene Formen von αβ-Peptid-Komplexen mit unterschiedlichem Molekulargewicht und unterschiedlichen Eigenschaften (Srinivasan et al., 1991). Bei der „slow-migrating“ oder „floppy“-Form der MHC Klasse II Moleküle (ca. 60 kDa) handelt es sich wahrscheinlich um nicht stabile, intermediäre Peptid-MHC Klasse II Moleküle. Die „floppy“-Form der SDS-stabilen Komplexe ist nur im Western Blot (nicht nach Immunpräzipitation) mit den li-HEL_ws bzw. li-HEL_Δws Molekülen zu sehen, die das niedrig affine HEL-Epitop anstelle der GBS-Region besitzen.

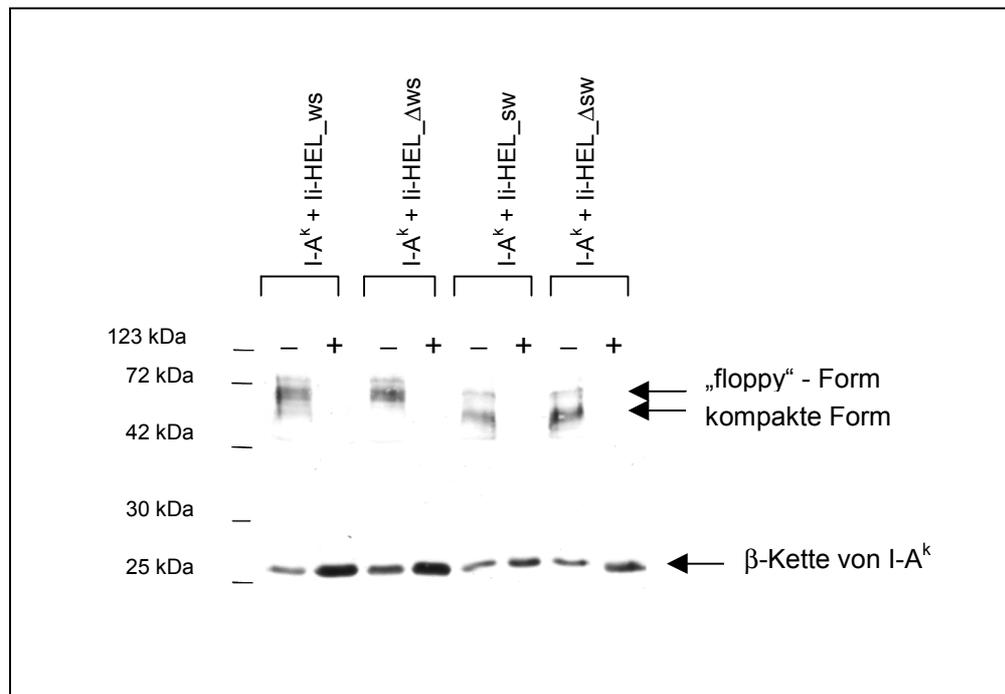


Abb. 3.5 SDS-stabile Dimere mit dem murinen MHC Klasse II Molekül I-A^k und den rekombinanten li-HEL Molekülen mit und ohne PBS-Region. Western Blot von I-A^k und li-HEL nach transienter Transfektion in COS7 Zellen. Die Zelllysate wurden in einem SDS-haltigen Probenpuffer bei RT (-) 60 min inkubiert oder bei 95°C 5 min erhitzt (+). Die MHC Klasse II Proteine wurden mit dem monoklonalen Antikörper 10.2.16, der spezifisch die β -Kette des I-A^k Moleküls erkennt, detektiert.

3.1.4 Nachweis Peptid-beladener MHC Klasse II Moleküle auf der Zelloberfläche

Die Stabilität von MHC Klasse II Molekülen auf der Zelloberfläche ist von der Bindung eines affinen antigenen Peptids in der Bindungsgrube der Klasse II Moleküle abhängig. Hoch affine Peptide bilden mit MHC Klasse II Molekülen stabile Komplexe, die einer geringen Internalisierung unterliegen und nicht wie unbeladene oder mit niedrig affinen Peptiden beladene MHC Klasse II Moleküle von der Zelle wieder verwertet werden.

Eine bereits mit α - und β -Kette von I-A^k stabil transfizierte Fibroblasten Zelle (L-Zellen) wurde zusätzlich mit den verschiedenen li-HEL Konstrukten stabil transfiziert und selektioniert. Die I-A^k Moleküle wurden mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper angefärbt und anschließend im FACS analysiert. Abb. 3.6 zeigt exemplarisch die Fibroblastenzellen, die mit li31 oder li-HEL_C_m transfiziert wurden. Wie in dieser Abbildung dargestellt, kann eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität bei den li-HEL_C_m transfizierten Zellen beobachtet werden. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zu der Oberflächenexpression der angefärbten Moleküle. Das bedeutet, dass die Expression von Peptid-beladenen MHC Klasse II Molekülen auf der Zelloberfläche der li-HEL_C_m transfizierten Fibroblasten

um ein Vielfaches höher ist, als bei Fibroblasten, die mit der murinen li31 transfiziert wurden. Eine Zunahme der Oberflächen-MHC Klasse II Moleküle konnte bei Fibroblasten, die mit dem schwach affinen Epitop-Konstrukt li-HEL_C_w (HEL34-45) transfiziert wurden, nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis vermehrter Oberflächenexpression von MHC Klasse II wurde nur bei Fibroblasten nachgewiesen, die mit den li-HEL Molekülen transfiziert wurden, die die hoch affinen Epitope s (HEL49-62) oder m (HEL52-61) besitzen. Die Ergebnisse der Oberflächenexpression gemessen im Durchflußzytometer stimmen mit den Ergebnissen der Präzipitationsversuche von SDS-stabilen Dimeren (siehe 3.1.3) überein, denn li-HEL Konstrukte mit den hoch affinen HEL-Epitopen bildeten SDS-stabile $\alpha\beta$ -Dimere aus und zeigten im Durchflußzytometer eine vermehrte MHC Klasse II Oberflächenexpression.

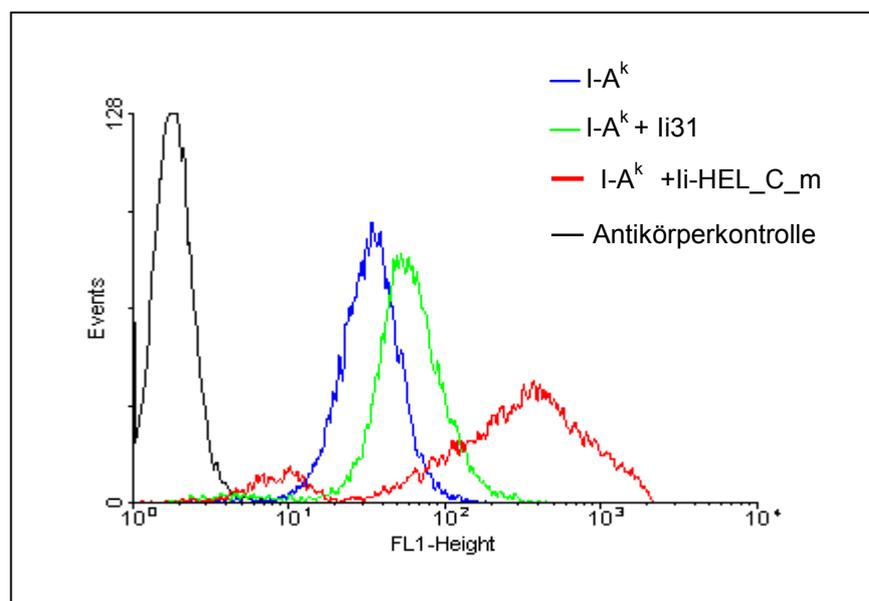


Abb. 3.6 Nachweis von I-A^k Molekülen auf der Oberfläche von stabil transfizierten Fibroblasten im FACS. Die Fibroblastenzelllinien, die stabil mit I-A^k oder I-A^k + li31 und I-A^k + li-HEL_C_m transfiziert wurden, wurden mit einem FITC-gekoppelten anti-I-A^k Antikörper angefärbt und im FACS analysiert (siehe Material und Methoden 2.2.6). 10000 gemessene Zellen werden in einem Histogramm nach ihrer Fluoreszenzintensität (x-Achse) dargestellt.

3.1.5 *In vitro* Antigenpräsentation der rekombinanten li-HEL Moleküle

Antigene werden dem Immunsystem als Peptide auf MHC Klasse II Molekülen präsentiert und können von spezifischen T-Helferzellen erkannt werden und diese aktivieren. Der erste Schritt einer Aktivierung von naiven T-Zellen ist die Erkennung von Peptid-MHC Klasse II Komplexen durch den T-Zellrezeptor. Die Aktivierung bewirkt eine Proliferation der T-Zellen und eine IL-2 Ausschüttung. In einem *in vitro* Test wurde überprüft, ob mit I-A^k und li-HEL transfizierte Zellen HEL-spezifische T-

Hybridomzellen aktivieren können. Die Aktivierung von T-Zellen kann anhand der IL-2 Sekretion gemessen werden. In diesem Experiment wurden entweder transient transfizierte COS7 Zellen oder stabil transfizierte Fibroblasten (L-Zellen) als Antigen-präsentierende Zellen eingesetzt. Die T-Zelllinie 3A9 erkennt das HEL-Peptid 46-61 und die Zelllinie 3B11 erkennt das HEL-Peptid 34-45 in der Bindungsgrube von I-A^k. Werden diese T-Zellen aktiviert, schütten sie IL-2 aus. Abbildung 3.7 zeigt das Diagramm eines Proliferationstests von CTLL-2 Zellen, die nur in Abhängigkeit von IL-2 proliferieren. L-Zellen, die nur mit I-A^k oder die mit I-A^k und li31 transfiziert wurden, können die beiden T-Zelllinien 3A9 und 3B11 nicht zur IL-2 Sekretion stimulieren. Die Zellen, die mit den li-HEL Konstrukten transfiziert wurden, die das hoch affine HEL-Epitop s (HEL49-62) in der GBS oder am C-Terminus besitzen, können die 3A9 T-Zellen, nicht aber die 3B11-Zellen aktivieren, während die Transfektanten mit dem schwach affinen HEL-Epitop w (HEL34-35) nur die 3B11 Zellen und nicht die 3A9 Zellen aktivieren können.

Das li-HEL_{mut} Protein kann keine 3A9 T-Zellen zur IL-2 Produktion stimulieren, da dieses Epitop zwar mit hoher Affinität an I-A^k bindet, aber die Mutation an Position 56 (Leucin zu Isoleucin) durch den T-Zellrezeptor der 3A9 Zellen nicht erkannt wird. Vergleichbare Ergebnisse wie mit den stabil transfizierten L-Zellen wurden mit transient transfizierten COS7 Zellen erzielt.

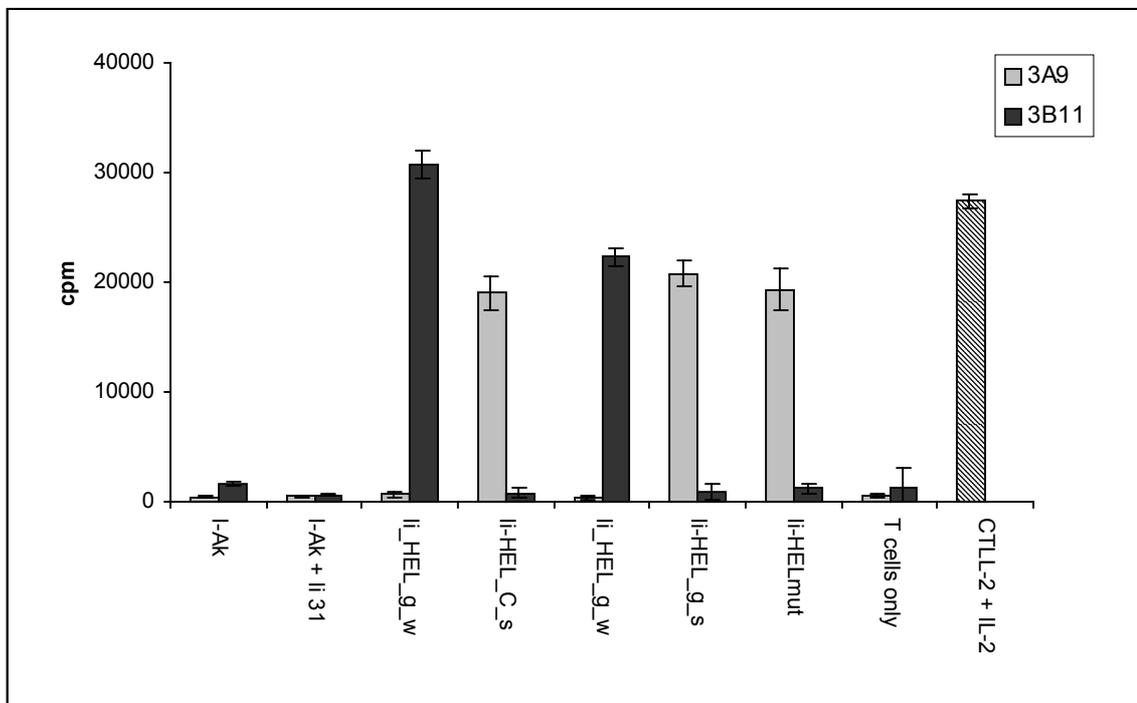


Abb. 3.7 CTLL-2 Proliferationstest misst die IL-2 Produktion nach Stimulation von spezifischen T-Zellen bei li-HEL transfizierte Zellen. L-Zellen wurden mit I-A^k und den verschiedenen li-HEL Molekülen transfiziert. 3A9-Zellen erkennen das hochaffine und 3B11-Zellen das schwach affine HEL-Epitop. Der Überstand wurde mit den IL-2 abhängigen CTLL-2 Zellen und ³H-Thymidin inkubiert. Die Proliferation der CTLL-2 Zellen wurde Messung der Radioaktivität im als cpm (counts pro Minutes) bestimmt. Als positiv Kontrolle wurde 2 ng/ml IL-2 (CTLL-2 + IL-2 = straffierter Balken) zugegeben.

3.1.6 Antigenpräsentation mit den rekombinanten Ii-HEL Molekülen, die zwei verschiedene HEL-Epitope besitzen

Die rekombinanten Ii-HEL Moleküle Ii-HEL_sw und Ii-HEL_ws besitzen, jeweils ein HEL-Epitop in der GBS der Invarianten Kette und am C-Terminus. In Abb. 3.8 ist die Proliferation von CTLL-2 Zellen dargestellt, die mit dem Überstand von I-A^k und Ii-HEL_sw bzw. I-A^k und Ii-HEL_ws transfizierten COS7 und den T-Zellhybridomen 3A9 und 3B11 kultiviert wurden. Die 3A9 Zellen spezifisch für HEL 46-61, sowie die 3B11 Zellen spezifisch für HEL 34-45, schütten nach Kokultivierung mit den transfizierten COS7-Zellen IL-2 aus. Wie in Abb. 3.8 dargestellt, ist eine IL-2 Sekretion beider T-Zelllinien nach Kokultivierung mit Ii-HEL_sw und Ii-HEL_ws Transfektanten zu beobachten. Eine Antigenpräsentation in COS7 Zellen ist unabhängig von der Position der HEL-Epitope in der Invarianten Kette. Es wurden HEL-Epitope präsentiert, wenn sie sich sowohl in der GBS-Region und als auch am C-Terminus der Invarianten Kette befanden, unabhängig von der Affinität der HEL-Epitope. COS7 Zellen sind keine professionellen Antigen-präsentierenden Zellen und besitzen keine MHC Klasse II Moleküle und keine Invariante Kette. Durch die starke Expression der transfizierten Klasse II Moleküle können auch „leere“ d.h. nicht Peptid-beladene MHC-Klasse II Moleküle entstehen. Die nicht-beladenen MHC Klasse II Moleküle können in anderen Kompartimenten mit HEL-Peptiden beladen werden, die z.B. durch Degradation der Ii-HEL Moleküle entstehen. Durch Transfektion geringer Mengen cDNA von α - und β -Kette wird I-A^k in COS7 Zellen in geringerem Maß exprimiert. Aber auch die niedrige MHC Klasse II Expression führt dazu, das „unbeladene“ I-A^k Moleküle entstehen und beide HEL-Epitope präsentiert werden. Es wird nicht nur das hoch affine Epitop (HEL49-62), das sich an Stelle der Grube-bindenden Region der Invarianten Kette befindet, von den MHC klasse II Moleküle präsentiert. Sondern es gelangt auch das schwach affine Epitop (HEL34-45) am C-Terminus der Invarianten Kette in die Bindungsgrube der MHC Klasse II Moleküle und wird an der Zelloberfläche präsentiert.

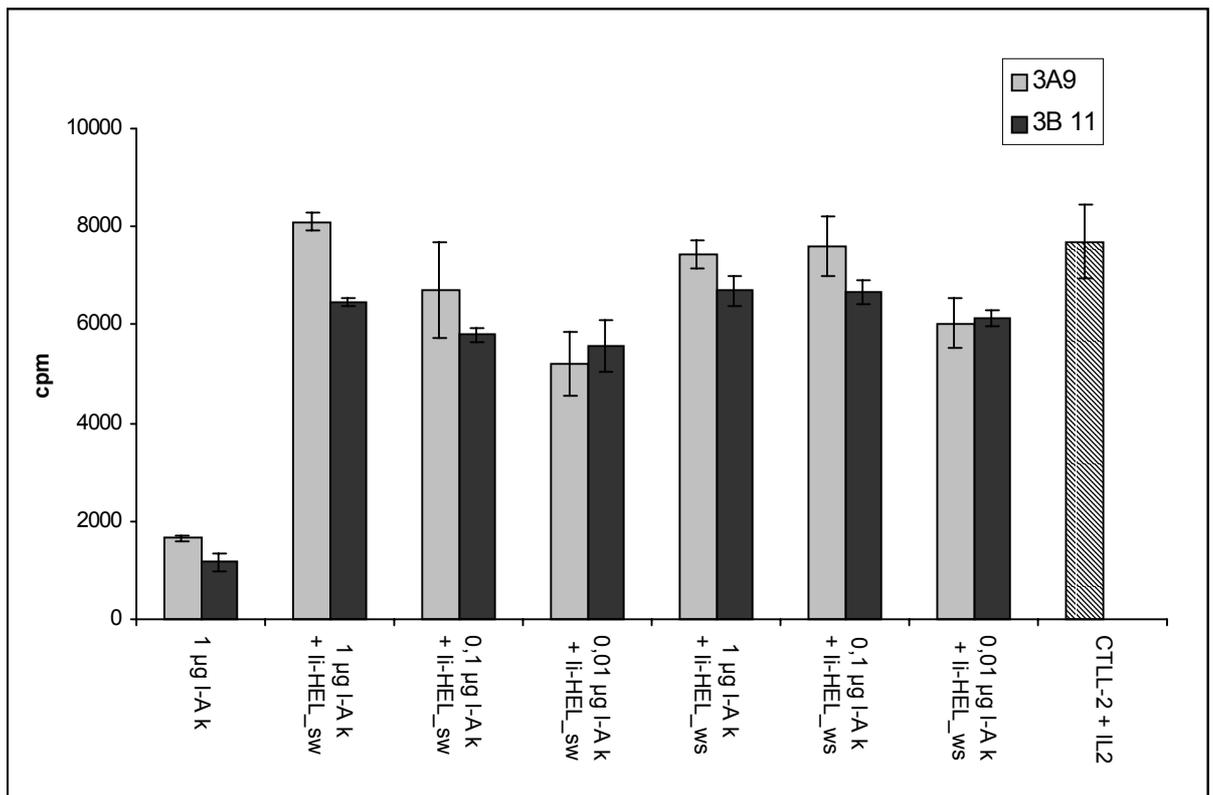


Abb.3.8 Antigenpräsentation von COS7 Zellen transfiziert mit I-A^k und li-HEL_sw bzw. li-HEL_ws. Für die Transfektion von I-A^k wurden verschiedene Menge von DNA eingesetzt: jeweils 1, 0,1 und 0,01 µg Plasmid-DNA von α- und β-Kette. Die DNA-Menge (1 µg) von li-HEL_sw bzw. li-HEL_ws war bei jeder Transfektion konstant. Der CTLL-2 Proliferationstest wurde durchgeführt wie in Material und Methoden beschrieben.

Die rekombinanten Moleküle li-HEL_Δsw und li-HEL_Δws besitzen keine PBS-Region. Die PBS Region der Invarianten Kette ist für die Bindung und die Stabilisierung des αβ-Heterodimers der Klasse II Moleküle verantwortlich. Fehlt die PBS Region ist allein die Bindung eines Peptids für die Stabilität des αβ-Dimers verantwortlich. Mit den li-HEL_Δws Konstrukten ohne PBS soll überprüft werden, ob eine Beladung im ER mit antigenen niedrig affinen Peptiden bereits dazu führt, dass diese Peptid-αβ-Komplexe stabil sind. Es soll überprüft werden, ob ein hoch affines Peptid das gebundene niedrig affine Peptid nicht aus dem αβ-Peptid-Komplex verdrängen kann. In Abb. 3.9 erkennt man, dass beide HEL-Epitope an MHC Klasse II Moleküle gebunden werden, an die Zelloberfläche gelangen und spezifische T-Zellen zur IL-2 Produktion veranlassen.

Bei beiden Molekülen - li-HEL_Δsw und li-HEL_Δws - findet man die Präsentation von dem niedrig affinen HEL-Epitop (HEL34-45) und dem hoch affinen HEL-Epitop (HEL 49-62), unabhängig davon ob sich die Epitope am C-Terminus oder in der GBS-Region befinden. Die Invariante Kette ist daher ein geeignetes Vehikel, um auch schwach bindende Epitope in den MHC Klasse II Prozessierungsweg einzuschleusen.

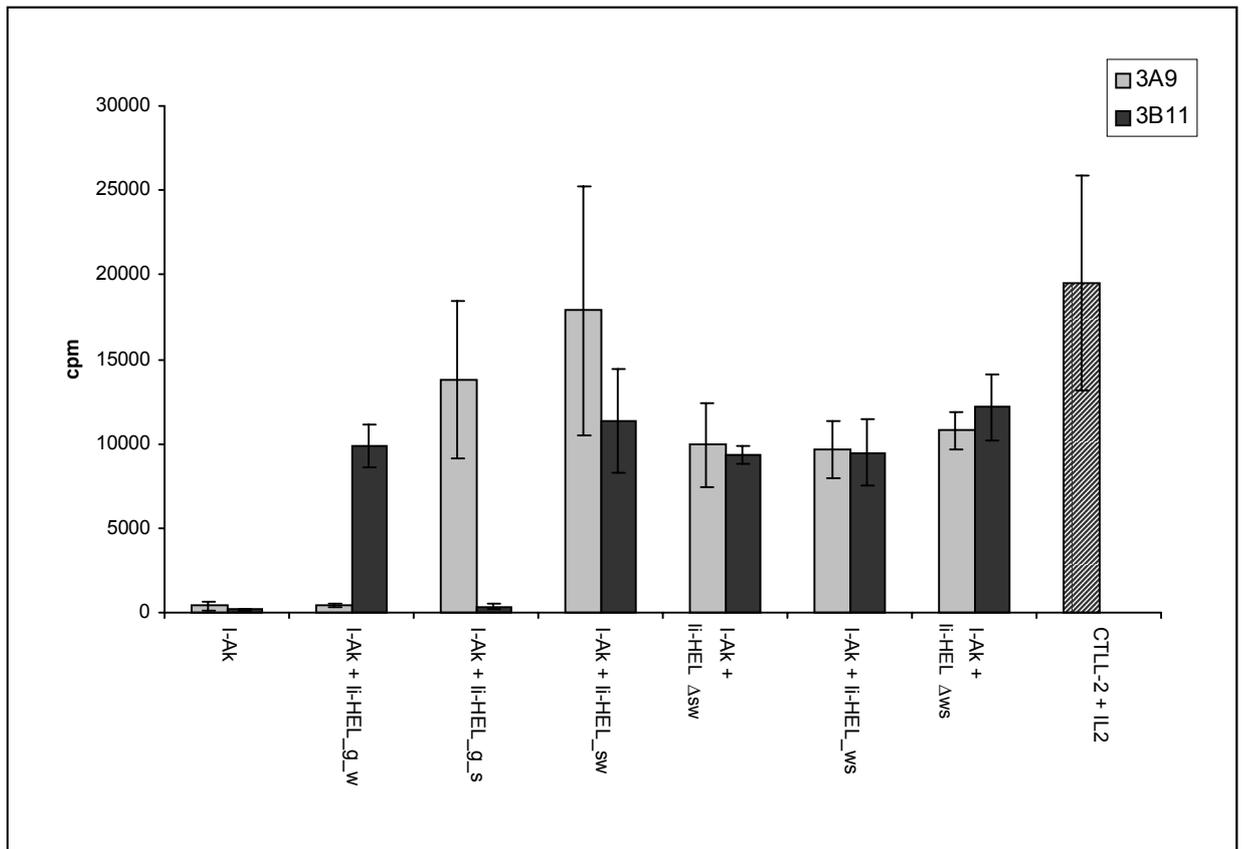


Abb.3.9 Antigenpräsentation von COS7 Zellen transfiziert mit I-A^k und li-HEL_{Δsw} bzw. li-HEL_{Δws}. CTLL-2 Proliferationstest wie in Material und Methoden beschrieben.

3.1.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Fusionsproteine li-HEL aus Invarianter Kette und antigenen Epitopen des Hühnereiweißlysozoms

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle rekombinanten Fusionsproteine bestehend aus der Invarianten Kette und einem oder zwei T-Zellepitopen des Hühnereiweißlysozoms antigen-spezifische T-Zellreaktionen *in vitro* auslösen. Die Präsentation der HEL-Epitope ist unabhängig von der Position der Sequenzen in der Invarianten Kette. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Invariante Kette geeignet ist, um antigene T-Zellepitope in den MHC Klasse II Präsentationsweg einzuschleusen.

3.2 Beschreibung und Charakterisierung der rekombinanten Fusionsproteine (HEL-Tri) aus der Trimerisierungsdomäne der Invarianten Kette und des Antigens Hühnereiweißlysozym

Wie bereits in Abschnitt 3.1 dargestellt, konnten antigene Epitope mittels Fusion mit der Invarianten Kette in den MHC Klasse II Präsentationsweg eingeschleust werden. Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Fusionsproteine aus der kompletten Sequenz des Hühnereiweißlysozyms und der Trimerisierungsdomäne der Invarianten Kette dargestellt, diese Moleküle wurden als HEL-Tri bezeichnet.

Es sollte untersucht werden, ob ein Antigen in Verbindung mit der Trimerisierungsdomäne in die endosomalen Beladungskompartimente gelangen und nach Degradation der Invarianten Kette als Peptide von MHC Klasse II Molekülen präsentiert werden kann. In Tierversuchen sollte gezeigt werden, ob sich diese Moleküle eigenen eine zelluläre und eine humorale Immunantwort auszulösen.

Das chimäre Molekül HEL-Tri31 besteht aus der kompletten Sequenz des Hühnereiweißlysozyms (HEL) und der Trimerisierungsdomäne der murinen Invarianten Kette Ii31 (aa 117-191).

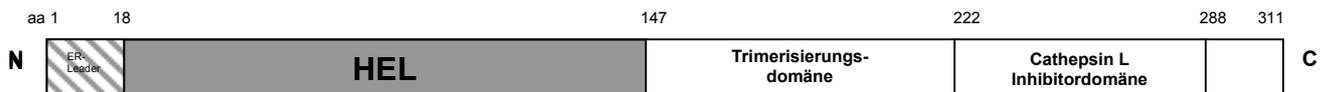
Ein weiteres rekombinantes Fusionsprotein wurde aus der kompletten HEL-Sequenz, der murinen Trimerisierungsdomäne (aa 117-191), der Cathepsin L Inhibitor-domäne (Exon 6b, aa 192-256) und den C-terminalen Sequenzen (Exons 7 und Exon 8) der Invarianten Kette hergestellt, dieses Molekül wurde als HEL-Tri41 bezeichnet.

Das Fusionsprotein HEL-Tri41 no Leader (noL), das identisch zu dem HEL-Tri41 Molekül ist, aber durch Deletion der ersten 17 Aminosäuren keine ER-Signalsequenz besitzt wurde als Kontrolle benutzt. Als weitere Kontrolle diente die komplette Sequenz des Hühnereiweißlysozyms bezeichnet als HEL cDNA und die HEL-Sequenz ohne die ER-Signalsequenz (HEL noL). Alle Konstrukte bestehend aus HEL-Sequenz und Trimerisierungsdomäne sind in Abb. 3.10. schematisch dargestellt.

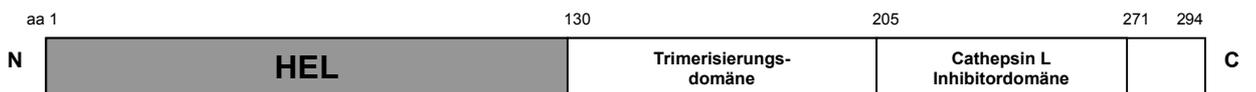
Murine invariante Kette li41



HEL-Tri41



HEL-Tri41 no Leader (=noL)



HEL-Tri31



HEL cDNA



HEL no Leader (noL)



Abb. 3.10 Schematische Darstellung der murinen li41 und der rekombinanten HEL-Tri Moleküle. Das HEL-Tri31 Molekül besteht aus der kompletten Sequenz des Hen egg lysozyme (HEL) und der Trimerisierungsdomäne (aa117-191) und das HEL-Tri41 Molekül besitzt noch die Cathepsin L-Inhibitor Domäne und die N-terminalen Aminosäuren der li41. Das HEL-Tri41 no Leader und das HEL no Leader Molekül besitzen keine ER-Signalsequenz (aa 1-17).

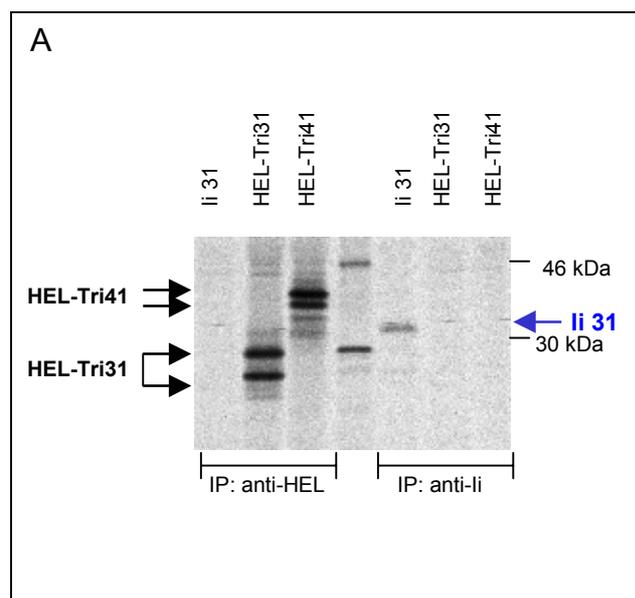
3.2.1 Expression der rekombinanten HEL-Tri Moleküle

Nach Klonierung der HEL-Tri Moleküle wurde durch transiente Transfektion von COS7 Zellen überprüft, ob die Fusionsproteine von eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Wie in Abb. 3.11(A) zu sehen ist, wurden die ^{35}S -radioaktiv markierten Proteine nach Immunpräzipitation mit einem polyklonalen anti-HEL-Serum in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Man erkennt eine Doppelbande von 30/28 kDa, die dem chimären HEL-Tri31 Protein und eine Doppelbande von ca. 39/40 kDa, die dem rekombinanten HEL-Tri41 Protein entspricht. Bei den Doppelbanden der HEL-Tri31 bzw. HEL-Tri41 Proteine handelt es sich um unterschiedliche Glykosilierungsformen der chimären Moleküle (siehe auch Abschnitt 3.2.3).

Mit dem monoklonalen anti-li-Antikörper In-1 konnten die chimären HEL-Tri Konstrukte nicht immunpräzipitiert werden, da dieser spezifisch den cytoplasmatischen Teil (aa1-29) der murinen Invarianten Kette erkennt.

In Abb. 3.11(B) erkennt man in der SDS-PAGE die Proteinbanden des HEL-Tri41 Proteins und des HEL-Tri41 no Leader Proteins nach Immunpräzipitation mit dem polyklonalen HEL-Serum. Wiederum erkennt man mehrere Banden des HEL-Tri41 Proteins, die wahrscheinlich unterschiedliche Glykosilierungsformen darstellen.

Das HEL-Tri41 no Leader Protein, das keine ER-Signalsequenz besitzt, wird im Cytoplasma exprimiert und folglich nicht im ER bzw. Trans-Golgi-Netzwerk glykosiliert, besitzt daher keine Mehrfachbanden, die auf unterschiedliche Glykosilierungsformen zurück zu führen sind und man erkennt daher nur eine Proteinbande von ca. 33 kDa. Das HEL-Protein und das HEL noL Protein sind 14 kDa große Proteine, die in Abbildung 3.11(B) ebenfalls nach transienter Expression von COS7 Zellen zu sehen sind.



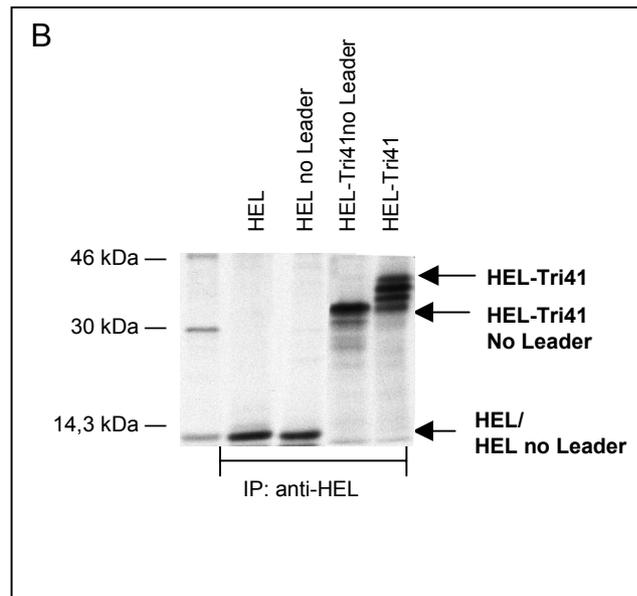


Abb. 3.11 Synthese der rekombinanten HEL-Tri Proteine mit und ohne ER-Signalsequenz in COS7 Zellen. 48 Std. nach der Transfektion mit Plasmid-DNA wurden die COS7 Zellen mit 30 μCi ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert und anschließend mit NP40 lysiert. Die Proteine aus den Zelllysaten wurden entweder mit dem monoklonalen anti-li-Antikörper In-1 oder einem polyklonalen anti-HEL Kaninchenserum präzipitiert und elektrophoretisch in einem 12% SDS-Gel auftrennt und fluorographisch detektiert. (A) zeigt die Expression der HEL-Tri31 und HEL-Tri41 Proteine, in (B) sind die Expressionsbanden der HEL-Tri41 und HEL Proteine mit und ohne ER-Signalsequenz (no Leader) dargestellt.

3.2.2 Assoziation der HEL-Tri Moleküle mit der murinen Invarianten Kette

Nachdem die Proteinexpression der rekombinanten HEL-Tri Proteine gezeigt wurde, sollte nun die Assoziation der chimären HEL-Tri Proteine mit der kompletten murinen Invarianten Kette (Ii31) durch Koexpression überprüft werden. Hierzu wurden COS7 Zellen mit DNA der murinen Ii31 und HEL-Tri31 oder HEL-Tri41 kotransfiziert und nach radioaktiver Markierung die Proteinkomplexe mittels Immunpräzipitation und anschließender SDS-PAGE fluorographisch detektiert.

In Abb. 3.12 erkennt man eine Assoziation von muriner Invarianter Kette Ii31 und dem HEL-Tri31 bzw. HEL-Tri41 Protein nach Immunpräzipitation mit dem anti-HEL Serum. Man erkennt bei der Kotransfektion von Ii31 und HEL-Tri eine Bande, die der murinen Ii31 entspricht und die Doppelbande, die dem HEL-Tri31 bzw. dem HEL-Tri41 Molekül entspricht. Eine Assoziation von Ii31 und HEL-Tri Molekülen konnte nicht gezeigt werden, wenn eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper (In-1), der gegen den N-terminalen Anteil von Ii gerichtet ist, durchgeführt wurde.

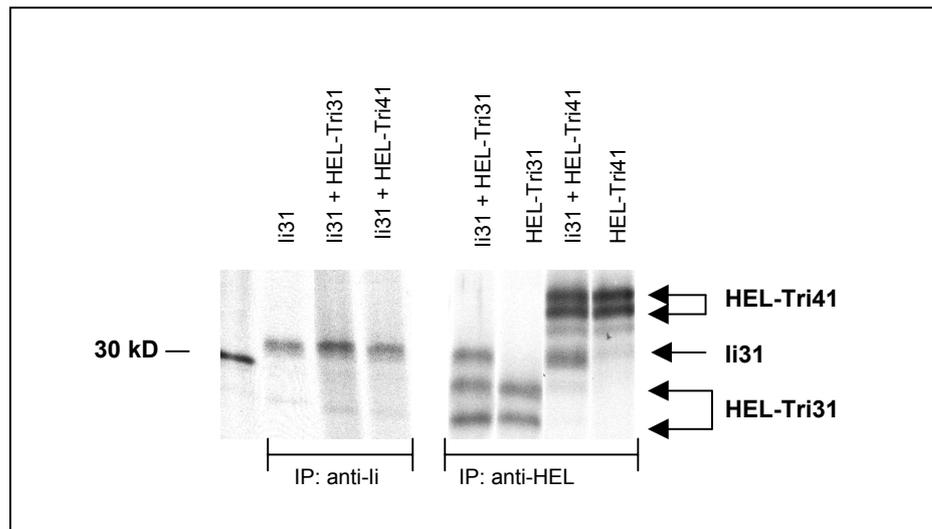


Abb. 3.12 Darstellung der Assoziation von muriner li und den rekombinanten HEL-Tri Proteinen. Nach Koexpression der murinen li31 und den HEL-Tri31 bzw. HEL-Tri41 Konstrukten in COS7 Zellen und anschließender radioaktiver ^{35}S -Markierung, wurden die Proteine mit einem monoklonalen anti-li Antikörper bzw. einem polyklonalen anti-HEL-Serum präzipitiert und aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes in einem 16 % Acrylamidgel aufgetrennt.

3.2.3 Transport der HEL-Tri Moleküle aus dem ER in den Golgi-Komplex

Die Glykosilierung von Proteinen erfolgt im ER und beim intrazellulären Transport durch den Golgi-Komplex werden diese Zuckerseitenketten modifiziert. Modifizierte N-gebundene Zuckerreste können durch Endoglykosidase H (Endo H) nicht mehr gespalten werden, man bezeichnet sie als Endo H resistent. Unmittelbar nach der Synthese im ER sind die Proteine sensitiv gegenüber Endoglykosidase H. Bei Proteinen, die das ER nicht verlassen, zeigt sich in der SDS-PAGE eine Größenabnahme von ca. 3 kDa pro N-gebundenem Zuckerrest nach Endo H-Verdau. Für diesen Versuch wurden COS7 Zellen transient mit der HEL-Tri41 oder HEL-Tri31 cDNA transfiziert und nach radioaktiver ^{35}S -Markierung mit Endoglykosidase H verdaut.

In Abbildung 3.13 sind die HEL-Tri31 und HEL-Tri41 Proteine nach Endo H Verdau dargestellt. Bei beiden HEL-Tri Molekülen (HEL-Tri31 und HEL-Tri41) erkennt man in der SDS-PAGE eine Doppelbande oder Mehrfachbanden, deren obere Banden nach Endo H Verdau nicht mehr zu sehen sind. Die obersten Banden mit dem höchsten Molekulargewicht repräsentieren die Endo H sensitive, nicht transportierte Form des HEL-Tri Moleküls, die sich im ER befindet. Bei der unteren Bande mit niedrigeren Molekulargewicht ist kein Größenunterschied nach Endo H Verdau zu erkennen ist. Dabei handelt es sich um die Endo H-resistente im Golgi-Komplex modifizierte Form

des HEL-Tri Moleküls. Es kann davon ausgegangen werden, dass die HEL-Tri Proteine nach Expression das ER verlassen und in das Trans-Golgi Netzwerk gelangen.

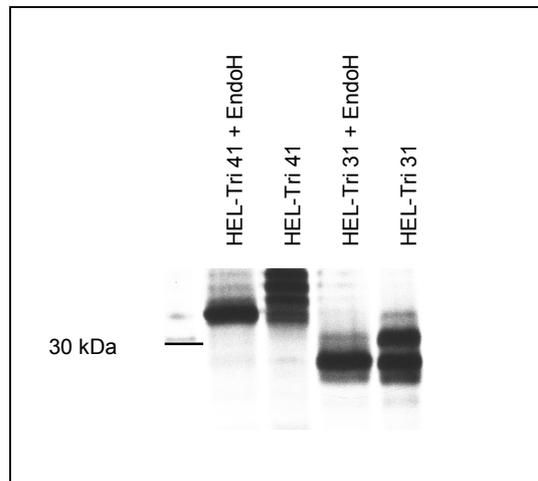


Abb. 3.13 Expression der rekombinanten HEL-Tri 31 und HEL-Tri 41 Proteine vor und nach Endo H-Verdau nach 30 minütiger radioaktiver ^{35}S -Markierung und Immunpräzipitation

3.2.4 Sekretion der rekombinanten HEL-Tri Proteine

In den vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass die HEL-Tri Moleküle im Golgi Apparat modifiziert werden. In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die Fusionsproteine sezerniert werden und als lösliches Antigen vorkommen. Lösliche Antigene können von B-Zellen aufgenommen werden und bei Immunisierungsversuchen eine Antikörperantwort auslösen.

Die HEL-Tri Konstrukte bestehen aus dem C-terminalen Anteil der Invarianten Kette und besitzen keine Transmembrandomäne wie die murine Invariante Kette Ii31, die in der Membran des ER verankert ist (Typ II Membranprotein). Die ersten 17 Aminosäuren der HEL-Sequenz kodieren für eine ER-Signalsequenz, die es den Proteinen ermöglicht nach ihrer Synthese ins ER zu gelangen.

COS7 Zellen wurden für diesen Versuch liposomal mit cDNA der Konstrukte HEL-Tri41, HEL-Tri41noL, HEL bzw. HEL noL, transient transfiziert und nach 48 Stunden radioaktiv markiert. Ein Teil der markierten Zellen wurde nach 10 Minuten lysiert. Die restlichen Zellen wurden eine weitere Stunde kultiviert und anschließend lysiert. Der Zellkulturüberstand wurde ebenfalls nach einer Stunde gesammelt und auf das Vorhandensein von sekretiertem HEL-Tri Protein untersucht. Alle Proteine aus den Zelllysaten und der Zellüberstand wurden präzipitiert und im SDS-Gel aufgetrennt.

Wie in Abb. 3.14 zu sehen ist, werden die HEL-Tri Moleküle nach Biosynthese ins ER sezerniert und können bereits eine Stunde nach biochemischer, radioaktiver Markierung im Überstand von COS7 Zellen nachgewiesen werden. In dieser Abbildung sind nur die sezernierten HEL-Tri41 und HEL cDNA Moleküle zu sehen, aber auch das HEL-Tri31 Molekül wird eine Stunde nach radioaktiver Markierung sezerniert (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den Proteinen mit ER-Signalsequenz konnten das HEL-Tri41 no Leader Protein bzw. das HEL no Leader Protein weder im Kulturüberstand noch 1 Stunde nach radioaktiver Markierung in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Diese cytoplasmatisch exprimierten Proteine (HEL no Leader bzw. HEL-Tri41 no Leader) wurden vermutlich durch cytosolische Proteasen nach kürzester Zeit wieder abgebaut und konnten deshalb nach einer Stunde nicht detektiert werden.

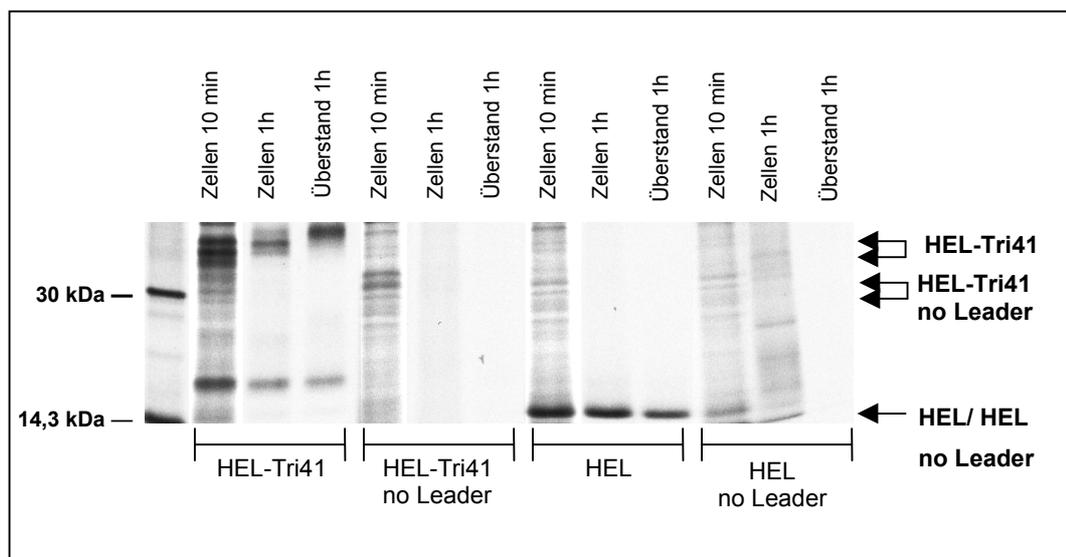


Abb. 3.14 Sekretion der rekombinanten HEL-Tri41 Proteine. Nach transienter Expression in COS7 Zellen wurden die Proteine 10 min radioaktiv markiert und direkt lysiert (10 min) oder eine weitere Stunde (1 h) in Kompletmedium kultiviert und anschließend lysiert. Nach einer Stunde wurden die Proteine aus dem Überstand der radioaktiv markierten Zellen sowie die Zelllysate mit Protein A-Sepharose und mit einem anti-HEL-Serum präzipitiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographisch detektiert.

3.2.5 *In vitro* Antigenpräsentation mit den rekombinanten HEL-Tri Molekülen

Durch Endo H-Verdau konnte gezeigt werden, dass die HEL-Tri Moleküle das ER verlassen. Ebenfalls konnte eine Assoziation der HEL-Tri31 bzw. HEL-Tri41 Moleküle mit der murinen Invarianten Kette (I α 31) bzw. mit MHC Klasse II Molekülen

nachgewiesen werden. Mittels eines Antigen-Präsentationstests soll nun überprüft werden, ob die HEL-Tri Moleküle über die Assoziation mit Ii31 und I-A^k in die MHC Klasse II Beladungskompartimente gelangen und sich antigene HEL-Peptide in MHC Klasse II Molekülen auf der Zelloberfläche befinden.

Transient transfizierte COS7 Zellen wurden in diesem Versuch mit HEL-spezifischen T-Zelllinien inkubiert. Die Präsentation des HEL 46-61 Peptids konnte mit der 3A9 T-Zelllinie exemplarisch bei dem rekombinanten HEL-Tri31 Molekül bei transient transfizierten COS7 Zellen nachgewiesen werden, wie im Balkendiagramm in Abb. 3.15 zu sehen ist. Auch eine Präsentation des schwach affinen HEL34-45 Epitops konnte bei COS7 Zellen, die mit I-A^k und HEL-Tri31 transfiziert wurden beobachtet werden. Die HEL-Tri Moleküle gelangen nach der Expression in den MHC Klasse II Prozessierungsweg und können spezifische T-Zellen aktivieren. Es zeigte sich aber auch, dass COS7 Zellen, die mit I-A^k und HEL cDNA transfiziert wurden, zur Antigenpräsentation von HEL-Epitopen fähig sind und 3A9 und 3B11 Z-Zellen aktivieren können.

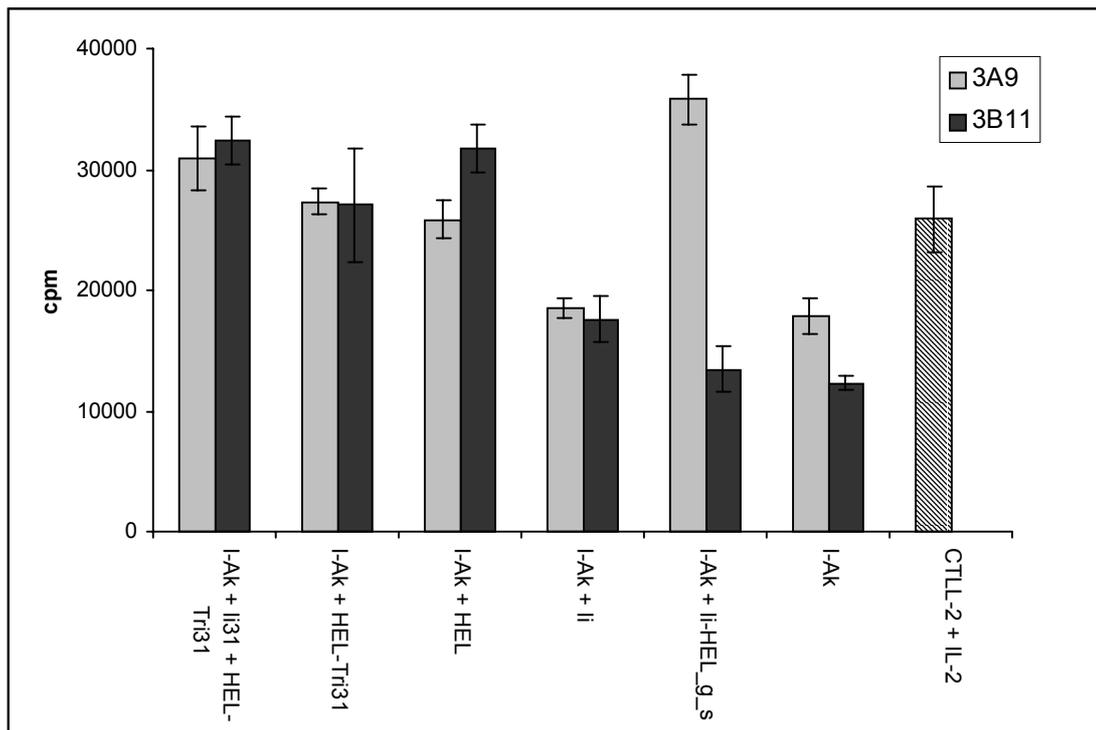


Abb. 3.15 CTLL-2 Proliferationstest HEL-Tri31 transfizierter Zellen. COS7 Zellen wurden mit I-A^k und HEL-Tri31 bzw. Ii31 cDNA transient transfiziert. 10^5 spezifische T-Zellen, die das hoch affine HEL-Epitop 46-61 erkennen (3A9) oder das schwach affine HEL-Epitop 34-45 (3B11) erkennen, wurden zugegeben und der Überstand nach 2 Tagen mit $5 \cdot 10^3$ Zellen der IL-2 abhängigen Zelllinie CTLL-2 inkubiert. Die CTLL-2 Zellen proliferieren nur in Abhängigkeit von IL-2 (CTLL-2 + IL-2=straffierter Balken), das als rekombinantes Protein in einer Konzentration von 2 ng/ml zugegeben wurde.

3.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Fusionsproteine HEL-Tri aus der Sequenz des Hühnereiweißlysozyms und der Trimerisierungsdomäne der Invarianten Kette

Wie in den vorangegangenen Abschnitten (3.2.1-3.2.5) dargestellt, werden die Fusionsproteine aus der kompletten Sequenz des Hühnereiweißlysozyms und der Trimerisierungsdomäne der Invarianten Kette (HEL-Tri31) bzw. und der Cathepsin L Inhibitor-domäne (HEL-Tri41) exprimiert anschließend transportiert und sezerniert. Alle HEL-Tri Moleküle gelangen in den MHC Klasse II Präsentationsweg und können *in vitro* Antigen-spezifische T-Zellen aktivieren.

3.3 Vakzinierung von C3H Mäusen mit li-HEL und HEL-Tri DNA

Eine Verbesserung der CD4+ Immunantwort nach DNA-Immunisierung könnte durch eine zielgerichtete Einschleusung von Antigenen in den MHC Klasse II Prozessierungsweg und durch eine Präsentation von antigenen Peptiden auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen erreicht werden. In den zuvor beschriebenen *in vitro* Versuchen konnte eine Antigenprozessierung und Präsentation der li-HEL Konstrukte und der HEL-Tri Konstrukte nachgewiesen werden.

Alle li-HEL Konstrukte mit dem hoch affinen HEL49-62-Epitop, ob nun anstelle der GBS oder am C-Terminus der li, unterschieden sich nicht in ihrer Fähigkeit MHC Klasse II Moleküle mit antigenen HEL-Peptiden zu beladen. Ein Unterschied im Bindungsverhalten konnte nur zwischen dem hoch affinen und dem schwach affinen HEL-Epitop festgestellt werden. Daher wurde für die DNA-Vakzinierung das rekombinante li-HEL_g_s Konstrukt mit dem hoch affinen HEL49-62 Peptid anstelle der GBS der Invarianten Kette ausgewählt.

In *in vitro* Versuchen wurde gezeigt, dass die HEL-Tri Moleküle ebenfalls in die MHC Klasse II Beladungskompartimente gelangen und präsentiert werden. In den folgenden Abschnitten soll die humorale und zelluläre Immunantwort bei li-HEL und HEL-Tri cDNA-immunisierten Mäusen untersucht werden.

3.3.1 *In vivo* Antigenpräsentation nach DNA-Vakzinierung

Eine Immunisierung bewirkt, dass sich T-Effektorzellen bilden, die verschiedene Immunreaktionen ausführen. Ziel folgender Versuche war es durch Plasmid-DNA Vakzinierung eine CD4⁺ spezifische T-Helferzellantwort in Mäusen zu induzieren.

T-Zellen, die nach Immunisierung auf ein spezielles Antigen reagieren, proliferieren in Gegenwart dieses Antigens. Proliferierende T-Zellen können durch den Einbau von radioaktiv markiertem ³H-Thymidin in sich replizierende DNA gemessen werden. Die Art der proliferierenden T-Effektorzellen kann durch diesen Antigenproliferationstest nicht bestimmt werden, es wird nur die klonale Expansion von Antigen-spezifischen T-Zellen gemessen.

6-8 Wochen alte C3H Mäuse wurden im Intervall von 10 Tagen vier bis fünfmal mit DNA-beschichteten Goldpartikeln immunisiert. Dabei wurden die DNA-Goldpartikel mittels der Gene Gun Apparatur unter Heliumdruck in die Haut des Abdomen injiziert. Kontrolltiere wurden gleichzeitig mit 10 µg lyophilisiertem HEL-Protein in einem CpG-haltigen Adjuvans vier bis fünfmal geimpft.

Den immunisierten Mäusen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Mehrfachimmunisierung die Milz und die Lymphknoten entnommen. Es wurden Proliferationstests nach 11, 12, 18, 19, und 20 Tagen nach der letzten Impfung durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Eine HEL-spezifische Proliferation konnte nur mit Milzzellen, die 4-10 Tage nach der letzten Vakzinierung entnommen wurden, nachgewiesen werden. Lymphknotenzellen, die 4 bis 10 Tage nach der letzten Impfung entnommen wurden, zeigten keine HEL-spezifische Proliferation. Zur Etablierung des Proliferationstests wurden verschiedene Inkubationszeiten der Milzzellen mit den Antigen erprobt. Es stellte sich heraus, dass erst nach 96 oder 120 Stunden Inkubation eine Proliferation detektiert werden konnte. Nach einmaliger DNA-Immunisierung konnte bei Milz- bzw. Lymphknotenzellen keine HEL-spezifische Proliferationsantwort nachgewiesen werden.

Nach fünfmaliger Vakzinierung konnte bei den li-HEL49-62, den HEL cDNA und den HEL-Protein vakzinierten Tieren eine HEL-spezifische T-Zellproliferation (siehe Abb. 3. 16) detektiert werden. Bei Mäusen, die mit Leervektor immunisiert wurden, konnte keine HEL-spezifische Proliferation detektiert werden.

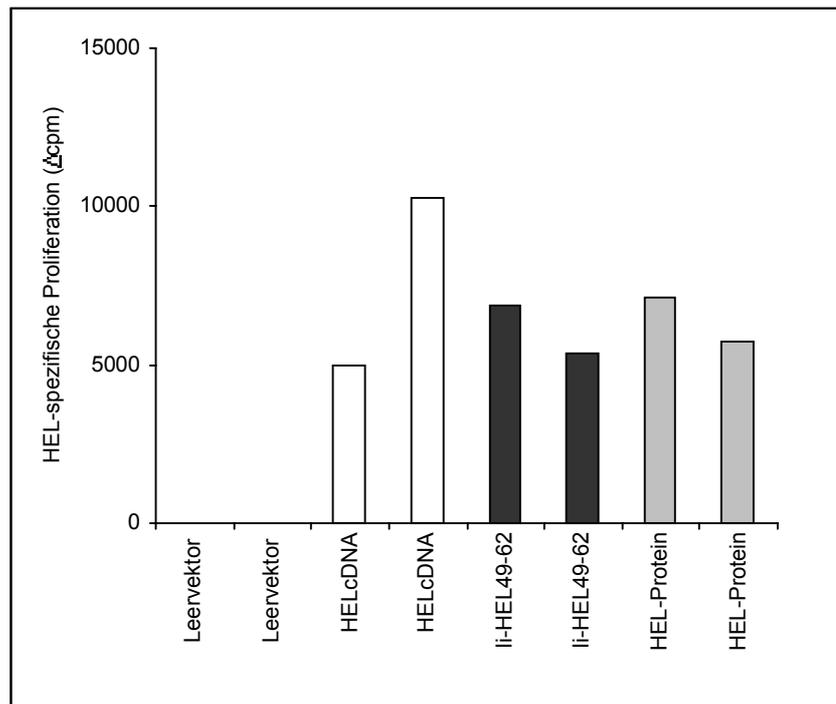


Abb. 3.16 Milzzellen von Tieren, die mit Leervektor, HEL cDNA, li-HEL49-62 und HEL-Protein vakziniert wurden, wurde mit 10 μ M HEL-Protein 96 h inkubiert. Nach Zugabe von 1 μ Ci 3 H-Thymidin wurde für weitere 16 h inkubiert. Die HEL-spezifische Proliferation wurde nach Einbau von radioaktivem 3 H-Thymidin in proliferierende Milzzellen mit und ohne Antigen gemessen und als Δ cpm (= cpm Milzzellen mit HEL-Antigen – cpm Milzzellen) dargestellt.

HEL-spezifische T-Zellen wurden auch nach mehrmaliger Vakzinierung von C3H Mäusen mit den Trimerisierungsvektoren (HEL-Tri31, HEL-Tri41) gebildet.

Vergleicht man die HEL-spezifische Proliferation bei Tieren, die fünfmal mit HEL cDNA, HEL-Tri31 oder HEL-Tri41 immunisiert wurden, erkennt man in Abb. 3.17 die höchsten Proliferationsraten bei den HEL-Tri41 vakzinierten Tieren. Bei jeweils einem Tier, das mit HEL-Tri31 bzw. HEL cDNA immunisiert wurde, konnte keine HEL-spezifische Proliferation nachgewiesen werden, obwohl bei diesen Tieren HEL-spezifische Antikörper im ELISA nachweisbar waren.

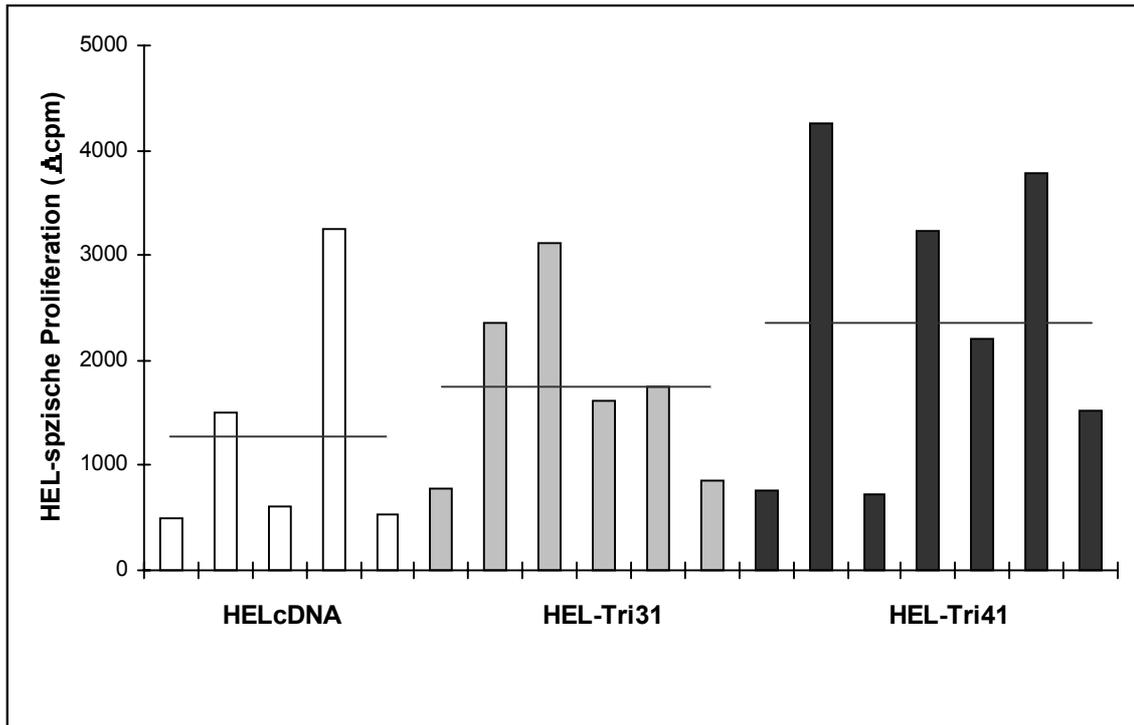


Abb. 3.17 Milzzellen von HEL cDNA, HEL-Tri31 und HEL-Tri41 vakzinieren Tieren wurden wie in den Methoden beschrieben mit HEL-Protein und 1 μCi ^3H -Thymidin inkubiert. Die HEL-spezifische Proliferation wurde als Δcpm (= cpm Milzzellen mit HEL-Antigen – cpm Milzzellen) dargestellt. Der Mittelwerte der Proliferationsrate der Tiere, die mit dem gleichen DNA immunisiert wurden, ist als Balken im Diagramm dargestellt.

3.3.2. Detektion einer humoralen Immunantwort nach DNA-Vakzinierung

Um zu zeigen, dass sich durch die DNA Vakzinierung mit den rekombinanten Vektoren eine humorale Immunantwort auslösen lässt, wurden 6-8 Wochen alte C3H Mäuse im Abstand von 10 Tagen ein- bis fünfmal immunisiert, wobei jeweils einmal 1-2 μg Plasmid-DNA durch ballistischen Transfer abdominal verabreicht wurden. 19-21 Tage nach einer einmaligen Vakzinierung wurde den Tieren Blut zur Bestimmung der Antikörperkonzentration entnommen. Bei Mehrfachimmunisierungen wurde den Tieren 4-10 Tagen nach der letzten Immunisierung Blut entnommen und im ELISA auf das Vorhandensein von spezifischen anti-HEL Antikörpern untersucht. Mittels eines anti-HEL Serums mit bekannter Konzentration konnte die Antikörperkonzentration im Serum der immunisierten Mäuse bestimmt werden.

1-10 μg lyophilisiertes HEL-Protein wurde in sterilem PBS gelöst und mit einem CpG-Oligonukleotid-haltigen Adjuvans (Immuneasy) versetzt und intradermal den Kontrolltieren im gleichen Zeitabstand injiziert.

In der Abbildung 3.19 sind die Serumantikörperkonzentrationen nach fünfmaliger Immunisierung dargestellt. Vergleicht man die HEL-spezifische Antikörperkonzentration von einmaliger (siehe Abb. 3.18) und mehrmaliger Vakzinierung, erzielt man nach mehrmaliger Immunisierung generell höhere Antikörpertiter. Auch bei der Mehrfachimmunisierung beobachtet man bei den Protein immunisierten Tieren die höchsten Antikörpertiter. Eine niedrige Antikörperkonzentration wird in Mäusen induziert, die mit dem li-HEL49-62 Konstrukt immunisiert wurden. Die HEL49-62 Sequenz enthält vermutlich ein B-Zellepitop, dass nur von wenigen Antikörpern der immunisierten Mäuse erkannt wird, während bei den Tieren, die mit der kompletten HEL cDNA immunisiert wurden, eine polyklonale Immunantwort gegen mehrere HEL-Epitope stattfindet.

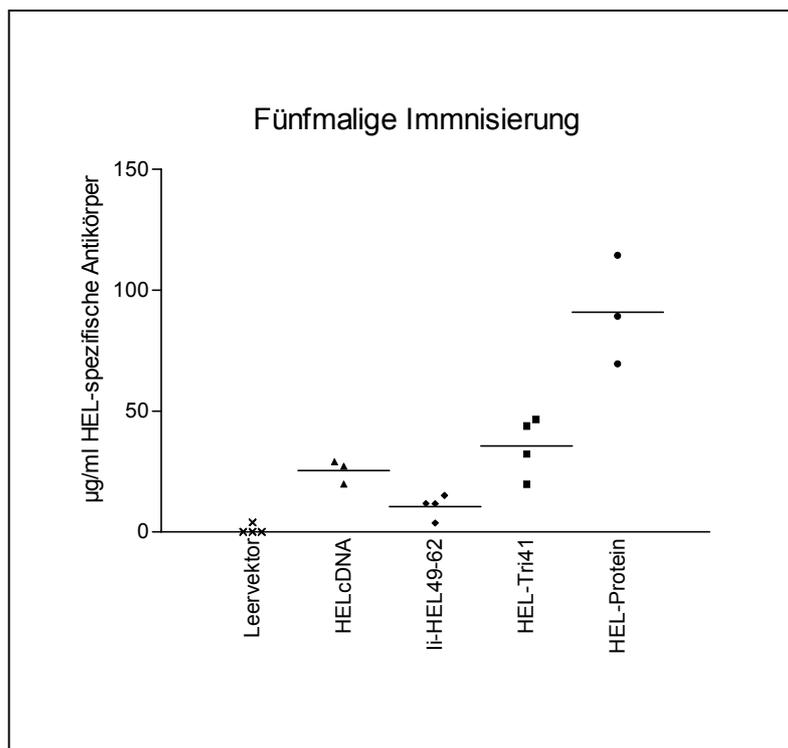


Abb. 3.19 Antikörperkonzentration in µg/ml von jeweils einem Tier gemessen im anti-HEL-ELISA (siehe Methoden) nach mehrmaliger DNA-Vakzinierung mit Leervektor, HEL cDNA, li-HEL49-62 HEL-Tri41 und Protein. Der Mittelwert der Antikörperkonzentration einer Gruppe ist in der Grafik als Linie dargestellt.

3.3.2.2 Antikörpernachweis nach DNA-Vakzinierung mit den rekombinanten HEL-Tri Vektoren mit und ohne ER-Signalsequenz

Sezernierte, lösliche Proteine, wie DNA-Vakzine mit ER-Signalsequenz, werden von B-Zellen gebunden und aufgenommen. Die B-Zellen produzieren dann Antigen-spezifische Antikörper. Wie bereits durch *in vitro* Versuche gezeigt, wurden die rekombinanten HEL und HEL-Tri Proteine nach transients Transfektion sezerniert. Um den Einfluß der Sezernierung von Proteinen bei der Plasmid-DNA Vakzinierung zu überprüfen, wurden je vier Tiere fünfmal mit HEL cDNA und HEL-Tri41 immunisiert. Beide Konstrukte besitzen die komplette Sequenz des HEL-Proteins mit der ER-Signalsequenz. Ebenfalls wurden vier Tiere fünfmal mit DNA-Konstrukten mit gleicher Proteinsequenz, aber ohne ER-Signalsequenz (HEL noL und HEL-Tri41 noL), geimpft. Vergleicht man die HEL cDNA geimpfte Gruppe mit der HEL no Leader Gruppe bzw. die HEL-Tri 41 geimpften Tiere mit den HEL-Tri41 no Leader geimpften Tieren, erkennt man in Abb. 3.20 bei den HEL cDNA und den HEL-Tri41 Tieren einen höheren Antikörpertiter. Eine höhere Antikörperkonzentration wurde somit bei den Tieren erreicht, die mit den Konstrukten mit ER-Signalsequenz vakziniert wurden.

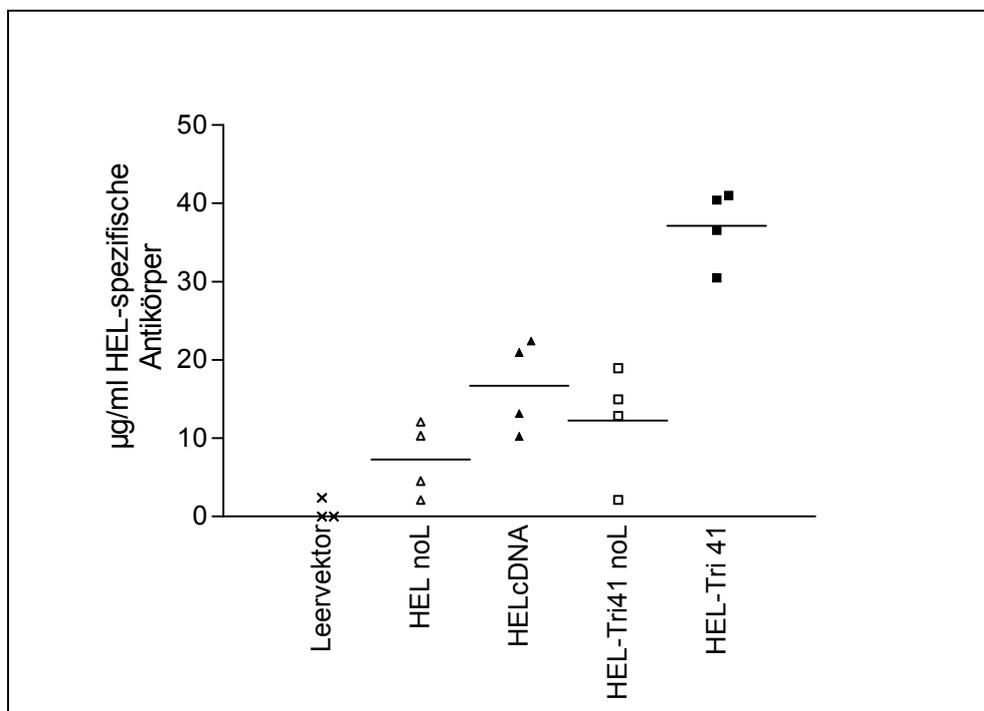


Abb. 3.20 HEL-spezifische Antikörper ($\mu\text{g/ml}$) im Serum von HEL cDNA, HEL noL HEL-Tri41 und HEL-Tri41 noL DNA-immunisierten C3H Mäusen. Die HEL noL und HEL-Tri41 noL Konstrukte besitzen keine ER-Signalsequenz. Der Mittelwert der Antikörperkonzentration einer Gruppe ist in der Grafik als Linie dargestellt.

3.3.2.3. Vergleich der humoralen Immunantwort nach Vakzinierung mit HEL und HEL-Tri DNA

Die Moleküle HEL-Tri31 und HEL-Tri41 unterscheiden sich durch die Cathepsin L-Inhibitor-domäne am C-Terminus. Um die Effizienz der DNA-Immunisierung mit rekombinanten Vektoren, die die Trimerisierungsdomäne bzw. die Trimerisierungsdomäne und die Cathepsin L Inhibitor-Domäne besitzen zu untersuchen, wurden daher im folgenden Versuch jeweils 9-10 Tiere mit HEL cDNA, HEL-Tri31 oder HEL-Tri41 Plasmid-DNA immunisiert. Im Diagramm (Abb. 3.21) sind die Serumantikörperkonzentrationen jeweils eines Tieres nach fünfmaliger Immunisierung dargestellt. Die horizontalen Balken repräsentieren die Mittelwerte der Antikörperkonzentrationen jeder Gruppe. Man erkennt, dass die Tiere, die mit HEL-Tri41 DNA immunisiert wurden, eine signifikant ($p=0,0023$) höhere Antikörperkonzentration besitzen als die Tiere, die nur mit dem HEL-Antigen alleine immunisiert wurden. Zwischen den Tieren, die mit HEL-Tri31 und HEL cDNA immunisiert wurden besteht kein signifikanter Unterschied ($p>0,05$; $p=0,4452$) in der Antikörperkonzentration nach DNA-Vakzinierung.

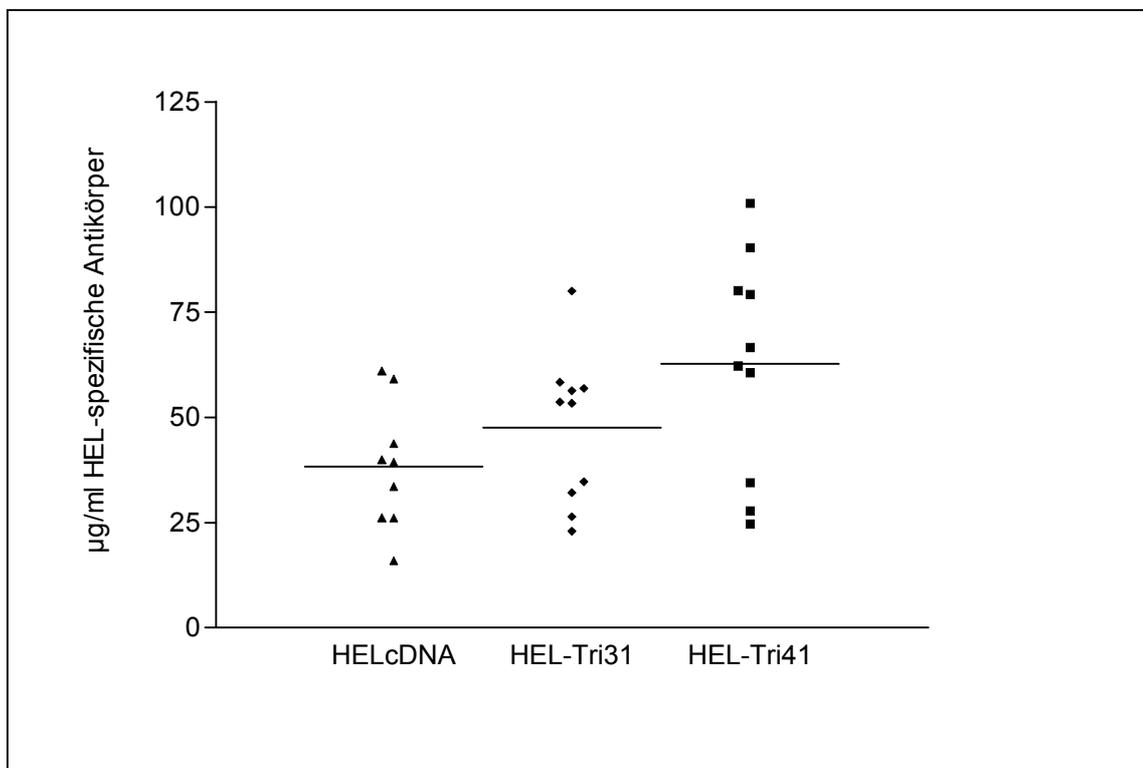


Abb. 3.21 Vergleich der HEL-spezifische Antikörper ($\mu\text{g/ml}$) im Serum von HEL cDNA, HEL-Tri31 und HEL-Tri 41 DNA immunisierten C3H Mäusen. Der Mittelwert der Antikörperkonzentration einer Gruppe ist in der Grafik als Linie dargestellt.

In weiteren Versuchen (Daten nicht gezeigt) wurden insgesamt 16 Tiere mit HEL cDNA, 9 Tiere mit HEL-Tri31 und 14 Tiere mit HEL-Tri41 fünfmal immunisiert. Auch bei diesen Versuchen erkennt man einen signifikant höheren Antikörpertiter ($p=0,0291$) bei den HEL-Tri41 immunisierten Tieren. Auch in diesem Versuch unterscheidet sich die Antikörperkonzentration der HEL-Tri31 immunisierten Tiere nicht signifikant ($p=0,9323$) von den HEL cDNA immunisierten Tieren.

4. Diskussion

4.1. Untersuchungen zur Bedeutung der Affinität und der Position der T-Zellepitope bei li-Fusionsmolekülen

CD4⁺ T-Zellepitope entstehen durch Degradation von Proteinen in Endosomen. Als Fusionsmolekül aus Invarianter Kette und T-Zellepitop können Antigene in den MHC Klasse II Prozessierungsweg eingeführt werden (Sanderson et al., 1995; Van Bergen et al., 1999; Sponaas et al., 1999; Carstens et al., 2000; Diebold et al., 2001). In dieser Arbeit wurde die Invariante Kette dazu benutzt, um bekannte T-Zellepitope des HEL-Proteins in den MHC Klasse II Prozessierungsweg einzuschleusen.

Das Hühnereiweißlysozym (HEL) diente in dieser Arbeit als Modellantigen zur Untersuchung der Beladung von MHC Klasse II Molekülen mit Peptiden. Die T-Zellepitope dieses Proteins sind sehr gut untersucht (Babbitt et al., 1985; Allen et al., 1987; Nelson et al., 1992; Nelson et al., 1996), und die Bindungseigenschaften dieser Epitope an das murine MHC Klasse II Molekül I-A^k wurden in zahlreichen Arbeiten beschrieben (Nelson et al., 1994, 1996; Dadaglio et al., 1997; Carrasco-Marin et al., 1999; Latek et al., 2000; Gugasyan et al., 1998, 2000).

Peptide binden mit Aminosäureseitenketten an Taschen aus konservierten Aminosäuren der MHC Klasse II Bindungsgrube. Für die Bindung an MHC Klasse II Moleküle sind Aminosäurereste des antigenen Peptids entscheidend, die als primäre Ankerpositionen bezeichnet werden. Die Aminosäuren Asparaginsäure (D) an Ankerposition P1 und Serin (S) an Ankerposition P9 binden an Aminosäuretaschen der Bindungsgrube von I-A^k. Das HEL-Epitop 49-62 mit der Aminosäuresequenz **G S T D Y G I L Q I N S R Y** besitzt diese beiden Ankerpositionen und verfügt außerdem noch über einen sogenannten Hilfsanker an Position P4 (Nelson et al., 1996; Latek et al., 2000). Die flankierenden Bereiche am N-Terminus eines Peptids, die außerhalb der Bindungsgrube mit Klasse II Molekülen interagieren, beeinflussen die Stabilität der beladenen MHC Klasse II Moleküle (Stumptner und Benaroch, 1997). Das HEL-Epitop 49-62 besitzt noch drei zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus und bindet mit hoher Affinität an das murine MHC Klasse II Molekül I-A^k.

Für die eigentliche Bindung der Peptide in der Bindungsgrube der MHC Klasse II Moleküle sind 8-10 Aminosäuren notwendig. Die verkürzte Sequenz des HEL-Epitopes 52-61 (Aminosäuresequenz **D Y G I L Q I N S R**) besitzt drei Ankerpositionen und bindet ebenfalls mit hoher Affinität an I-A^k (Nelson et al., 1996; Pu et al., 2002). Ein Unterschied zwischen dem verkürzten HEL-Epitop 52-61 und dem immundominanten HEL-Epitop 46-62 besteht in der Bindungsaffinität, die bei dem verkürzten HEL-Epitop neunfach niedriger ist. Die Halbwertszeit der Peptid- $\alpha\beta$ -Komplexe auf der Zelloberfläche

ist für das HEL-Epitop 52-61 gegenüber dem HEL-Epitop 48-62 vermindert (Nelson et al., 1994; Nelson et al., 1996). Für die T-Zellerkennung sind die Aminosäuren zuständig, die aus der Bindungsgrube herausragen. Die Aminosäure Leucin (L) in Position 56 des HEL-Epitops 52-61 wird vom T-Zellrezeptor erkannt. Es wurde ein mutiertes li-HEL Protein konstruiert mit einem Austausch von Leucin gegen Isoleucin (li-HELMut), das die gleiche Affinität zu I-A^k wie das HEL-Epitop 52-61 besitzt (Dadaglio et al., 1997). Das HEL-Epitop 34-45 (F E S N F T Q A T N R) mit nur einer Ankeraminosäure (N = Asparagin) bindet mit niedrigerer Affinität in der Bindungsgrube von I-A^k (Gugasyan et al., 1998).

Die Affinität eines antigenen Peptids ist bei der Bindung an MHC Klasse II Moleküle entscheidend. MHC Klasse II Moleküle werden durch die Bindung eines hoch affinen Peptids stabilisiert (Germain und Hendrix 1991; Sadegh-Nasseri et al., 1994). In dieser Arbeit wurde die Stabilität von MHC Klasse II Komplexen *in vitro* untersucht. Die Fusionsmoleküle, die entweder das hoch affine T-Zellepitop HEL 49-62 oder verkürzte HEL-Epitop 52-61 besitzen, bilden mit MHC Klasse II Molekülen SDS-stabile Komplexe aus Peptid, α - und β -Kette. Wie von E. Unanue und Mitarbeitern beschrieben, stabilisieren die HEL-Peptide 48-62 und 52-61 die neusynthetisierten MHC Klasse II Moleküle und bewirken, dass diese Peptid-beladenen MHC Klasse II Moleküle eine längere Halbwertszeit auf der Zelloberfläche besitzen (Nelson et al., 1993; Nelson et al., 1994). Auch in eigenen Experimenten wurde im Durchflusszytometer eine vermehrte Oberflächenexpression von MHC Klasse II Molekülen auf Zellen gefunden, die mit den li-Fusionsmolekülen, die entweder das HEL-Epitop 49-62 oder das HEL-Epitop 52-61 enthielten, transfiziert wurden.

Wie in weiteren Versuchen festgestellt wurde, beeinflusst der Austausch der Aminosäure Leucin gegen Isoleucin an Position 56 des li-HELMut Moleküls nicht die SDS-Stabilität von MHC Klasse II Molekülen. Diese Ergebnisse sind konform mit Literaturangaben (Dadaglio et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich T-Zellepitope mit niedriger Affinität zu MHC Klasse II Molekülen in den Antigenpräsentationsweg einschleusen lassen. Dazu wurden rekombinante Fusionsmoleküle aus der Sequenz der Invarianten Kette und dem niedrig affinen HEL-Epitop 34-45 hergestellt. Die Moleküle enthielten entweder anstelle der Grube-bindenden Region (li-HEL_{g_w}) oder am C-Terminus (li-HEL_{C_w}) der Invarianten Kette das niedrig affine Epitop. Dieses Epitop bildete mit dem MHC Klasse II Molekül I-A^k keine SDS-stabilen Dimere von 50 kDa aus. Ebenfalls konnte keine vermehrte MHC Klasse II Oberflächenexpression im Durchflußzytometer von li-HEL_{g_w} oder li-HEL_{C_w} transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit Literaturangaben überein (Gugasyan et al., 1998, 2000).

Allerdings konnte beobachtet werden, dass das niedrig affine T-Zellepitop HEL 34-45 in Antigenpräsentationsversuchen HEL 34-45-spezifische T-Zellen zur IL-2 Sekretion anregen konnte. Das niedrig affine T-Zellepitop gelangt an die Zelloberfläche, obwohl in biochemischen Versuchen keine SDS-stabilen Dimere gefunden wurden. Es wird postuliert, dass biochemische Untersuchungen zur Immundominanz und Bindungsaffinität von T-Zellepitopen nicht mit der Anzahl der aktivierten T-Zellen übereinstimmen (Velazquez et al., 2001). Auch Carstens fand, dass niedrig affine T-Zellepitope, wenn sie als li-Fusionsmoleküle angeboten wurden, T-Zellen zur IL-2 Ausschüttung, nicht aber zur Proliferation bringen konnten (Carstens et al., 2000).

In weiteren Versuchen wurden li-HEL Fusionsmoleküle benutzt, die an verschiedenen Stellen in der Sequenz der Invarianten Kette jeweils ein HEL-Epitop besaßen. Damit sollte die Bedeutung der Position der T-Zellepitope in der Sequenz der Invarianten Kette untersucht werden. Bei den rekombinanten li-HEL Molekülen (li-HEL_sw, li-HEL_wm, li-HEL_ws) mit zwei verschiedenen affinen HEL-Epitopen bildeten sich SDS-stabile Dimere von 50 kDa aus, wenn das hoch affine HEL-Epitop 49-62 oder 52-61 in dem Molekül vorkam. Es bildeten sich mit allen drei li-Fusionsmolekülen stabile MHC Klasse II Komplexe unabhängig von der Position der Epitope in der Sequenz der Invarianten Kette.

Ob sich die Epitope in der MHC Klasse II Bindungsdomäne (groove binding site = GBS) oder am C-Terminus der Invarianten Kette befanden, beeinflusste die Bindungseigenschaften der T-Zellepitope an MHC Klasse II Moleküle nicht. In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, daß die Ausbildung von SDS-stabilen MHC Klasse II Komplexen von der Affinität des antigenen Peptids abhängt und nicht von der Position der Epitope in der Sequenz der Invarianten Kette.

4.2 Untersuchungen zur Beladung der MHC Klasse II Moleküle mit zwei unterschiedlichen T-Zellepitopen

Die Hierarchie und die Effizienz der Peptidbeladung der MHC Klasse II Moleküle wird vor allem durch die Affinität der verschiedenen T-Zellepitope bzw. Peptide bestimmt. In dieser Arbeit sollte die Bedeutung der Affinität verschiedener T-Zellepitope untersucht werden, die in einem Molekül exprimiert werden und daher in gleicher Menge vorkommen.

Dazu wurden Fusionsproteine aus Invarianter Kette und zwei HEL-Epitopen hergestellt, die eine unterschiedliche Affinität zu dem murinen MHC Klasse II Molekül I-A^k besitzen. Es wurde das immundominante HEL-Epitop 48-62 benutzt, von dem

bekannt war, dass es auf 20 % der MHC Klasse II Moleküle auf der Oberflächen von Antigen-präsentierenden Zellen vorkommt, die mit HEL-Protein inkubiert wurden. Wobei das niedrig affine HEL-Epitop 31-47 nur bei 0,3 % der MHC Moleküle vorkam (Gugasyan et al., 2000). In Versuchen mit verschiedenen T-Hybridomzellen, die jeweils spezifisch für ein HEL-Epitop sind, konnte die Präsentation dieser Epitope *in vitro* untersucht werden. Es wurde erwartet, dass das immundominante Epitop aufgrund seiner höheren Affinität zu I-A^k das niedrig affine Epitop aus der Bindungsgrube verdrängt, mehr MHC Klasse II Moleküle besetzt und eine vermehrte IL-2 Ausschüttung bewirkt. Nach Transfektion mit li-HEL Konstrukten, die beide Epitope enthielten, wurde festgestellt, dass beide Epitope gleichzeitig präsentiert werden. Die Präsentation des niedrig affinen Epitops resultierte in ähnlich hohen IL-2 Ausschüttung der aktivierten T-Zellen wie das hoch affine Epitop. In dieser Arbeit konnte kein Unterschied bei der Antigenpräsentation zwischen dem hoch affinen oder dem niedrig affinen Peptid festgestellt werden. Adorini et al. konnten nach endogener Expression des HEL-Proteins feststellen, dass ebenfalls alle bekannten T-Zellepitope des HEL-Proteins, inklusive des hoch affinen Epitops und des schwach affinen Epitops, präsentiert wurden (Adorini et al., 1993). Bei diesen *in vitro* Versuchen wurden die gleichen T-Zellhybridome verwendet, die auch in dieser Arbeit benutzt wurden. Von dem verwendeten T-Zellhybridom 3A9 ist bekannt, dass bereits wenige (ca. 200) HEL48-62 beladene MHC Klasse II Moleküle ausreichen, um diese Zellen zur IL-2 Ausschüttung zu veranlassen (Harding und Unanue, 1990). Auch die T-Hybridomzellen, die das niedrig affine Epitop erkennen, benötigen keine kostimulatorischen Signale, um IL-2 zu produzieren, und sind sehr sensitiv. Das wurde bei der Transfektion von sehr geringen DNA-Mengen (I-A^k) beobachtet und könnte eine Begründung sein, warum kein Unterschied bei der *in vitro* Antigenpräsentation zwischen dem hoch affinen und dem niedrig affinen Molekül festgestellt wurde.

Bei den Versuchen zur Kompetition von Peptiden spielte es ebenfalls keine Rolle, an welcher Position in der Sequenz der Invarianten Kette sich das T-Zellepitop befand. Van Bergen et al. postulierte, dass die Kompetition eines hoch affinen bereits gebundenen Epitops bei Verwendung der li-Epitop Vektoren unwahrscheinlich ist, da eine homogene Beladung mit den T-Helferzellepitopen bei MHC Klasse II DR Molekülen beobachtet wurde (Van Bergen et al., 1997). Aufgrund der Affinität der Epitope wurde erwartet, dass sich keine oder eine stark verminderte Präsentation des schwachen Epitops nachweisen lässt, wenn sich das immundominante HEL-Epitop 49-62 in der Grube bindenden Region der Invarianten Kette (li-HEL_{sw}) befindet. Es wurde davon ausgegangen, dass alle neusynthetisierten MHC Klasse II Moleküle bereits mit dem hoch affinen HEL-Epitop beladen waren, wenn COS7 Zellen mit den

rekombinanten li-HEL_{sw} und I-A^k Molekülen transfiziert wurden. In den durchgeführten Versuchen wurde aber wiederum eine Präsentation beider Epitope beobachtet.

Dafür könnte es unterschiedliche Erklärungen geben: Zum einem die bereits aufgeführte Empfindlichkeit der verwendeten T-Hybridomzelllinien. Andererseits wurde von Zhong und Mitarbeitern beschrieben, dass diese zwei HEL-Epitope (49-62; 34-45) in unterschiedlichen Kompartimenten auf MHC Klasse II Moleküle geladen werden. Das Peptid HEL 48-62 soll an neusynthetisierte MHC Klasse II Moleküle in Lysosomen binden und das HEL-Epitop 34-45 an reife, „recycled“ MHC Klasse II Moleküle in Endosomen (Zhong et al., 1997).

Um zu untersuchen, ob die promiskuitive Bindungsstelle (PBS) in der Sequenz der Invarianten Kette die Konkurrenz zwischen hoch und niedrig affinen Peptiden beeinflusst, wurden Deletionsmutanten hergestellt. Bei den rekombinanten li-HEL Molekülen li-HEL_{Δsw} und li-HEL_{Δws} wurde die PBS-Region deletiert, die zur Stabilität des MHC Komplexes beiträgt. Fehlt diese Region, ist die Stabilität der MHC Klasse II Moleküle allein von der Bindungsstärke des Peptids abhängig.

Befindet sich das antigene Epitop in der MHC Klasse II Bindungsdomäne der Invarianten Kette, findet eine Beladung der Klasse II Moleküle bereits im ER statt. Normalerweise wird in dem endosomalen MHC Kompartiment das CLIP-Fragment der Invarianten Kette gegen ein antigenes Peptid ausgetauscht. Bei den rekombinanten Fusionsproteinen li-HEL_{Δsw} bzw. li-HEL_{Δws} sollte dieser Austausch jedoch nicht stattfinden, es sollte entweder nur das eine oder andere Epitop präsentiert werden. Auch hier wurde wider Erwarten eine starke Präsentation beider HEL-Epitope nachgewiesen, auch wenn sich das hoch affine HEL-Epitop in der Grube-bindenden Domäne der Invarianten Kette befand. Auch hier könnte die Beladung in unterschiedlichen Kompartimenten eine Rolle spielen. Es entstehen offensichtlich immer noch genügend unbeladene oder „recycled“ MHC Klasse II Moleküle, die mit Peptiden beladen werden, die sich in den Endosomen befinden. In dem endosomalen/lysosomalen Kompartiment wird auch die Invarianten Kette degradiert und das Epitop, das sich am C-Terminus der Invarianten Kette befindet, wird eventuell freigesetzt und kann an unbeladene oder „recycled“ MHC Klasse II Moleküle binden.

Die Antigenpräsentation scheint nicht nur, wie auch in dieser Arbeit festgestellt wurde, von der Bindungsstärke der entstandenen Peptide abhängig zu sein.

Auch Velazquez et al. konnte keine Korrelation zwischen Bindungsstärke und T-Zellaktivierung bei den beiden HEL-Epitopen 31-47 und 46- 61 feststellten. Durch die Arbeit von Gugasyan (Gugasyan et al., 2000) wurde bestätigt, dass bei Abwesenheit des hoch affinen Epitops 48-62 keine vermehrte Präsentation des niedrig affinen Epitops beobachtet werden konnte. Bei Untersuchungen anderer Proteine stellte Lo-

Man ebenfalls fest, dass die Konkurrenz zwischen Peptiden verschiedener Affinität bei der MHC Klasse II Beladung nicht entscheidend für die Dominanz eines bestimmten Epitops ist (Lo-Man et al., 1998).

Im Gegensatz zu Van Bergen (Van Bergen et al., 1997) konnte jedoch in vorliegender Doktorarbeit gezeigt werden, dass sich auch niedrig affine T-Zellepitope von rekombinanten Ii-Epitop Vektoren in den MHC Klasse II Präsentationsweg einschleusen lassen, auch wenn sie in Konkurrenz zu einem hoch affinen T-Zellepitop stehen. Bei der Verwendung von Ii-Fusionsmolekülen können auch niedrig affine Epitope präsentiert werden, auch wenn sie im Wettbewerb zu einem hoch affinen Epitop stehen. So könnte z.B. bei der Immunisierung mit rekombinanten Fusionsmolekülen, die ein niedrig affines Epitop eines Onkogens enthalten, dieser Aspekt entscheidend sein.

4.3 Fusionsproteine bestehend aus einer antigenen Sequenz und der Trimerisierungsdomäne assoziieren mit der Invarianten Kette und gelangen in den MHC Klasse II Präsentationsweg

In dieser Arbeit sollten Fusionsproteine hergestellt werden, die aus der Trimerisierungsdomäne der Invarianten Kette und einer antigenen Sequenz bestehen. Hier wurde wiederum als Antigen die komplette Sequenz des Hühnereiweißlysozyms gewählt.

Es konnte in Kopräzipitationsversuchen von transient transfizierten Zellen eine Interaktion aller Fusionsproteine, die die Trimerisierungsdomäne besitzen, mit der kompletten Sequenz der Invarianten Kette Ii31 (Wildtyp) gezeigt werden. Die Interaktion zwischen den chimären Molekülen und der Wildtyp Invarianten Kette findet über die Assoziation der Trimerisierungsdomänen der Moleküle statt.

In der Maus existieren zwei Isoformen der Invarianten Kette, die 31 kDa und die 41 kDa schwere Isoform, die beide nonamere Komplexe mit MHC Klasse II Molekülen bilden (Ashman und Miller et al., 1999). Auch die unterschiedlichen Isoformen der Invarianten Kette trimerisieren miteinander und bilden ebenfalls mit Klasse II Molekülen den nonameren Komplex (Arunachalam et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit assoziierte das HEL-Tri41 Molekül, das neben der Trimerisierungsdomäne auch die Cathepsin L Inhibitor-domäne besitzt, ebenfalls mit der Wildtyp Invarianten Kette Ii31.

In *in vitro* Antigenpräsentationsversuchen konnte gezeigt werden, dass die chimären Proteine, bestehend aus HEL-Antigen und Trimerisierungsdomäne bzw. Trimerisierungsdomäne und Cathepsin L Inhibitor-domäne, in den MHC Klasse II

Präsentationsweg gelangen und HEL-spezifische T-Zelllinien aktivieren können. Diese Ergebnisse können durch Literaturangaben bestätigt werden. Versuche von Arneson et al. beweisen, dass Heterotrimeren aus trunkierten und Wildtyp li-Molekülen ebenfalls in die endosomalen/lysosomalen Kompartimente gelangen können (Arneson et al., 1995). Allerdings konnte eine Antigenpräsentation auch mit der HEL cDNA ohne Fusionsanteil nachgewiesen werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die sezernierten HEL-Proteine wieder von den transfizierten Zellen durch Endozytose aufgenommen werden und in den MHC Klasse II Präsentationsweg gelangen. Eine Sekretion konnte bei allem rekombinanten Molekülen gezeigt werden, die eine ER-Signalsequenz besitzen.

4.4 Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort mit Fusionsproteinen nach DNA-Vakzinierung

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene rekombinante Plasmid-Vektoren für die DNA Vakzinierung herzustellen und zu untersuchen, ob diese eine Antikörperantwort und eine T-Zellantwort in Versuchstieren induzieren.

Mit rekombinanten Vektoren aus der Sequenz der Invarianten Kette und einem antigenen T-Zell Epitop ist es bereits gelungen, eine CD4⁺ T-Zellantwort zu induzieren. In zahlreichen Arbeiten wurde ein CD4⁺ T-Zellepitop anstelle der MHC Klasse II Bindungsdomäne der Invarianten Kette plaziert und Antigen-beladene MHC Klasse II Moleküle und eine T-Zellantwort erzeugt (Van Bergen et al., 1997; Malcherek et al., 1998; Van Tienhoven et al., 2001; Nagata et al., 2001; Toda et al., 2002).

Bei rekombinanten li-Epitop Molekülen, bei denen sich das antigene T-Zellepitop am C-Terminus befindet, werden diese wie die Wildtyp Invariante Kette in den Endosomen degradiert. Das Peptidepitop kann an Aminosäuren der MHC Klasse II Peptidbindungsgrube binden und spezifische T-Hybridomazellen aktivieren (Sponaas et al., 1999; Diebold et al., 2001).

Mittels rekombinanter li-Epitopmoleküle können jedoch *in vivo* keine Antikörperantworten induziert werden. Eine effiziente Antikörperantwort konnte nur mit einem Vektor, der aus der 41 kDa schweren Isoform der Invarianten Kette und einem antigenen Epitop bestand, induziert werden (Nagata et al., 2001). Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit chimäre Moleküle (HEL-Tri31), die aus dem HEL-Antigen und der Trimerisierungsdomäne der Invarianten Kette bestehen, hergestellt werden. Ein weiteres chimäres Molekül (HEL-Tri41) aus HEL-Antigen, Trimerisierungsdomäne und Cathepsin L Inhibitor-domäne der 41 kDa Isoform der Invarianten Kette wurde in dieser Arbeit ebenfalls in DNA-Immunisierungsversuchen eingesetzt. Es sollte untersucht werden, ob diese Moleküle nach DNA-Vakzinierung eine Antikörperantwort induzieren.

Alle mit den rekombinanten Trimerisierungsmolekülen vakzinierten Tiere entwickelten HEL-spezifische Antikörper. Es konnte aber auch eine spezifische Antikörperantwort bei den Tieren, die mit HEL cDNA immunisiert wurden, festgestellt werden .

Im Vergleich zu den HEL cDNA vakzinierten Tieren wurde schon nach einmaliger Immunisierung eine höhere Antikörperkonzentration in Versuchstieren bei Verwendung des rekombinanten HEL-Tri41 Vektors, der zwei Domänen der Invarianten Kette (Trimerisierungsdomäne und Cathepsin L Inhibitor-domäne) besitzt, beobachtet. Nach mehrmaliger DNA-Vakzinierung konnte bei den HEL-Tri41 geimpften Tieren ebenfalls eine signifikant höhere Antikörperantwort festgestellt werden. Es stellt sich jedoch die Frage, warum die Moleküle, die aus dem Antigen und der Trimerisierungsdomäne (HEL-Tri31) bestehen, keine signifikant höheren Antikörpertiter induzieren, obwohl die Trimerisierungsdomäne, wie in biochemischen Untersuchungen gezeigt, mit der Wildtyp Invarianten Kette assoziiert. Diese Interaktion führt dazu, dass das Antigen in den MHC Klasse II Prozessierungsweg gelangt.

Bei der DNA-Vakzinierung wird nur ein geringer Prozentsatz ($< 2\%$) von Langerhanszellen bzw. dendritischen Zellen in der Haut direkt transfiziert (Akbari et al., 1999). Nur in diesen transfizierten Immunzellen werden MHC Klasse II Moleküle und die Wildtyp Invariante Kette exprimiert, die dann mit den chimären Proteinen via Trimerisierungsdomäne interagieren können. Die Transfektion von dendritischen Zellen ist das Schlüsselereignis bei der DNA-Vakzinierung (Casares et al., 1997; Akbari et al., 1999; You et al., 2001), aber es ist auch ein seltenes Ereignis. Es kann angenommen werden, dass durch die geringe Anzahl der transfizierten dendritischen Zellen kein signifikanter Anstieg der Antikörpermenge bei HEL-Tri31 immunisierten Tieren nachgewiesen werden konnte. Die nächste Frage, die sich stellt, ist, warum dann der höchste Antikörpertiter und auch die höchste T-Zellproliferationsantwort bei den HEL-Tri41 geimpften Tieren beobachtet wurde. Die beiden Konstrukte unterscheiden sich durch die Cathepsin L Inhibitor-domäne der Invarianten Kette, die das HEL-Tri41 Konstrukt zusätzlich enthält. Die isolierte Cathepsin L Inhibitor-domäne bindet die Cysteinprotease Cathepsin L. Cathepsin L kommt in vielen Geweben ubiquitär vor, hauptsächlich aber in Makrophagen, corticodalen Thymusepithelzellen (TEC), epidermalen Keratinozyten und Haarfollikelzellen (Roth et al., 2000). Die Funktion dieser Interaktion zwischen Cathepsin L und der Inhibitor-domäne der Invarianten Kette ist noch nicht vollständig geklärt. In den Thymusepithelzellen ist Cathepsin L maßgeblich an der Degradation der Invarianten Kette beteiligt und somit an der MHC Klasse II Präsentation von Peptiden und an der positiven Selektion von CD4⁺ T-Zellen im Thymus (Honey et al., 2002). Die positive Selektion der T-Zellen im Thymus ist in Cathepsin L-defizienten Mäusen gestört, und diese Tiere besitzen eine verminderte Anzahl von CD4⁺ Zellen (Nakagawa et al., 1998). Cathepsin L ist aber nicht an der

Degradation der Invarianten Kette in myeloischen APCs beteiligt, dort übernimmt Cathepsin S diese Rolle (Nakagawa et al., 1999; Shi et al., 1999; Driessen et al., 1999). Cathepsin L wird von epidermalen Keratinozyten und Haarfollikelzellen exprimiert. Durch ballistischen Transfer der DNA-beschichteten Goldpartikel werden größtenteils Keratinozyten (Lu et al., 1996; Porgador et al., 1998) direkt transfiziert. Nach Degradation der rekombinanten HEL-Tri41 Proteine in Endosomen könnte die isolierte Cathepsin L Inhibitor-domäne an reifes enzymatisch aktives Cathepsin L binden und die Enzymaktivität inhibieren. Nach der Inhibition des enzymatisch aktiven Cathepsin L könnte das transfizierte HEL-Tri41 Molekül ohne weitere Degradation sezerniert werden und eventuell in größeren Menge als das HEL-Tri31 Molekül vorliegen. Eine größere Menge Protein bewirkt, dass umgebende dendritische Zellen das Protein aufnehmen können und in die umgebenden Lymphknoten auswandern können, um T-Helferzellen zu aktivieren.

Veröffentlichungen von Fiebiger et al. zeigten aber auch noch eine andere Funktion dieser Domäne: Cathepsin L wird zusammen mit der isolierten Cathepsin L Inhibitor-domäne der Invarianten Kette von Makrophagen in den extrazellulären Raum sezerniert und kann dort extrazelluläre Matrixproteine wie Elastin degradieren (Fiebiger et al., 2002). Es wird spekuliert, dass dieses zur Auflockerung der extrazellulären Matrix führt und ähnlich wie inflammatorische Prozesse andere Immunzellen z.B. Makrophagen anlockt. Makrophagen sind Antigen-präsentierende Zellen, die v.a. endozytotisch aufgenommene Antigene präsentieren und T-Zellen aktivieren können. Vielleicht sezernieren die mit den HEL-Tri41 Molekülen transfizierten Keratinozyten ebenfalls Cathepsin L, gebunden an die Inhibitor-domäne, und bewirken eine Degradation der extrazellulären Matrix. Zur Untersuchung dieses Phänomens wäre es wichtig, ein weiteres rekombinantes Fusionsmolekül herzustellen, das aus dem Antigen HEL und der Cathepsin L Inhibitor-domäne besteht. Außerdem wäre es sinnvoll zu untersuchen, welche Immunzellen nach Gene Gun Immunisierung aktiviert bzw. angelockt werden, und ein Cytokinprofil dieser Zellen zu erstellen. Daraus könnte man dann ersehen, ob ein Unterschied in der Art der Immunantwort nach Benutzung der verschiedenen rekombinanten li-Fusionsmoleküle mit den verschiedenen Domänen der Invarianten Kette besteht.

Bei allem durchgeführten Immunisierungsversuchen wurde die höchste Antikörperkonzentration in Versuchstieren induziert, die mit dem HEL-Protein in einem CpG-haltigen Adjuvans immunisiert wurden. Keiner der verwendeten rekombinanten Vektoren erreichte diese hohe Antikörpermenge. Bei der Proteinimmunisierung wurden zehnfach höhere Proteinmengen als DNA-Mengen bei der DNA-Vakzinierung eingesetzt, daher wurde ein höherer Antikörpertiter bei der Proteinimmunisierung als

nach DNA-Immunisierung erwartet. Bei klassischer Proteinimmunisierung kann das Protein direkt von B-Zellen aufgenommen werden, während bei DNA-Immunisierung das Protein erst nach Transfektion und Expression zur Verfügung steht. Nach DNA-Vakzinierung mit einigen µg DNA wurden vermutlich keine großen Mengen Protein gebildet. Untersuchungen von Casares und Mitarbeitern bestätigen, dass nach Transfektion mit rekombinanten Antigen-Vektoren das rekombinante Antigen im ng-Bereich sezerniert wird (Casares et al., 1997).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die DNA-Immunisierung zwar geringere Mengen Antikörper erzeugt als die klassische Proteinimmunisierung, jedoch die DNA-Immunisierung andere entscheidende Vorteile hat. Gegen Proteine, von denen nur die DNA-Sequenz bekannt ist, können mit der DNA-Vakzinierung spezifische Antikörper hergestellt werden. Besonders unter Verwendung der in dieser Arbeit vorgestellten rekombinanten Vektoren, die Trimerisierungsdomäne und Cathepsin L-Inhibitor-domäne besitzen, erzeugt man einen höheren Antikörpertiter als bei Verwendung des Antigens alleine in einem Vektor.

Auch die Anwendungen der rekombinanten DNA-Impfstoffe zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen schwach immunogene hochkonservierte Sequenzen ist durch die Benutzung der beiden Domänen der Invarianten Kette denkbar. Im Anschluss an diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass spezifische Antikörper nach DNA-Vakzinierung mit rekombinanten Molekülen aus der Trimerisierungsdomäne, der Cathepsin L- Inhibitor-domäne und der Sequenz des BAT2-Gens (HLA-B₂ associated transcript 2) induziert wurden. Wobei es nicht gelungen ist, Antikörper gegen die BAT2-Sequenz ohne Fusionsanteil nach DNA-Vakzinierung zu induzieren (Manuskript in Vorbereitung). Die Verwendung von rekombinanten li-Fusionsmolekülen, bestehend aus Antigen, Trimerisierungsdomäne und Cathepsin L Inhibitor-domäne, erhöht die Immunogenität eines Antigens.

5. Zusammenfassung

Die Präsentation von Antigenen ist eine wichtige Voraussetzung, um Immunzellen zu aktivieren. T-Zellen erkennen Antigene als Peptide, die von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) auf der Zelloberfläche präsentiert werden. MHC Klasse II Moleküle präsentieren Peptide, die durch Degradation endozytotisch aufgenommener Antigene entstehen. Die Invariante Kette ist ein wichtiges akzessorisches Molekül, das die intrazelluläre Faltung und Antigenbeladung der MHC Klasse II Moleküle kontrolliert. In dieser Arbeit wurden Sequenzen der Invarianten Kette benutzt, um Antigene in den MHC Klasse II Prozessierungsweg einzuschleusen. Der Mechanismus der Antigenprozessierung rekombinanter li-Fusionsmoleküle, die aus Sequenzen der Invarianten Kette und aus verschiedenen T-Zellepitopen des Antigens Hühnereiweißlysozym bestehen, wurde untersucht. Die Bindungseigenschaften der T-Zellepitope an MHC Klasse II Moleküle ist von der Affinität der Epitope und nicht von deren Position innerhalb der Sequenz der Invarianten Kette abhängig. Alle rekombinanten Fusionsmoleküle, die T-Zellepitope in verschiedenen Positionen der Sequenz der invarianten Kette besitzen, lösten *in vitro* eine T-Zellantwort aus. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte festgestellt werden, dass T-Zellepitope, trotz geringer Affinität zu MHC Klasse II Molekülen eine T-Zellantwort auslösen. Diese rekombinanten Fusionsmoleküle sind geeignet, um als DNA-Impfstoff eine T-Zellantwort in Versuchstieren zu induzieren. Zur Optimierung von Immunantworten im Tier wurden weitere chimäre Fusionsmoleküle hergestellt. Die chimären Fusionsmoleküle bestehen aus der kompletten Sequenz des Hühnereiweißlysozyms und der Trimerisierungsdomäne der Invarianten Kette. Es konnte gezeigt werden, dass diese Fusionsmoleküle mittels Trimerisierungsdomäne an die Wildtyp Invariante Kette binden und in den MHC Klasse II Prozessierungsweg gelangen. Im Gegensatz zu den rekombinanten Molekülen, die aus T-Zellepitopen und der vollständigen Sequenz der Invarianten Kette bestehen, werden die chimären Trimerisierungsmoleküle sezerniert und können in Versuchstieren eine B- und eine T-Zellantwort auslösen. Durch Einfügen der Cathepsin L Inhibitor-domäne der 41 kDa Isoform der Invarianten Kette in die Fusionsproteine konnte eine weitere Steigerung der humoralen Immunantwort nach DNA-Vakzinierung beobachtet werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Verwendung von zwei li-Domänen in rekombinanten DNA-Impfstoffen eine Erhöhung der Antikörperantwort erreicht wird.

6. Literatur

Adorini L, Appella E, Doria G, Nagy ZA (1988) Mechanisms influencing the immunodominance of T cell determinants. *J. Exp. Med.* 168:2091-104

Adorini L, Guery JC, Fuchs S, Ortiz-Navarrete V, Hammerling GJ, Momburg F (1993) Processing of endogenously synthesized hen egg-white lysozyme retained in the endoplasmic reticulum or in secretory form gives rise to a similar but not identical set of epitopes recognized by class II-restricted T cells. *J. Immunol.* 151:3576-86

Akbari O, Panjwani N, Garcia S, Tascon R, Lowrie D, Stockinger B (1999) DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J. Exp. Med.* 189:169-78

Allen PM, Strydom DJ, Unanue ER (1984) Processing of lysozyme by macrophages: identification of the determinant recognized by two T-cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81:2489-93

Allen PM, Matsueda GR, Evans RJ, Dunbar JB, Jr., Marshall GR, Unanue ER (1987) Identification of the T-cell and Ia contact residues of a T-cell antigenic epitope. *Nature* 327:713-5

Anderson KS, Cresswell P (1994) A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J.* 13:675-82

Arneson LS, Miller J (1995) Efficient endosomal localization of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes requires multimerization of the invariant chain targeting sequence. *J. Cell Biol.* 129:1217-28

Arunachalam B, Lamb CA, Cresswell P (1994) Transport properties of free and MHC class II-associated oligomers containing different isoforms of human invariant chain. *Int. Immunol.* 6:439-51

Ashman JB, Miller J (1999) A role for the transmembrane domain in the trimerization of the MHC class II-associated invariant chain. *J. Immunol.* 163:2704-12

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

Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue ER (1985) Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317:359-61

Baker PE, Gillis S, Smith KA (1979) Monoclonal cytolytic T-cell lines. *J. Exp. Med.* 149:273-8

Bakke O, Nordeng TW (1999) Intracellular traffic to compartments for MHC class II peptide loading: signals for endosomal and polarized sorting. *Immunol. Rev.* 172:171-87

Benaroch P, Yilla M, Raposo G, Ito K, Miwa K, Geuze HJ, Ploegh HL (1995) How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J.* 14:37-49

- Bertolino P**, Staschewski M, Trescol-Biemont MC, Freisewinkel IM, Schenck K, Chretien I, Forquet F, Gerlier D, Rouboudin-Combe C, Koch N (1995) Deletion of a C-terminal sequence of the class II-associated invariant chain abrogates invariant chains oligomer formation and class II antigen presentation. *J. Immunol.* 154:5620-9
- Bevec T**, Stoka V, Pungercic G, Dolenc I, Turk V (1996) Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *J. Exp. Med.* 183:1331-8
- Bikoff EK**, Huang LY, Episkopou V, van Meerwijk J, Germain RN, Robertson EJ (1993) Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J. Exp. Med.* 177:1699-712
- Bonnerot C**, Marks MS, Cosson P, Robertson EJ, Bikoff EK, Germain RN, Bonifacio JS (1994) Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *EMBO J.* 13:934-44
- Brocke P**, Garbi N, Momburg F, Hammerling GJ (2002) HLA-DM, HLA-DO and tapasin: functional similarities and differences. *Curr. Opin. Immunol.* 14:22-9
- Bruce WB**, Christensen AH, Klein T, Fromm M, Quail PH (1989) Photoregulation of a phytochrome gene promoter from oat transferred into rice by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:9692-6
- Busch R**, Cloutier I, Sekaly RP, Hammerling GJ (1996) Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 15:418-28
- Carrasco-Marin E**, Petzold S, Unanue ER (1999) Two structural states of complexes of peptide and class II major histocompatibility complex revealed by photoaffinity-labeled peptides. *J. Biol. Chem.* 274:31333-40
- Carstens C**, Newman DK, Bohlen H, Konig A, Koch N (2000) Invariant chains with the class II binding site replaced by a sequence from influenza virus matrix protein constrain low-affinity sequences to MHC II presentation. *Int. Immunol.* 12:1561-8
- Casares S**, Inaba K, Brumeanu TD, Steinman RM, Bona CA (1997) Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J. Exp. Med.* 186:1481-6
- Chan K**, Lee DJ, Schubert A, Tang CM, Crain B, Schoenberger SP, Corr M (2001) The roles of MHC class II, CD40, and B7 costimulation in CTL induction by plasmid DNA. *J. Immunol.* 166:3061-6
- Cohen AD**, Boyer JD, Weiner DB (1998) Modulating the immune response to genetic immunization. *FASEB J.* 12:1611-26
- Cresswell P** (1994) Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12:259-93.:259-93
- Cresswell P** (1996) Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84:505-7
- Dadaglio G**, Nelson CA, Deck MB, Petzold SJ, Unanue ER (1997) Characterization and quantitation of peptide-MHC complexes produced from hen egg lysozyme using a monoclonal antibody. *Immunity.* 6:727-38

Denzin LK, Cresswell P (1995) HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82:155-65

Diebold SS, Cotten M, Koch N, Zenke M (2001) MHC class II presentation of endogenously expressed antigens by transfected dendritic cells. *Gene Ther.* 8:487-93

Driessen C, Bryant RA, Lennon-Dumenil AM, Villadangos JA, Bryant PW, Shi GP, Chapman HA, Ploegh HL (1999) Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J. Cell Biol.* 147:775-90

Eisenbraun MD, Fuller DH, Haynes JR (1993) Examination of parameters affecting the elicitation of humoral immune responses by particle bombardment-mediated genetic immunization. *DNA Cell Biol.* 12:791-7

Feltquate DM, Heaney S, Webster RG, Robinson HL (1997) Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J. Immunol.* 158:2278-84

Feltquate DM, Robinson HL (1999) Effect of CpG methylation on isotype and magnitude of antibody responses to influenza hemagglutinin-expressing plasmid. *DNA Cell Biol.* 18:663-70

Fiebiger E, Maehr R, Villadangos J, Weber E, Erickson A, Bikoff E, Ploegh HL, Lennon-Dumenil AM (2002) Invariant chain controls the activity of extracellular cathepsin L. *J. Exp. Med.* 196:1263-9

Freisewinkel IM, Schenck K, Koch N (1993) The segment of invariant chain that is critical for association with major histocompatibility complex class II molecules contains the sequence of a peptide eluted from class II polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:9703-6

Germain RN, Hendrix LR (1991) MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding. *Nature* 353:134-9

Geuze HJ (1998) The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol. Today* 19:282-7

Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC (1995) The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature.* 378:457-62

Gugasyan R, Vidavsky I, Nelson CA, Gross ML, Unanue ER (1998) Isolation and quantitation of a minor determinant of hen egg white lysozyme bound to I-Ak by using peptide-specific immunoaffinity. *J. Immunol.* 161:6074-83

Gugasyan R, Velazquez C, Vidavsky I, Deck BM, van der DK, Gross ML, Unanue ER (2000) Independent selection by I-Ak molecules of two epitopes found in tandem in an extended polypeptide antigen. *J. Immunol.* 165:3206-13

Guncar G, Pungercic G, Klemencic I, Turk V, Turk D (1999) Crystal structure of MHC class II-associated p41 li fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *EMBO J.* 18:793-803

Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA (2000) DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu. Rev. Immunol.* 18:927-74.:927-74

- Hanahan D** (1985) Techniques for transformation of E.coli. DNA cloning: A practical approach, Volume 1, IRL Press, Oxford. 109-135
- Harding CV**, Unanue ER (1990) Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 346:574-6
- Harding CV**, Roof RW, Allen PM, Unanue ER (1991) Effects of pH and polysaccharides on peptide binding to class II major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:2740-4
- Heath WR, Carbone FR** (2001) Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 19:47-64.:47-64
- Hitzel C**, van Endert P, Koch N (1995) Acquisition of peptides by MHC class II polypeptides in the absence of the invariant chain. *J. Immunol.* 154:1048-56
- Honey K**, Benlagha K, Beers C, Forbush K, Teyton L, Kleijmeer MJ, Rudensky AY, Bendelac A (2002) Thymocyte expression of cathepsin L is essential for NKT cell development. *Nat. Immunol.* 3:1069-74
- Ito Y**, Hsia S, Evans CA (1966) Rabbit kidney vacuolating virus: extraction of infectious DNA. *Virology* 29:26-31
- Jasanoff A**, Park SJ, Wiley DC (1995) Direct observation of disordered regions in the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:9900-4
- Jasanoff A**, Wagner G, Wiley DC (1998) Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii. *EMBO J.* 17:6812-8
- Klinman DM**, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM (1996) CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:2879-83
- Koch N**, Koch S, Hammerling GJ (1982) Ia invariant chain detected on lymphocyte surfaces by monoclonal antibody. *Nature* 299:644-5
- Koch N**, Lauer W, Habicht J, Dobberstein B (1987) Primary structure of the gene for the murine Ia antigen-associated invariant chains (Ii). An alternatively spliced exon encodes a cysteine-rich domain highly homologous to a repetitive sequence of thyroglobulin. *EMBO J.* 6:1677-83
- Krieg AM**, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546-9
- Kvist S**, Wiman K, Claesson L, Peterson PA, Dobberstein B (1982) Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens. *Cell* 29:61-9
- Landias D**, Beck BN, Buerstedde JM, Degraw S, Klein D, Koch N, Murphy D, Pierres M, Tada T, Yamamoto K (1986) The assignment of chain specificities for anti-Ia monoclonal antibodies using L cell transfectants. *J. Immunol.* 137:3002-5
- Lanier LL**, Gutman GA, Lewis DE, Griswold ST, Warner NL (1982) Monoclonal antibodies against rat immunoglobulin kappa chains. *Hybridoma* 1:125-31

- Latek RR**, Petzold SJ, Unanue ER (2000) Hindering auxiliary anchors are potent modulators of peptide binding and selection by I-Ak class II molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:11460-5
- Lemke H**, Hammerling GJ, Hammerling U (1979) Fine specificity analysis with monoclonal antibodies of antigens controlled by the major histocompatibility complex and by the Qa/TL region in mice. *Immunol. Rev.* 47:175-206.:175-206
- Lennon-Dumenil AM**, Roberts RA, Valentijn K, Driessen C, Overkleeft HS, Erickson A, Peters PJ, Bikoff E, Ploegh HL, Wolf BP (2001) The p41 isoform of invariant chain is a chaperone for cathepsin L. *EMBO J.* 20:4055-64
- Lo-Man R**, Langeveld JP, Martineau P, Hofnung M, Meloen RH, Leclerc C (1998) Immunodominance does not result from peptide competition for MHC class II presentation. *J. Immunol.* 160:1759-66
- Lu B**, Scott G, Goldsmith LA (1996) A model for keratinocyte gene therapy: preclinical and therapeutic considerations. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 108:165-72
- Malcherek G**, Wirblich C, Willcox N, Rammensee HG, Trowsdale J, Melms A (1998) MHC class II-associated invariant chain peptide replacement by T cell epitopes: engineered invariant chain as a vehicle for directed and enhanced MHC class II antigen processing and presentation. *Eur. J. Immunol.* 28:1524-33
- Marks MS**, Blum JS, Cresswell P (1990) Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J. Cell Biol.* 111:839-55
- Miller J, Germain RN** (1986) Efficient cell surface expression of class II MHC molecules in the absence of associated invariant chain. *J. Exp. Med.* 164:1478-89
- Murphy KM, Reiner SL** (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2:933-44
- Nagata T**, Higashi T, Aoshi T, Suzuki M, Uchijima M, Koide Y (2001) Immunization with plasmid DNA encoding MHC class II binding peptide/CLIP-replaced invariant chain (Ii) induces specific helper T cells in vivo: the assessment of Ii p31 and p41 isoforms as vehicles for immunization. *Vaccine* 20:105-14
- Nakagawa T**, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, Villadangos JA, Ploegh H, Peters C, Rudensky AY (1998) Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280:450-3
- Nakagawa TY**, Brissette WH, Lira PD, Griffiths RJ, Petrushova N, Stock J, McNeish JD, Eastman SE, Howard ED, Clarke SR, Rosloniec EF, Elliott EA, Rudensky AY (1999) Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity.* 10:207-17
- Nelson CA**, Roof RW, McCourt DW, Unanue ER (1992) Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-Ak. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:7380-3
- Nelson CA**, Petzold SJ, Unanue ER (1993) Identification of two distinct properties of class II major histocompatibility complex-associated peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:1227-31

Nelson CA, Petzold SJ, Unanue ER (1994) Peptides determine the lifespan of MHC class II molecules in the antigen-presenting cell. *Nature* 371:250-2

Nelson CA, Viner NJ, Unanue ER (1996) Appreciating the complexity of MHC class II peptide binding: lysozyme peptide and I-Ak. *Immunol. Rev.* 151:81-105

Oi VT, Jones PP, Goding JW, Herzenberg LA, Herzenberg LA (1978) Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes, H-2, and Ia antigens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81:115-20

Peters C, Braun M, Weber B, Wendland M, Schmidt B, Pohlmann R, Waheed A, Von Figura K (1990) Targeting of a lysosomal membrane protein: a tyrosine-containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes. *EMBO J.* 9 :3497-506

Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN (1998) Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J. Exp. Med.* 188:1075-82

Pu Z, Carrero JA, Unanue ER (2002) Distinct recognition by two subsets of T cells of an MHC class II-peptide complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:8844-9

Randolph GJ, Inaba K, Robbani DF, Steinman RM, Muller WA (1999) Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity.* 11:753-61

Robinson KM, Maistry L (1983) Tumorigenicity and other properties of cells from ten continuous human esophageal carcinoma cell lines in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 70:89-93

Roche PA, Cresswell P (1990) Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345:615-8

Roche PA, Marks MS, Cresswell P (1991) Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354:392-4

Romagnoli P, Germain RN (1994) The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J. Exp. Med.* 180:1107-13

Roth W, Deussing J, Botchkarev VA, Pauly-Evers M, Saftig P, Hafner A, Schmidt P, Schmahl W, Scherer J, Anton-Lamprecht I, Von Figura K, Paus R, Peters C (2000) Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J.* 14:2075-86

Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA, Jr. (1991) Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353:622-7

Sadegh-Nasseri S, Stern LJ, Wiley DC, Germain RN (1994) MHC class II function preserved by low-affinity peptide interactions preceding stable binding. *Nature* 370:647-50

Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning*, Third edition, Cold Spring Harbor Labortory Press, New York

Sanderson S, Frauwirth K, Shastri N (1995) Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:7217-21

- Sato Y**, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, Silverman GJ, Lotz M, Carson DA, Raz E (1996) Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273:352-4
- Seliger B**, Maeurer MJ, Ferrone S (2000) Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol. Today* 21:455-64
- Shi GP**, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ, Riese R, Ploegh HL, Chapman HA (1999) Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity*. 10:197-206
- Siebenkotten IM**, Carstens C, Koch N (1998) Identification of a sequence that mediates promiscuous binding of invariant chain to MHC class II allotypes. *J. Immunol.* 160:3355-62
- Sponaas A**, Carstens C, Koch N (1999) C-terminal extension of the MHC class II-associated invariant chain by an antigenic sequence triggers activation of naive T cells. *Gene Ther.* 6:1826-34
- Srinivasan M**, Marsh EW, Pierce SK (1991) Characterization of naturally processed antigen bound to major histocompatibility complex class II molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:7928-32
- Stumptner P, Benaroch P** (1997) Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *EMBO J.* 16:5807-18
- Tang DC**, DeVit M, Johnston SA (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356:152-4
- Thalhamer J**, Leitner W, Hammerl P, Brtko J (2001) Designing immune responses with genetic immunization and immunostimulatory DNA sequences. *Endocr. Regul.* 35:143-66
- Toda M**, Kasai M, Hosokawa H, Nakano N, Taniguchi Y, Inouye S, Kaminogawa S, Takemori T, Sakaguchi M (2002) DNA vaccine using invariant chain gene for delivery of CD4+ T cell epitope peptide derived from Japanese cedar pollen allergen inhibits allergen-specific IgE response. *Eur. J. Immunol.* 32:1631-9
- Torres CA**, Iwasaki A, Barber BH, Robinson HL (1997) Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J. Immunol.* 158:4529-32
- van Bergen J**, Schoenberger SP, Verreck F, Amons R, Offringa R, Koning F (1997) Efficient loading of HLA-DR with a T helper epitope by genetic exchange of CLIP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:7499-502
- van Bergen J**, Ossendorp F, Jordens R, Mommaas AM, Drijfhout JW, Koning F (1999) Get into the groove! Targeting antigens to MHC class II. *Immunol. Rev.* 172:87-96.:87-96
- van Tienhoven EA**, ten Brink CT, van Bergen J, Koning F, van Eden W, Broeren CP (2001) Induction of antigen specific CD4+ T cell responses by invariant chain based DNA vaccines. *Vaccine* 19:1515-9
- Velazquez C**, DiPaolo R, Unanue ER (2001) Quantitation of lysozyme peptides bound to class II MHC molecules indicates very large differences in levels of presentation. *J. Immunol.* 166:5488-94

- Villadangos JA**, Riese RJ, Peters C, Chapman HA, Ploegh HL (1997) Degradation of mouse invariant chain: roles of cathepsins S and D and the influence of major histocompatibility complex polymorphism. *J. Exp. Med.* 186:549-60
- Villadangos JA**, Ploegh HL (2000) Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity.* 12:233-9
- Viville S**, Neefjes J, Lotteau V, Dierich A, Lemeur M, Ploegh H, Benoist C, Mathis D (1993) Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72:635-48
- Wolff JA**, Dowty ME, Jiao S, Repetto G, Berg RK, Ludtke JJ, Williams P, Slautterback DB (1992) Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 103:1249-59
- Wolff JA**, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247:1465-8
- Yamamoto K**, Floyd-Smith G, Francke U, Koch N, Lauer W, Dobberstein B, Schafer R, Hammerling GJ (1985) The gene encoding the Ia-associated invariant chain is located on chromosome 18 in the mouse. *Immunogenetics* 21:83-90
- Yang NS**, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D (1990) In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:9568-72
- You Z**, Huang X, Hester J, Toh HC, Chen SY (2001) Targeting dendritic cells to enhance DNA vaccine potency. *Cancer Res.* 61:3704-11
- Zelenin AV**, Titomirov AV, Kolesnikov VA (1989) Genetic transformation of mouse cultured cells with the help of high-velocity mechanical DNA injection. *FEBS Lett.* 244:65-7
- Zhong G**, Reis e Sousa, Germain RN (1997) Production, specificity, and functionality of monoclonal antibodies to specific peptide-major histocompatibility complex class II complexes formed by processing of exogenous protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:13856-61

Danksagung

Herrn Prof. Dr. N. Koch danke ich für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit durchführen zu können, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die mir gewährte Unterstützung.

Herrn Prof. W. Kolanus möchte ich für die Übernahme des Koreferates der vorliegenden Arbeit danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Abteilung, besonders aber bei Angelika König. Ihre ständige Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit haben mich bei dieser Arbeit sehr unterstützt. Johannes Winkler möchte ich für die wertvollen Tipps in "Klonierungsfragen" und bei Computerproblemen danken.

Frau Dr. S. Koch danke ich für die Anregungen zur Durchführung der Proliferationstests und für das Messen vieler „Filter“.

Meinen Freunden und meiner Familie, besonders Klaus, möchte ich ganz besonders herzlich dafür danken, dass sie immer geduldig alle meine „Doktorarbeitssorgen“ vor allem in der Endphase, geteilt haben. Jenny möchte ich danken für das Korrekturlesen der Arbeit.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder im Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe, dass die Dissertation noch an keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegt wurde, und dass sie nicht veröffentlicht worden ist. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt.