

**Mannosylierung  
synthetischer langer Peptide  
führt zu  
gesteigerter Antigenkruzpräsentation  
und verbesserter T-Zell-Aktivierung**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
**Judith Rauen**  
aus Trier

Bonn, 06. März 2014

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Sven Burgdorf  
2. Gutachterin: Dr. habil. Heike Weighardt  
Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2014  
Erscheinungsjahr: 2014

<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>3</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Das Immunsystem .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Die T-Zell-vermittelte Immunantwort .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Dendritische Zellen und ihre Rolle bei der Antigenpräsentation .....</b>	<b>7</b>
2.3.1 Antigenaufnahme in DCs .....	8
<b>2.4 Der Mannoserezeptor .....</b>	<b>9</b>
2.4.1 Internalisierung des Mannoserezeptors .....	10
<b>2.5 Clathrin-vermittelte Endozytose .....</b>	<b>11</b>
2.5.1 Das Adaptermolekül AP2 .....	12
2.5.2 Antigenaufnahme in spezielle Vesikel .....	13
<b>2.6 Antigenpräsentation durch DCs .....</b>	<b>14</b>
2.6.1 Mechanismus der Antigenpräsentation auf MHCI-Molekülen .....	14
2.6.2 Mechanismus der Antigenpräsentation auf MHCII-Molekülen .....	15
2.6.3 Antigenkreuzpräsentation .....	17
<b>2.7 Das (Immuno-) Proteasom .....</b>	<b>20</b>
2.7.1 Die Struktur des 26S Proteasoms .....	21
2.7.2 Die Bedeutung des Immunoproteasoms bei der Immunantwort .....	23
<b>2.8 Therapeutische Vakzinierung mit synthetischen langen Peptiden .....</b>	<b>24</b>
2.8.1 Targeting des MR zur Verbesserung von Vakzinen .....	25
<b>3 Zielsetzung .....</b>	<b>26</b>
<b>4 Material .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Verbrauchsmaterial, Plastikware .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Chemikalien, Reagenzien .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3 Kommerzielle Reaktionssysteme, Kits .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4 Puffer und Lösungen .....</b>	<b>29</b>
4.4.1 Puffer und Medien für die Zellkultur .....	29
4.4.2 Puffer für DNA-Isolierung und -Analyse .....	30
4.4.3 Puffer für SDS-PAGE und Western Blot .....	30
4.4.4 Puffer für ELISA .....	31
4.4.5 Puffer für Durchflusszytometrie .....	32
<b>4.5 Antikörper .....</b>	<b>32</b>
<b>4.6 Primer .....</b>	<b>33</b>
<b>4.7 Bakterienstämme .....</b>	<b>33</b>
<b>4.8 siRNA .....</b>	<b>33</b>
<b>4.9 Peptide .....</b>	<b>34</b>
<b>4.10 Plasmide .....</b>	<b>34</b>
<b>4.11 Zelllinien .....</b>	<b>36</b>
<b>4.12 Mausstämme .....</b>	<b>36</b>
<b>4.13 Geräte .....</b>	<b>37</b>
<b>4.14 Software .....</b>	<b>37</b>
<b>5 Methoden .....</b>	<b>39</b>
<b>5.1 Zellkulturmethoden .....</b>	<b>39</b>
5.1.1 Herstellung und Kultivierung von BMDCs .....	39
5.1.2 Handhabung und Kultivierung verschiedener Zelllinien .....	39
5.1.3 Transfektion und Transduktion von Zellen .....	40
5.1.4 Zellfärbung für die Durchflusszytometrie .....	43
5.1.5 Antigenaufnahmeassay .....	43
<b>5.2 Endosomenpräparation und -färbung .....</b>	<b>44</b>
<b>5.3 Methoden zur Untersuchung der T-Zell-Aktivierung .....</b>	<b>45</b>
5.3.1 <i>In vitro</i> Proliferationsassay .....	45

---

## INHALTSVERZEICHNIS

---

5.3.2	Messung der IL-2-Sekretion durch aktivierte T-Zellen mittels ELISA.....	46
<b>5.4</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>47</b>
5.4.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	47
5.4.2	SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) und Western Blot .....	48
5.4.3	Immunfluoreszenzmikroskopie .....	49
<b>5.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>50</b>
5.5.1	RNA Extraktion und cDNA-Synthese .....	50
5.5.2	Klonierung.....	50
<b>5.6</b>	<b>Statistische Analyse.....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
<b>6.1</b>	<b>Mannosylierung von Peptiden führt zu erhöhter Aufnahme in BMDCs und zu einer effektiveren Kreuzpräsentation .....</b>	<b>53</b>
6.1.1	Ovalbumin und das mannosylierte Peptid werden spezifisch über den Mannoserezeptor in BMDCs aufgenommen .....	53
6.1.2	OVA und das mannosylierte Peptid werden über den MR in die gleichen Kompartimente – stabile frühe Endosomen – geleitet.....	56
6.1.3	Das mannosylierte Peptid wird effektiver kreuzpräsentiert.....	61
6.1.4	Mannosylierung von synthetischen langen Peptiden führt auch <i>in vivo</i> zu einer erhöhten Kreuzpräsentation .....	67
<b>6.2</b>	<b>Molekulare Mechanismen der Mannoserezeptor-Internalisierung.....</b>	<b>70</b>
6.2.1	Das di-aromatische Endozytosesignal im zytoplasmatischen Teil des MR ist für die OVA-Aufnahme von Bedeutung.....	71
6.2.2	AP2 spielt eine Rolle bei der MR-vermittelten OVA-Aufnahme .....	73
6.2.3	Die Bedeutung von AP2 für die Antigenpräsentation.....	75
<b>6.3</b>	<b>Das Immunoproteasom ist wichtig für die OVA-Kreuzpräsentation .....</b>	<b>79</b>
6.3.1	Das Immunoproteasom wird an OVA <sup>+</sup> Endosomen rekrutiert.....	86
<b>6.4</b>	<b>Charakterisierung von OVA-haltigen Endosomen mittels Durchflusszytometrie.....</b>	<b>87</b>
6.4.1	Einsatz der endosomalen Durchflusszytometrie zum Nachweis des Immunoproteasoms an OVA <sup>+</sup> Endosomen .....	89
<b>7</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>93</b>
<b>7.1</b>	<b>Mannosylierung von SLPs führt zu einer erhöhten MR-vermittelten Aufnahme und einer verbesserten Kreuzpräsentation .....</b>	<b>93</b>
<b>7.2</b>	<b>Das Tyrosin-basierte Motiv im zytoplasmatischen Teil des MR ist bedeutsam für die MR-vermittelte OVA-Aufnahme.....</b>	<b>96</b>
<b>7.3</b>	<b>Das Adaptermolekül AP2 übernimmt eine wichtige Funktion bei der MR- Internalisierung und der MR-abhängigen Antigenkreuzpräsentation .....</b>	<b>99</b>
<b>7.4</b>	<b>Durchflusszytometrische Charakterisierung Antigen-beladener Endosomen 102</b>	
<b>7.5</b>	<b>Das Immunoproteasom übernimmt eine wichtige Funktion bei der OVA- Kreuzpräsentation .....</b>	<b>103</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>129</b>

---

## 1 Zusammenfassung

In den letzten Jahren haben synthetische lange Peptide (SLPs) in der Krebsimmuntherapie immer mehr an Bedeutung gewonnen. Sie dienen hierbei als therapeutische Vakzine, die in der Lage sind, eine adaptive, T-Zell-vermittelte Immunantwort auszulösen und so gezielt entartete und virusinfizierte Zellen zu bekämpfen. Wichtig hierfür ist, dass die Vakzine von professionellen antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und präsentiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Mannosylierung von SLPs eine Möglichkeit bietet, ihre zielgerichtete Aufnahme in dendritische Zellen (DCs) über den Mannoserezeptor (MR) zu verbessern und somit die Aktivierung spezifischer T-Zellen zu erhöhen.

Wie gezeigt werden konnte, werden mannosylierte Peptide sehr viel besser in DCs aufgenommen und gelangen über den MR direkt in für die Kreuzpräsentation spezialisierte Kompartimente. Infolgedessen werden mannosylierte Peptide deutlich effektiver kreuzpräsentiert als nicht mannosylierte Kontrollpeptide und lösen somit eine verbesserte Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus. Auch die Impfung von Mäusen mit mannosylierten SLPs führt zu einer deutlich erhöhten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort im Vergleich zur Impfung mit nicht mannosylierten SLPs. Die Möglichkeit, die *in vivo* Kreuzpräsentation durch Mannosylierung der Peptide zu erhöhen, bietet eine hervorragende Chance zur weiteren Optimierung dieser therapeutischen Impfstoffe.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit die Mechanismen der MR-vermittelten Ovalbumin-Aufnahme genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Transmembran-Domäne als auch der zytoplasmatische Teil des MR für eine effektive Aufnahme des Modellantigens OVA relevant sind. Speziell das di-aromatisch Motiv im zytoplasmatischen Schweif des MR spielt eine wichtige Rolle, wohingegen das di-Leucin Motiv weitestgehend unbedeutend ist.

Auch dem Adaptermolekül AP2 konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle bei der Ovalbumin-Aufnahme und der Antigenkreuzpräsentation zugeschrieben werden. Dementsprechend zeigt ein Knockdown von AP2 einen negativen Effekt auf die Ovalbumin-Kreuzpräsentation.

---

Im Rahmen meiner Arbeit arbeitete ich zudem an der Optimierung und Validierung der endosomalen Durchflusszytometrie mit. Mit dieser Methode ist es möglich, die Proteinzusammensetzung Antigen-haltiger Endosomen zu analysieren und somit die molekularen Mechanismen der Antigenkreuzpräsentation weiter zu erforschen. Hier wurde die Methode angewendet, um die Rekrutierung des Immunoproteasoms an OVA-haltige Endosomen zu erfassen. Diese Rekrutierung konnte in dieser Arbeit mittels Fluoreszenzmikroskopie an einzelnen Zellen gezeigt werden. Auf Grund von unspezifischer Antikörperbindung konnte dieses Ergebnis allerdings nicht mit Hilfe der endosomalen Durchflusszytometrie bestätigt werden.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem, ein körpereigenes Abwehrsystem gegen Krankheitserreger und entartete Zellen, wird in Vertebraten prinzipiell in angeborene und erworbene Immunität unterteilt. Dabei bilden physikalische Barrieren wie die Haut und die Zellen des angeborenen Immunsystems eine erste Verteidigungslinie gegenüber einer Vielzahl an Mikroorganismen. Diese Abwehr wird unter anderem über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRR), die Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) erkennen und auf der Oberfläche von Immunzellen sitzen, vermittelt. Die Aktivierung der PRR führt zur Sekretion von biologisch aktiven Molekülen wie Zytokinen, Typ I Interferonen und Chemokinen und dadurch zu einer anti-inflammatorischen oder anti-mikrobiellen Immunantwort (Olive, 2012). Auf diese Weise bietet die angeborene Immunität zwar eine schnelle, aber auch relativ unspezifische Antwort auf Krankheitserreger (Janeway et al., 2002; Medzhitov and Janeway, 2000).

Im Gegensatz dazu zeichnet sich die erworbene oder auch adaptive Immunität durch ihre Anpassungsfähigkeit an Krankheitserreger aus. Im Rahmen der erworbenen Immunität werden spezifische Antikörper und Gedächtniszellen gebildet, die bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger deutlich schneller eine effektive Abwehrreaktion hervorrufen können. Die adaptive Immunität besteht im Wesentlichen aus zwei wichtigen spezialisierten Zelltypen, den B-Lymphozyten, welche die humorale Immunität vermitteln, und den T-Lymphozyten, welche für die zellvermittelte Immunantwort verantwortlich sind (Janeway et al., 2002).

### 2.2 Die T-Zell-vermittelte Immunantwort

Die zellvermittelte Immunantwort wird durch Wechselwirkung zwischen T-Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen (APC) ausgelöst. Naive T-Zellen zirkulieren ununterbrochen zwischen Blut und peripheren lymphatischen Organen, bis sie im lymphatischen Gewebe durch eine antigenpräsentierende Zelle aktiviert werden. Diese Aktivierung ist wichtig, damit T-Zellen effektiv im Sinne

der adaptiven Immunität agieren können. Hierfür sind drei Signale notwendig: Signal eins ist das T-Zell-spezifische Peptid, präsentiert auf Molekülen des körpereigenen Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), Signal zwei ist das kostimulierende Signal und Signal drei wird durch inflammatorische Zytokine vermittelt. Nur durch gleichzeitige Aktivierung dieser drei Signale werden naive T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung in Effektor-T-Zellen angeregt (Curtsinger and Mescher, 2010; Gerdes and Zirlik, 2011; Janeway et al., 2002).

Die Erkennung des Komplexes aus einem antigenen Peptid und dem körpereigenen MHC-Molekül erfolgt hoch spezifisch durch den T-Zell Rezeptor (TCR) auf der Oberfläche von T-Zellen. Hierbei werden CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Peptiden auf MHCII-Molekülen aktiviert und CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Peptiden auf MHCI-Molekülen. Die Bindung zwischen TCR und MHC-Molekül wird weiter gestärkt durch die gleichzeitige Interaktion des CD4- oder CD8-Korezeptors mit dem Peptid-MHC-Komplex (Janeway et al., 2002). Über den CD3-Rezeptor, der mit dem TCR einen Komplex bildet, wird das Signal in die Zelle weitergeleitet (Smith-Garvin et al., 2009).

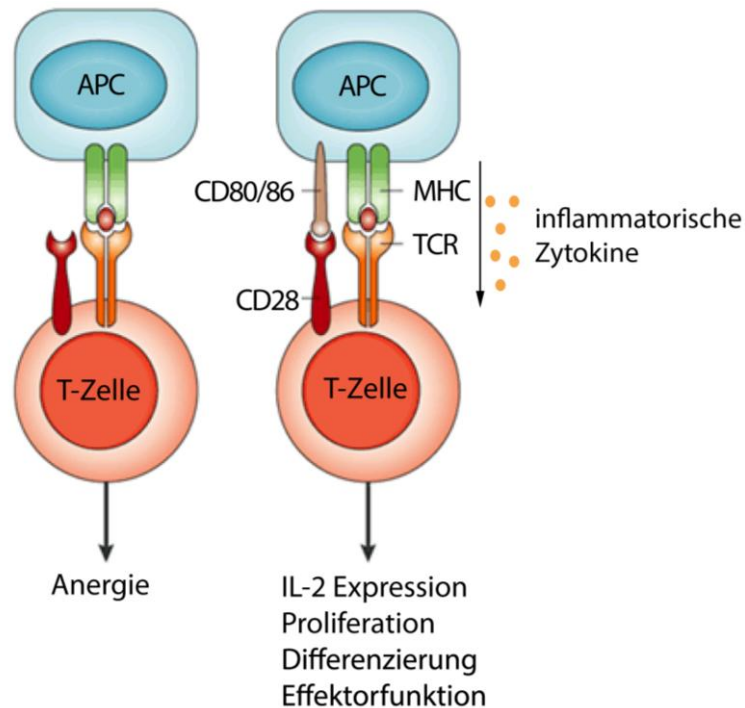
Kostimulierende Moleküle (beispielsweise CD80/86 oder CD40) auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen binden an Rezeptoren auf der T-Zell-Oberfläche (CD28, CD40-L) und vermitteln so Signal zwei. Erhält eine T-Zelle nur Signal eins, so bleibt die T-Zelle inaktiv und verfällt in einen Zustand, den man als Anergie bezeichnet (Abbildung 2-1) (Gonzalo et al., 2001; Janeway et al., 2002). Das zusätzliche kostimulierende Signal über CD80/86-CD28 führt hingegen zur Aktivierung der T-Zelle, einschließlich der Expression des Zytokins IL-2 und dessen Rezeptor (Cerdan et al., 1995; Jain et al., 1995). Die autokrine Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor fördert daraufhin die T-Zell-Proliferation sowie die Differenzierung. Hat eine T-Zelle einmal Effektorfunktion entwickelt, so kann sie jederzeit durch Kontakt mit ihrem spezifischen Peptid-MHC-Komplex auch ohne kostimulierendes Signal eine Immunantwort auslösen.

Antigenerkennung über den TCR (Signal eins) und ein kostimulierendes Signal (Signal zwei) sind für die Proliferation und IL-2-Sekretion naiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen bereits ausreichend (Chambers and Allison, 1999; Valenzuela et al., 2002). Für die Entwicklung von T-Zellen mit optimaler Effektorfunktion ist jedoch Signal drei notwendig (Valenzuela et al., 2002). Im Fall von CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird dieses Signal

---



über inflammatorische Zytokine wie IL-12 oder Typ I Interferone (IFN  $\alpha/\beta$ ) vermittelt (Curtsinger and Mescher, 2010). Nur mit Hilfe dieses Gefahren-Signals durch inflammatorische Zytokine kann eine T-Zell-Population mit starker Effektorfunktion, hoher Überlebensrate und Gedächtnisfunktion gebildet werden (Curtsinger and Mescher, 2010).



**Abbildung 2-1: Die Aktivierung von T-Zellen erfordert drei Signale.**

Die korrekte Aktivierung von T-Zellen erfordert die Interaktion des T-Zell-Rezeptors (TCR) mit einem spezifischen MHC-Peptid-Komplex sowie ein gleichzeitiges kostimulierendes Signal, beispielsweise über CD80/86-CD28, und ein Signal über inflammatorische Zytokine, beispielsweise IL-12 oder IFN  $\alpha/\beta$ . Durch das gleichzeitige Aussenden dieser drei Signale werden T-Zellen optimal aktiviert und Anergie wird vermieden. Angepasst aus (Alegre et al., 2001).

Auf Grund der Erforderlichkeit eines kostimulierenden Signals für die Aktivierung von T-Zellen kommt dendritischen Zellen (DCs), Makrophagen und B-Zellen eine besondere Rolle bei der adaptiven Immunantwort zu. Nur sie sind in der Lage, kostimulierende Oberflächenmoleküle zu exprimieren und somit T-Zellen adäquat zu aktivieren, weshalb sie als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) bezeichnet werden.

### 2.3 Dendritische Zellen und ihre Rolle bei der Antigenpräsentation

Dendritische Zellen sind mit Abstand die stärksten Stimulatoren naiver T-Zellen. Sie stammen von myeloiden Vorläuferzellen ab und gelangen nach ihrer Bildung

im Knochenmark in periphere Gewebe. Unter nicht-entzündlichen Bedingungen suchen unreife DCs in peripheren Geweben ihre Umgebung nach Mikroorganismen oder entarteten Zellen ab. Im unreifen Zustand nehmen DCs zwar eine große Menge an Antigenen auf, präsentieren diese allerdings relativ ineffizient. Dies ändert sich im Zuge ihrer Reifung. Nach Aufnahme eines Pathogens werden DCs durch ein sogenanntes Gefahren-Signal aktiviert und reifen zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen heran (Gatti and Pierre, 2003). Die Aktivierung und Reifung der DCs wird über spezielle Rezeptoren (Toll-like-Rezeptoren (TLR) (Medzhitov and Janeway, 2000), Tumor-Nekrosefaktor (TNF)-Rezeptor, Fc-Rezeptoren (Geissmann et al., 2001) oder Zytokin-Rezeptoren) eingeleitet, die durch viele pathogene Strukturen angeregt werden. Diese DC-Reifung geht einher mit einem erhöhten proteolytischen Abbau der Pathogene, einer verbesserten Peptidbeladung sowie einer gesteigerten Expression von MHC-Molekülen und kostimulierenden Molekülen auf der Zelloberfläche (Guermontez et al., 2002; Thery and Amigorena, 2001). Zusätzlich zur verbesserten Fähigkeit zur Antigenpräsentation beginnen DCs im Zuge der Reifung aus den peripheren Geweben in sekundäre lymphatische Organe zu wandern, wo sie mit naiven T-Zellen interagieren und ihnen die erworbenen Antigene präsentieren (Banchereau et al., 2000; Mellman and Steinman, 2001).

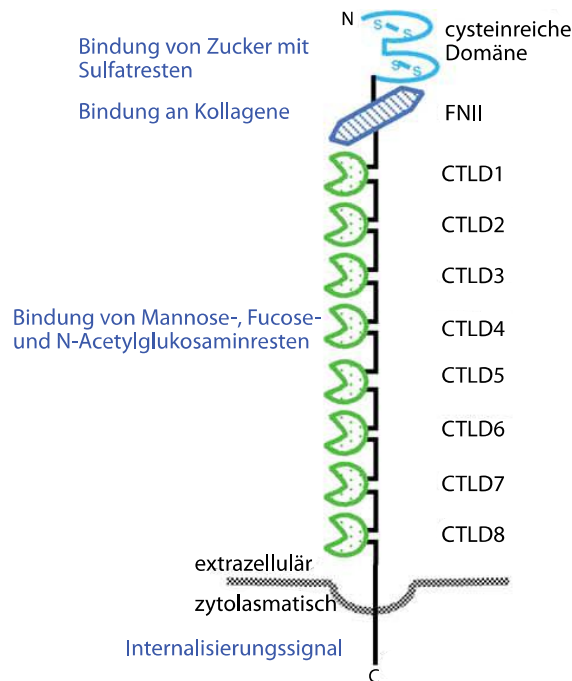
All die oben beschriebenen Veränderungen während der DC-Reifung werden ausschließlich nach Erhalt des Gefahren-Signals initiiert. Da die Aktivierung naiver T-Zellen gleichzeitig ein antigenspezifisches und ein kostimulierendes Signal ausgehend von derselben APC erfordert, kann sie nur von aktivierten DCs vermittelt werden, die das Gefahren-Signal erhalten haben und in lymphatische Organe gewandert sind.

### **2.3.1 Antigenaufnahme in DCs**

Die Erkennung und Aufnahme von Pathogenen in DCs erfolgt über Phagozytose, Makropinozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose. Zu diesem Zweck wird eine Vielzahl an endozytotischen Rezeptoren selektiv auf unreifen dendritischen Zellen exprimiert, einschließlich Langerin (Valladeau et al., 2000), DC-SIGN (Geijtenbeek et al., 2000), DEC205 (Jiang et al., 1995) sowie des Mannoserezeptors (MR/CD206) (Sallusto et al., 1995).

## 2.4 Der Mannoserezeptor

Der Mannoserezeptor (CD206) ist ein ca. 175 kDa großer C-Typ-Lektin Rezeptor und bildet zusammen mit Endo180 (CD280), dem M-Typ Phospholipase A<sub>2</sub> Rezeptor (PLA<sub>2</sub>R) und DEC205 (CD205) die Mannoserezeptor-Familie. Er besitzt eine N-terminale cysteinreiche Domäne, gefolgt von einer Fibronektin Typ II (FNII)-Domäne, acht hintereinander geschalteten C-Typ-Lektin-Domänen (CTLD), einer Transmembrandomäne und einer abschließenden kurzen zytoplasmatischen Domäne (Abbildung 2-2) (East and Isacke, 2002). Die cysteinreiche Domäne bindet Zuckermoleküle mit Sulfatresten (Leteux et al., 2000; Liu et al., 2000; Taylor et al., 2005a), die Fibronektin-Domäne ist für die Wechselwirkung mit Kollagenen verantwortlich (Martinez-Pomares et al., 2006), während die CTLDs (speziell CTLD4 und CTLD5) die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Bindung von Polysacchariden mit D-Mannose, L-Fucose oder N-Acetylglukosamin vermitteln (Taylor et al., 1992; Taylor et al., 2005b).



**Abbildung 2-2: Die Struktur des Mannoserezeptors.**

Der Mannoserezeptor ist ein Typ I Transmembranrezeptor, bestehend aus einer cysteinreichen Domäne (Bindung von Zuckern mit Sulfatresten), einer FNII-Domäne (Interaktion mit Kollagenen), acht CTLDs (Bindung von Mannose-, Fucose- und N-Acetylglukosaminresten), einer Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Schweif (enthält das Internalisierungssignal). Angepasst aus (East and Isacke, 2002).

Neben seiner ursprünglich identifizierten Funktion bei der Beseitigung lysosomaler Hydrolasen (Pontow et al., 1992) werden dem MR mittlerweile vielseitige Aufgaben wie beispielsweise bei der Gewebemöostase, bei der Zellmigration, der intrazellulären Signalgebung, bei der Produktion sowohl pro- als auch anti-inflammatorischer Zytokine sowie bei der Antigenpräsentation und der Regulation der Immunantwort zugeschrieben (Gazi and Martinez-Pomares, 2009; Lee et al., 2002; Taylor et al., 2005a).

Durch seine Fähigkeit, Mannosereste zu binden, fungiert der MR als Mustererkennungsrezeptor (PRR) für mikrobielle Pathogene, welche oft Mannose auf ihrer Oberfläche tragen. Tatsächlich ist der MR in der Lage, mittels seiner CTLD eine große Anzahl an Mikroorganismen, darunter *Candida albicans* (Marodi et al., 1991), *P. carinii* (O’Riordan et al., 1995), *Leishmania* (Chakraborty et al., 2001), HIV (Nguyen and Hildreth, 2003), *Streptococcus pneumoniae* und *Klebsiella pneumoniae* (Zamze et al., 2002), zu binden.

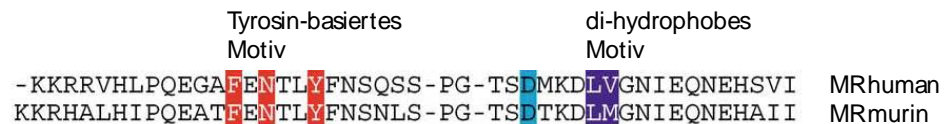
In Übereinstimmung mit seiner Funktion als PRR wird der MR in der Maus hauptsächlich auf Gewebemakrophagen und einigen DC-Populationen (Burgdorf et al., 2006; Figdor et al., 2002) exprimiert, aber auch auf Endothelzellen der Leber, der Milz, der Dermis oder des Lymphsystems sowie auf Nierenzellen und Pigmentepithel der Retina wurde er nachgewiesen (Groger et al., 2000; Linehan et al., 1999; Martinez-Pomares, 2012; Shepherd et al., 1991; Taylor et al., 2005a).

### **2.4.1 Internalisierung des Mannoserezeptors**

Als zirkulierender Rezeptor wandert der MR ständig zwischen intrazellulären Vesikeln und der Plasmamembran hin und her. Hierbei führt der MR seine Liganden in statische, frühe Endosomen und verhindert so, dass die Antigene Lysosomen erreichen, wo sie abgebaut werden würden (Gazi and Martinez-Pomares, 2009; Schweizer et al., 2000)

Unter normalen Bedingungen sind nur ca. 10–30 % des Rezeptors an der Zelloberfläche vorhanden, während die restlichen 70–90 % intrazellulär, vornehmlich in frühen Endosomen, vorliegen (East and Isacke, 2002; Gazi and Martinez-Pomares, 2009; Mahnke et al., 2000; Martinez-Pomares et al., 2003; Wainszelbaum et al., 2006).

Die Internalisierung des MR erfolgt über Clathrin-vermittelte Endozytose, hierfür sind im zytoplasmatischen Teil des MR zwei konservierte Signale vorhanden, ein Tyrosin-basiertes (FENTLY) und ein di-hydrophobes Motiv (DXXXLM) (Abbildung 2-3) (East and Isacke, 2002). Sie erlauben die Interaktion mit Adapterproteinen und ermöglichen somit die Rekrutierung an Clathrin-umhüllte Vesikel.



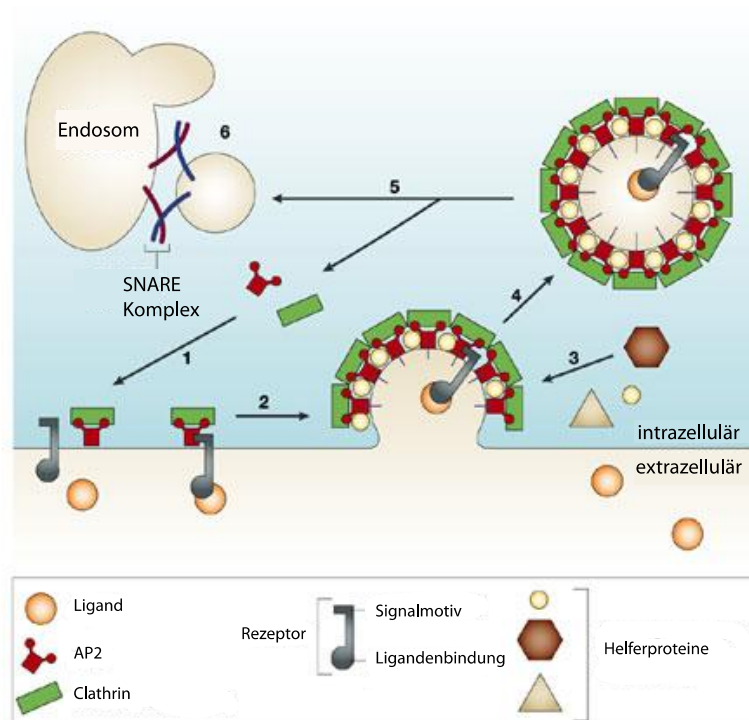
**Abbildung 2-3: Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne des MR.**

Das Tyrosin-basierte Motiv ist rot hinterlegt, das di-hydrophobe Motiv dunkelblau. Hellblau hinterlegt ist ein konservierter saurer Rest, -4 Aminosäuren entfernt vom di-hydrophoben Motiv. Aminosäuren sind im Einbuchstabencode notiert. Abbildung verändert aus (East and Isacke, 2002).

## 2.5 Clathrin-vermittelte Endozytose

Die Clathrin-vermittelte Endozytose besitzt eine hohe Relevanz bei der Internalisierung von Rezeptoren und Liganden, der Wiederverwertung von Komponenten der Plasmamembran und beim Abbau von Oberflächenproteinen.

Der Prozess beginnt durch eine Ansammlung von Hüllbausteinen an der Zellmembran, die eine Clathrin-umhüllte Einbuchtung formen. Durch die Interaktion mit Adapterproteinen werden Rezeptoren in diese Clathrin-umhüllte Bucht gezogen, aus welcher durch Einstülpung in die Zelle ein geschlossenes Clathrin-umhülltes Vesikel entsteht. Nach der Abtrennung von der Plasmamembran mittels Dynamin wird die Clathrin-Hülle durch die ATPase HSP 70 und die Hüllkomponente Auxilin vom Vesikel entfernt (Lemmon, 2001; Morgan et al., 2001; Newmyer and Schmid, 2001) und das nackte Vesikel kann in der Zelle an seinen Zielort transportiert werden (Abbildung 2-4).



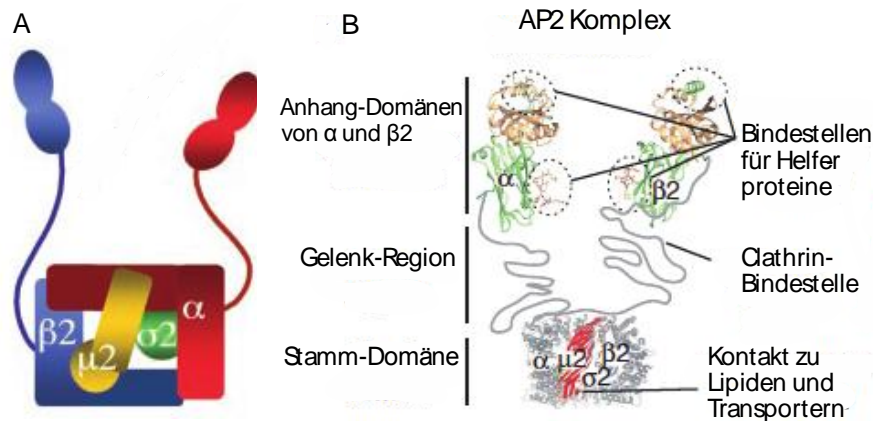
**Abbildung 2-4: Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln.**

Die Interaktion zwischen einem endozytotischen Rezeptor und Clathrin wird über ein Adaptermolekül (beispielsweise AP2) vermittelt. Der Rezeptor wird in Clathrin-umhüllte Einbuchtungen gezogen, es bildet sich ein Clathrin-umhülltes Vesikel, welches sich schließlich von der Zellmembran löst. Verändert aus (Maxfield and McGraw, 2004).

### 2.5.1 Das Adaptermolekül AP2

Da Clathrin nicht direkt an die Plasmamembran binden kann, wird diese Interaktion über Adaptermoleküle vermittelt (Mellman, 1996). Das zuerst entdeckte und am besten untersuchte Adapterprotein ist AP2, ein Mitglied der Familie der heterotetrameren Adapterproteinkomplexe.

AP2 setzt sich aus zwei großen ( $\alpha$  und  $\beta_2$ , ~ 100 kDa), einer mittleren ( $\mu_2$ , ~ 50 kDa) und einer kleinen ( $\sigma_2$ , ~ 17 kDa) Untereinheit zusammen (Traub, 2003) (Abbildung 2-5 A) und wird hauptsächlich an der Plasmamembran von Zellen gefunden (Robinson, 2004). Die Interaktion mit der Zellmembran wird über den N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit vermittelt, welcher an Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate (Ptd-Ins(4,5)P<sub>2</sub>) bindet (Collins et al., 2002; Gaidarov and Keen, 1999). Die Wechselwirkung mit Transmembranrezeptoren erfolgt über die  $\mu_2$ -Untereinheit (Ohno et al., 1995), die Bindestellen für Clathrin befinden sich in der Gelenk-Domäne der  $\beta_2$ -Untereinheit (Abbildung 2-5 B).



**Abbildung 2-5: Das Adapterprotein AP2.**

Strukturell besteht AP2 aus einem Kern, der sich aus den beiden Stammdomänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Untereinheiten und der  $\mu$ 2- und  $\sigma$ 2-Untereinheit zusammensetzt. Über zwei Gelenk-artige Strukturen wird der Kern mit den Anhang-Domänen von  $\alpha$  und  $\beta$ 2 verbunden. Diese sind für die Bindung an Helferprotein verantwortlich, während Clathrin über die Gelenkregionen gebunden wird und der Kern mit den Transportproteinen und der Zellmembran in Wechselwirkung tritt. A verändert aus (Bonifacino and Traub, 2003), B verändert aus (Schmid and McMahon, 2007).

Für die Clathrin-vermittelte Endozytose besitzen viele Transmembranrezeptoren ein Internalisierungssignal in ihrer zytoplasmatischen Region. AP2 kann das YXX $\Phi$  Signal (X ist jede beliebige Aminosäure,  $\Phi$  eine sperrige hydrophobe AS), das di-Leucin-Signal [DE]XXXL[LI] sowie das FXNPXY Signal erfassen (Boll et al., 2002; Bonifacino and Traub, 2003). Eine Abwandlung des FXNPXY Signals (FENTLY) sowie ein di-Leucin-Signal (LM) sind im zytoplasmatischen Ende des murinen MR zu finden, ein Hinweis darauf, dass AP2 auch bei der Internalisierung des MR eine entscheidende Rolle spielt.

### 2.5.2 Antigenaufnahme in spezielle Vesikel

Schon bei der Antigenaufnahme in DCs wird entschieden in welches Kompartiment das Antigen gebracht wird und auf welchen MHC-Molekülen es präsentiert wird (Burgdorf et al., 2007). Aus diesem Grund spielt die Rezeptor-vermittelte Clathrin-abhängige Endozytose von Antigenen in DCs eine entscheidende Rolle beim Auslösen einer Immunantwort. Hierbei werden die Antigene nicht, wie lange angenommen, in einen allgemeinen Fundus an frühen Endosomen transportiert, sondern entweder in eine dynamische Population, die schnell zu späten Endosomen heranreift und eine große Mobilität auf Mikrotubuli aufweist, oder in

eine stabile Population, die länger einen früh-endosomalen Charakter behält (Lakadamyali et al., 2006). Die Entscheidung über die Aufnahme in eine der beiden Endosomen-Populationen fällt dabei schon an der Plasmamembran, höchstwahrscheinlich durch Verwendung spezifischer Adaptermoleküle. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestärkt, dass verschiedene endozytotische Rezeptoren unterschiedliche Adaptermoleküle verwenden (Robinson, 2004; Sorkin, 2004; Traub, 2003). Der AP2-abhängige Ligand Transferrin wird beispielsweise in alle frühen Endosomen transportiert, während *epidermal-growth-factor* (EGF), *low-density lipoprotein* (LDL) und das Influenzavirus unabhängig von AP2 internalisiert und in dynamische, schnell reifende Endosomen gebracht werden (Lakadamyali et al., 2006).

Nach der Aufnahme der Antigene in DCs folgen anschließend die intrazelluläre Prozessierung und die Präsentation der Antigene auf MHC-Molekülen.

### **2.6 Antigenpräsentation durch DCs**

Um T-Lymphozyten aktivieren zu können, bauen DCs die aufgenommenen Pathogene intrazellulär zu antigenen Peptiden ab und laden diese auf MHC-Moleküle. Diese Peptid-MHC-Komplexe werden schließlich an der DC-Oberfläche präsentiert, wo sie von T-Zellen mittels des T-Zell-Rezeptors (TCR) erkannt werden.

Klassischerweise werden Peptide von endogenen (in der Zelle synthetisierten) Proteinen auf MHCI-Molekülen CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten präsentiert, während Peptide von extrazellulären Antigenen auf MHCII-Molekülen CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen präsentiert werden (Heath and Carbone, 2001). Durch einen weiteren Mechanismus, genannt Antigenkreuzpräsentation, ist zudem die Präsentation von extrazellulären Antigenen auf MHCI-Molekülen zur Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen möglich (Bevan, 1976; Kurts et al., 2010; Norbury et al., 2004).

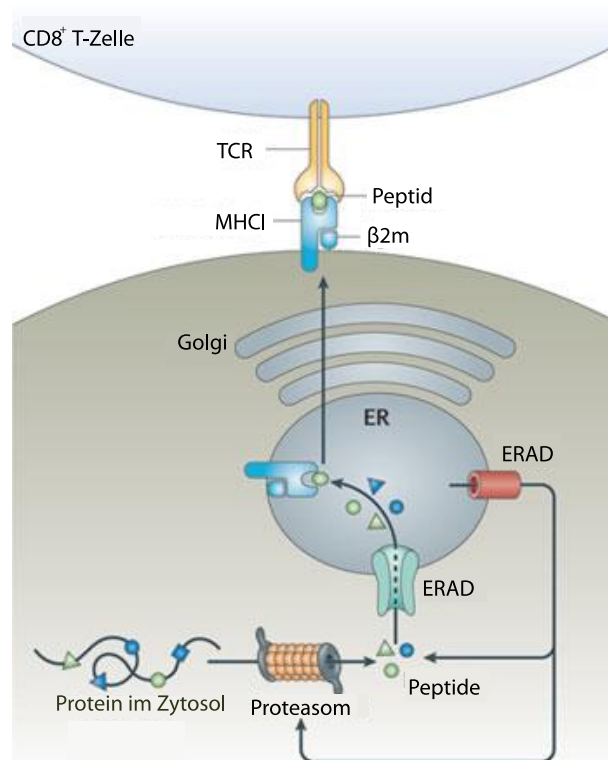
#### **2.6.1 Mechanismus der Antigenpräsentation auf MHCI-Molekülen**

MHCI-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Für die Präsentation von endogenen Antigenen auf MHCI-Molekülen werden neu synthetisierte Proteine im Zytosol durch das Proteasom zerkleinert, über einen spezialisierten Transporter (TAP, *transporter associated with antigen processing*)

---



in das endo-plasmatische Retikulum (ER) gebracht und dort durch die Aminopeptidase ERAP (*endoplasmic reticulum aminopeptidase*) auf die für MHC I-Moleküle erforderliche Länge (8–9 Aminosäuren) gestutzt (Blanchard et al., 2010). Im ER werden MHC I-Moleküle, bestehend aus einer schweren und einer leichten Kette ( $\beta_2$ -Mikro-globulin,  $\beta_2m$ ), mittels eines Proteinkomplexes aus Tapasin, ERp57 und Calreticulin mit den antigenen Peptiden beladen (Cresswell et al., 1999; Purcell and Elliott, 2008). Anschließend werden die beladenen MHC I-Moleküle über den Golgi-Apparat an die Zellmembran transportiert (Abbildung 2-6).



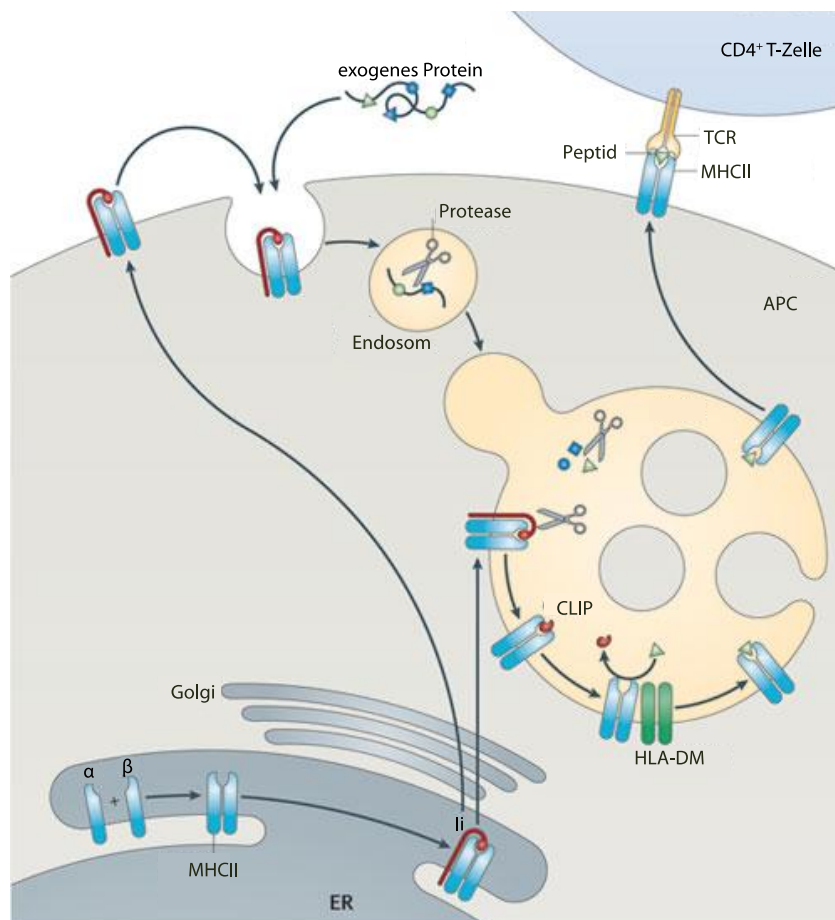
**Abbildung 2-6: Mechanismus der klassischen Antigenpräsentation auf MHC I-Molekülen.**

Für die Präsentation intrazellulärer Antigene auf MHC I-Molekülen werden Proteine zunächst im Zytosol durch das Proteasom abgebaut, die dabei entstehenden Peptide gelangen über TAP ins ER und werden dort auf MHC I-Moleküle geladen. Die resultierenden Peptid-MHC I-Komplexe werden an die Plasmamembran transportiert und dort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt. ERAD: ER-assoziierte Degradation. Abbildung angepasst aus (Neeffes et al., 2011).

### 2.6.2 Mechanismus der Antigenpräsentation auf MHC II-Molekülen

Im Gegensatz zu MHC I-Molekülen werden MHC II-Moleküle in erster Linie auf professionellen APCs exprimiert. Die transmembranen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten von MHC II-Molekülen werden im ER hergestellt und mit der invarianten Kette I<sub>i</sub> verknüpft. Direkt nach ihrer Synthese im ER gelangen MHC II-Moleküle über den Golgi in

Lysosomen. Dort wird Ii abgebaut, jedoch bleibt ein Klasse II-assoziiertes Ii Peptid (CLIP) zurück. Mit Hilfe des Proteins HLA-DM wird CLIP schließlich durch ein antigenes Peptid ersetzt, welches von extrazellulären Proteinen abstammt. Diese Peptide werden in Lysosomen mittels Proteolyse, beispielsweise durch Cathepsine, generiert (Watts, 2001) und haben idealerweise eine Länge von 18–20 Aminosäuren (O'Brien et al., 2008). Schließlich werden die Peptid-MHCII-Komplexe an die Zellmembran transportiert und dort von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt (Abbildung 2-7).



**Abbildung 2-7: Die molekularen Mechanismen der Antigenpräsentation auf MHCII-Molekülen.**

MHCII-Moleküle bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette und werden im ER mit der invarianten Kette Ii zusammengebaut. Sie werden über den Golgi in MHCII-Kompartimente transportiert, wo sie auf endozytierte Proteine treffen. Durch Proteasen werden die Proteine und Ii degradiert und die entstandenen Peptide werden auf die MHCII-Moleküle geladen. Diese Komplexe werden anschließend an die Zellmembran transportiert und von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt. Abbildung verändert aus (Neefjes et al., 2011).

### 2.6.3 Antigenkruzpräsentation

Bei der Antigenkruzpräsentation werden extrazelluläre Antigene auf MHCI-Molekülen zur Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. Wie oben bereits beschrieben, müssen naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen zunächst durch reife APCs aktiviert werden, um ihre Effektorfunktion ausführen zu können (2.2). Für den Fall, dass ein intrazelluläres Antigen nicht direkt APCs infiziert oder eine Tumorzelle nicht von einer APC abstammt, müssen APCs in der Lage sein, auch extrazelluläre Antigene auf MHCI-Molekülen zu präsentieren und so eine zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort zu initiieren. Auf Grund dessen ist die Kreuzpräsentation ein wichtiges Instrument zur Bekämpfung von Tumorzellen oder Viren, die nicht direkt APCs infizieren (Heath and Carbone, 2001; Joffre et al., 2012).

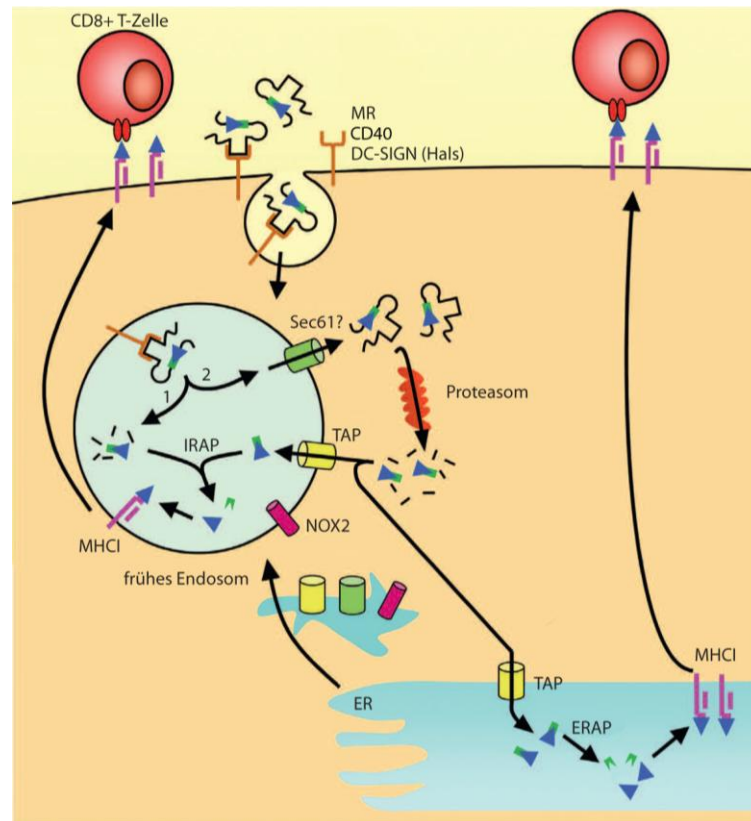
Die Entscheidung darüber, ob ein extrazelluläres Antigen klassisch auf MHCII-Molekülen präsentiert wird oder auf MHCI-Molekülen kruzpräsentiert wird, fällt schon bei der Antigenaufnahme. In diesem Sinne stellt die Scavengerrezeptor (SR)-vermittelte Endozytose oder Pinotzytose Antigene in Lysosomen für die MHCII-Präsentation zur Verfügung, während die Mannoserezeptor (MR)-vermittelte Endozytose Antigene direkt in frühe Endosomen leitet, von wo aus sie effektiv kruzpräsentiert werden können (Burgdorf et al., 2007). Auch die Antigenaufnahme via CD40 (Chatterjee et al., 2012), DC-SIGN (Halsregion) (Tacke et al., 2011) und Fc-Rezeptoren (Giodini et al., 2009) begünstigt Kreuzpräsentation.

Die molekularen Mechanismen der Antigenkruzpräsentation sind bisher noch nicht endgültig geklärt. Zwei Hauptsignalwege für die Kreuzpräsentation wurden in den letzten Jahren beschrieben.

Einerseits gibt es den TAP- und Proteasom-unabhängigen vakuolären Signalweg, bei dem das Antigen direkt in den Endosomen durch Proteasen abgebaut wird und auf MHCI-Moleküle geladen wird (Bertholet et al., 2006; Kurotaki et al., 2007; Shen et al., 2004). In dem zweiten, häufiger beschriebenen Signalweg, dem sogenannten zytosolischen Signalweg, wird das Antigen aus dem Endosom ins Zytoplasma transportiert, wo es durch das Proteasom abgebaut wird (Abbildung 2-8) (Burgdorf et al., 2008; Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995; Palmowski et al., 2006; Rock and Shen, 2005).

Für den weiteren Verlauf der Kreuzpräsentation gibt es zwei Möglichkeiten. Lange Zeit wurde angenommen, dass die vom Proteasom generierten Peptide, parallel zur klassischen MHCI-Präsentation, über TAP ins ER transportiert werden und dort auf MHCI-Moleküle geladen werden (Abbildung 2-8) (Ackerman et al., 2005; Firat et al., 2007). Mehrere Gruppen haben allerdings eine weitere Möglichkeit postuliert, die den Rücktransport der antigenen Peptide in Endosomen oder Phagosomen über TAP beinhaltet (Ackerman et al., 2003; Burgdorf et al., 2008; Houde et al., 2003). Dort werden die Peptide von einer speziellen Insulin-regulierten Aminopeptidase (IRAP) weiter gekürzt (Saveanu et al., 2009; Weimershaus et al., 2012) und auf MHCI-Moleküle geladen (Abbildung 2-8).

Die exakten molekularen Mechanismen der Antigenkreuzpräsentation hängen sehr stark von der Art des Antigens, dem endozytotischen Rezeptor und den untersuchten APCs ab.



**Abbildung 2-8: Molekulare Mechanismen der Antigenkruzpräsentation.**

Bedingt durch die Aufnahme über spezielle Rezeptoren werden Antigene in frühe Endosomen aufgenommen. Diese werden durch die Funktion der NADPH Oxidase 2 (NOX2) aktiv alkalisch gehalten und verhindern so den schnellen Abbau der Antigene. Im vakuolären Signalweg (1) werden die Proteine durch Proteasen im Endosom abgebaut, mittels IRAP weiter angepasst und auf MHC I-Moleküle geladen. Im zytosolischen Signalweg (2) werden die Proteine über die endosomale Membran hinweg ins Zytosol transportiert, möglicherweise vermittelt über Sec61. Nach proteasomalem Abbau werden die Peptide über TAP ins ER oder zurück in das gleiche frühe Endosom transportiert und auf MHC I-Moleküle geladen. Abbildung angepasst aus (Schuette and Burgdorf, 2014).

### **2.6.3.1 MR-vermittelte Kreuzpräsentation des Modellantigens Ovalbumin**

Der Mechanismus für die Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin (OVA) in murinen BMDCs wurde in den letzten Jahren ausgiebig in unserer Gruppe untersucht. Eine wichtige Voraussetzung für die OVA-Kreuzpräsentation in BMDCs ist die Aufnahme des Antigens über den MR und die Weiterleitung in stabile frühe Endosomen (Burgdorf et al., 2007; Burgdorf et al., 2006).

Die MR-abhängige Kreuzpräsentation von OVA ist Proteasom-abhängig (Burgdorf et al., 2006), das Antigen muss also aus dem Endosom in das Zytosol gelangen. Die genaueren molekularen Mechanismen dieses Antigenexports ins Zytosol sind bisher noch nicht ausreichend untersucht. Nach neuesten Erkenntnissen spielt

hierbei die ER-assoziierte Degradations-Maschinerie (ERAD), welche auch für den Transport von fehlgefalteten Proteinen aus dem ER ins Zytoplasma verantwortlich ist (Olzmann et al., 2013), eine wichtige Rolle (Ackerman et al., 2006; Giodini and Cresswell, 2008; Zehner et al., 2011). Sec61 und Derlin1, beides Mitglieder der ERAD-Maschinerie, sind hierbei zwei potenzielle Kandidaten um den erforderlichen Porenkomplex für den Antigentransport durch die endosomale Membran zu bilden (Ackerman et al., 2006; Imai et al., 2005; Lilley and Ploegh, 2004; Ye et al., 2004). Ihre tatsächliche Rolle muss allerdings in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Weiterhin wird der AAA ATPase p97 mittlerweile eine wichtige Funktion bei der Antigenkruzpräsentation zugeschrieben (Ackerman et al., 2006; Zehner et al., 2011). Sie liefert die erforderliche Energie für den Antigentransport ins Zytoplasma und wird durch Polyubiquitinreste am zytoplasmatischen Teil des MR an die Kompartimente rekrutiert, in denen sich die Antigene für die Kreuzpräsentation befinden (Zehner et al., 2011). Die AAA ATPase p97 ist möglicherweise auch in die Rekrutierung des Proteasoms an diese Kompartimente involviert.

Nach dem proteasomalen Abbau des Antigens werden die dabei generierten Peptide über den TAP Transporter wieder in die gleichen früh-endosomalen Kompartimente befördert (Burgdorf et al., 2008). Wie Studien mit Endotoxin-freiem OVA und Knockout-Mäusen ergeben haben, erfolgt die für die OVA-Kreuzpräsentation erforderliche Rekrutierung des TAP-Transporters an frühe Endosomen TLR4- und MyD88-abhängig (*myeloid differentiation primary response gene 88*) (Burgdorf et al., 2008). In den Endosomen werden die Peptide schließlich auf MHCI-Moleküle geladen und an die Zellmembran transportiert, wo sie von CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden.

### **2.7 Das (Immuno-) Proteasom**

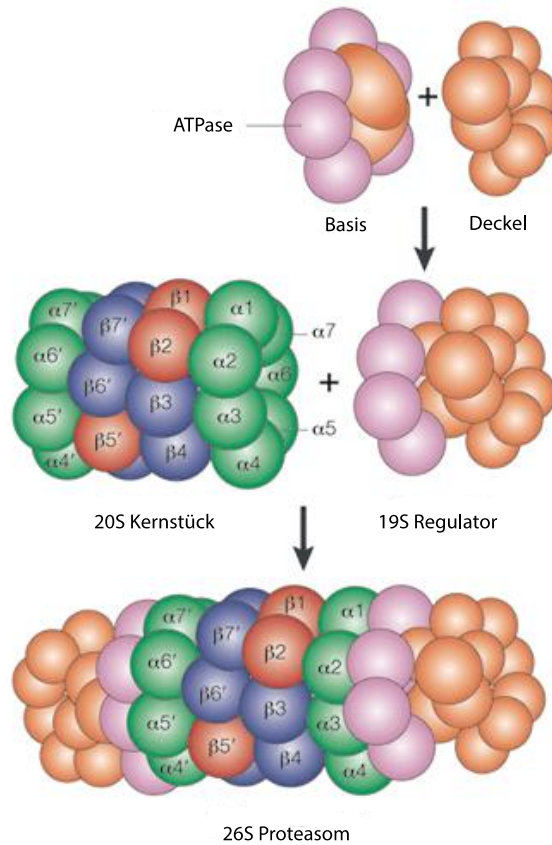
Bei der Herstellung von antigenen Peptiden für die Präsentation auf MHCI-Molekülen spielt das 26S Proteasom eine entscheidende Rolle (Rock et al., 1994). Hierbei handelt es sich um einen großen Proteinkomplex mit Proteaseaktivität, welcher hauptsächlich für den Abbau ubiquitiniertes Proteine im Zytoplasma und somit für den Erhalt der zellulären Homöostase verantwortlich ist (Ciechanover, 2005). Auf diese Weise reguliert das Proteasom vielfältige grundlegende zelluläre

---

Prozesse wie den Zellzyklus, Veränderung von Oberflächenrezeptoren und Ionenkanälen, Differenzierung, DNA-Reparatur und Apoptose (Schwartz and Ciechanover, 1999).

### **2.7.1 Die Struktur des 26S Proteasoms**

Das 26S Proteasom setzt sich aus einem 20S katalytischen Kernkomplex und zwei 19S regulatorischen Komplexen zusammen (Voges et al., 1999). Das 20S Proteasom besteht aus 28 Untereinheiten (UE), die sich in vier übereinander gestapelten Ringen aus je sieben UE organisieren. Die beiden äußeren Ringe werden durch jeweils sieben  $\alpha$ -UE, die inneren Ringe, das katalytische Zentrum, werden aus je sieben  $\beta$ -UE zusammengesetzt. Hierbei wird die katalytische Aktivität über die  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- und  $\beta$ 5-UE vermittelt (Abbildung 2-9). Die 19S regulatorischen Komplexe setzen sich aus Basis und Deckel zusammen und vermitteln die Aktivierung des 20S Komplexes und die Bindung ubiquitiniertes Substrate.

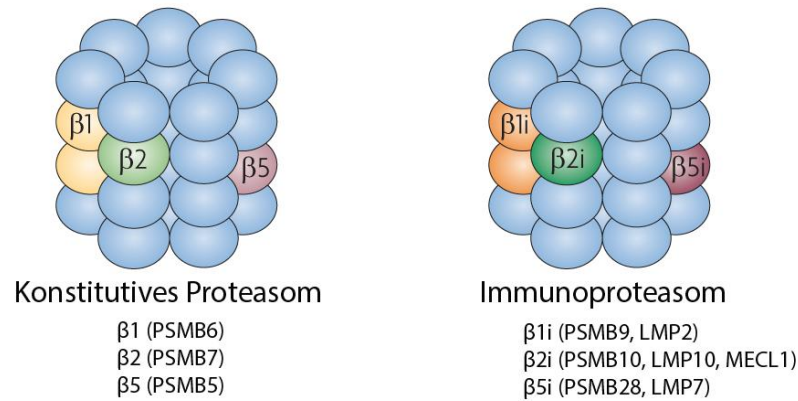


**Abbildung 2-9: Das 26S Proteasom.**

Die 28 UE des 20S Proteasoms formen vier Ringe zu je sieben UE. Die beiden äußeren Ringe beinhalten die  $\alpha$ -UE, die  $\beta$ -UE befinden sich in den inneren Ringen und vermitteln die katalytische Aktivität ( $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- und  $\beta$ 5-UE). Die 19S Regulator-Komplexe bestehen aus einer Basis mit ATPase-Aktivität und einem Deckel. Zwei 19S Regulator-Komplexe und ein 20S Kernstück bilden zusammen das 26S Proteasom. Verändert aus (Kloetzel, 2001).

In Zellen hämatopoetischen Ursprungs (beispielsweise DCs) und in Zellen unter dem Einfluss des Zytokins Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) werden die drei katalytischen Untereinheiten  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, und  $\beta$ 5 des Standardproteasoms im Zuge der *de novo* Synthese durch drei induzierbare katalytische Untereinheiten  $\beta$ 1i/LMP2 (*low molecular mass protein 2*),  $\beta$ 2i/MECL1 (*multicatalytic endopeptidase complex like 1*) und  $\beta$ 5i/LMP7 ersetzt (Macagno et al., 1999; Tanaka, 1994) (Abbildung 2-10). Das hieraus resultierende 26S Proteasom mit einer modifizierten UE-Zusammensetzung wird Immunproteasom genannt, da zwei der induzierbaren UE (LMP2 und LMP7) im MHCII-Lokus kodiert sind (Kelly et al., 1991; Ortiz-Navarrete et al., 1991).





**Abbildung 2-10: Die Untereinheitszusammensetzung des (Immuno-) Proteasoms.**

β1, β2 und β5 sind die proteolytischen Untereinheiten des konstitutiven Proteasoms. Im Immunoproteasom sind diese Untereinheiten durch die Immunoproteasom-UE β1i (LMP2), β2i (MECL1) und β5i (LMP7) ersetzt. Im Vergleich zum Standardproteasom zeigt das Immunoproteasom eine gesteigerte Chymotrypsin-ähnliche Aktivität und eine reduzierte Caspasen-ähnliche Aktivität. Abbildung angepasst aus (Groettrup et al., 2010).

### 2.7.2 Die Bedeutung des Immunoproteasoms bei der Immunantwort

Der Einbau der katalytischen Immuno-UE führt zu strukturellen Veränderungen der Substratbindestelle und beeinflusst so die Präferenz für Schnittstellen sowie die Schneiderate bei der Generierung antigener Peptide (Boes et al., 1994; Kuckelkorn et al., 1995). Auf diese Weise verbessert das Immunoproteasom sowohl die Qualität als auch die Quantität der hergestellten MHC-I-spezifischen Peptide (de Verteuil et al., 2010). Die beiden Proteasom-Typen zeigen infolgedessen unterschiedliche Fähigkeiten, bestimmte Epitope herzustellen, wobei das Immunoproteasom für die Generierung zahlreicher MHC-I-Epitope unabdingbar ist (Kincaid et al., 2012; Morel et al., 2000; Schultz et al., 2002; Sijts et al., 2000a; Van Kaer et al., 1994).

Bisher wurden Hinweise auf eine Rolle des Immunoproteasoms bei der Antigenkruzpräsentation *in vitro* nur indirekt durch die Verwendung genereller Proteasominhibitoren in DCs gewonnen (Ackerman and Cresswell, 2004; Burgdorf et al., 2006). Einen ersten spezifischen Nachweis über die Rolle des Immunoproteasoms bei der *in vivo* Kreuzpräsentation lieferte die Studie von Palmowski et al. Wie sie mit Hilfe von Knockout-Mäusen zeigt, benötigen weibliche Empfängermäuse die Immunoproteasom-UE LMP7, um das männliche HY H2-K<sup>b</sup> Epitop, welches ausschließlich vom Immunoproteasom generiert wird, *in vivo* kruzpräsentieren zu können (Palmowski et al., 2006).

## 2.8 Therapeutische Vakzinierung mit synthetischen langen Peptiden

Detailliertes Wissen über mechanistische Vorgänge während der Antigenkruzpräsentation ist eine wichtige Voraussetzung, um vorhandene Impfstoffe zu verbessern und neue effektive Impfstoffe zu entwickeln.

Das zentrale Ziel der therapeutischen Vakzinierung im Rahmen der Krebsimmuntherapie ist das Auslösen einer starken, zellvermittelten Immunantwort, die in der Lage ist, gezielt entartete Zellen anzugreifen und zu töten (Melief and van der Burg, 2008). In den letzten Jahren hat sich eine neue Klasse an Vakzinen, die synthetischen langen Peptide (SLPs), gegenüber den Proteinvakzinen und den kurzen Peptiden durchgesetzt. Synthetische lange Peptide enthalten einerseits die Epitopsequenz des Ursprungsproteins, die eine Immunantwort hervorrufen kann, und sind andererseits länger als das eigentliche MHC-Epitop, sodass sie in APCs aufgenommen und prozessiert werden müssen, um eine Immunantwort zu induzieren (Melief and van der Burg, 2008). Auf diese Weise überwinden sie einen entscheidenden Nachteil der kurzen Peptide, welche direkt an die MHCI-Moleküle aller kernhaltigen Zellen binden und nicht durch APCs prozessiert werden müssen. Die Bindung der kurzen Peptide an nicht-APCs *in vivo* führt dann zu einer Präsentation ohne kostimulierendes Signal, was Toleranz und Anergie hervorruft (Toes et al., 1996a; Toes et al., 1996b).

SLPs hingegen sind stabiler, leicht zu synthetisieren, zeigen kaum Nebenwirkungen und sind je nach Design in der Lage, sowohl eine zytotoxische T-Zell-Antwort als auch eine T-Helfer-Antwort auszulösen (Yamada et al., 2013). Tatsächlich wurden SLPs des humanen Papillomavirus 16 (HPV16) in den letzten Jahren schon erfolgreich in präklinischen Studien zur therapeutische Vakzinierung angewendet und waren in der Lage, eine potente CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort hervorzurufen (Bijker et al., 2008; Kenter et al., 2008; Kenter et al., 2009). Auch in der Krebsimmuntherapie gegen kolorektalen Krebs (Speetjens et al., 2009) und Ovarialkarzinom (Sabbatini et al., 2012) konnten SLP-basierte Impfstoffe eine starke Immunantwort induzieren.

Die Gruppen um Ossendorp und Melief haben kürzlich erstmalig die genaueren Mechanismen der Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von SLPs in DCs untersucht (Rosalia et al., 2013). Im Vergleich zum kompletten Protein werden die SLPs schneller und effektiver in DCs aufgenommen und an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

präsentiert. Die Prozessierung für die Präsentation auf MHCII erfolgt dabei Proteasom- und TAP-abhängig (Rosalia et al., 2013).

In weiteren Studien konnte die Effektivität von SLPs durch Verpacken in PLGA-Nanopartikel (*poly lactic-co-glycolic acid*) (Silva et al., 2013), durch spezifisches Targeting mittels Antikörpern (Kreutz et al., 2012) oder durch Verwendung von SLPs-TLRL-Konjugaten (Khan et al., 2007) weiter verbessert werden. Eine weitere gängige Methode, Antigene für die Aufnahme in DCs zu spezialisieren, ist das Anhängen von Mannoseresten.

### **2.8.1 Targeting des MR zur Verbesserung von Vakzinen**

Seine Funktion bei der Antigenaufnahme und die Tatsache, dass er Antigene direkt in Kompartimente leitet, von wo aus sie effektiv kreuzpräsentiert werden (Burgdorf et al., 2007; Burgdorf et al., 2006; Burgdorf et al., 2008), machen den MR zu einem interessanten Objekt für zielgerichtete Impfstrategien.

In den letzten Jahren wurden diverse Strategien zur MR-gerichteten Vakzinierung untersucht, einerseits durch Verwendung natürlicher oder synthetischer Liganden des MR oder auch mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAb). Wie die Fülle an Studien in den letzten Jahren deutlich gezeigt hat, hängt der Charakter der hervorgerufenen Immunantwort ( $T_H1$ ,  $T_H2$ , CTL, inflammatorische Zytokine) sehr stark von der Art und Spezifität des MR-Liganden/mAb ab (Apostolopoulos et al., 2000; Chieppa et al., 2003; Hashimoto et al., 2006; Hattori et al., 2004; He et al., 2007; Jain et al., 2005; Kawakami et al., 2000; Kim et al., 2006; Ramakrishna et al., 2004).

### 3 Zielsetzung

Das Hauptziel der therapeutischen Vakzinierung ist es, eine starke T-Zell-vermittelte, zytotoxische Immunantwort hervorzurufen. Die Kreuzpräsentation extrazellulärer Antigene ist eine wichtige Voraussetzung für das Auslösen einer effektiven zytotoxischen T-Zell-Antwort zur Bekämpfung von Tumorzellen oder virusinfizierter Zellen, die keine APCs sind. Da der MR Antigene speziell für die Antigenkruzpräsentation in DCs zur Verfügung stellt, ist er ein ideales Ziel für eine gerichtete Antigenaufnahme in DCs im Zuge der therapeutischen Vakzinierung. Weiterhin haben sich synthetische lange Peptide in den letzten Jahren als effektive therapeutische Vakzine etabliert.

Vor diesem Hintergrund ist das Hauptziel dieser Arbeit, durch Mannosylierung von SLPs ihre spezifische MR-vermittelte Aufnahme in DCs zu erhöhen und auf diese Weise letztendlich ihre Kreuzpräsentation zu verbessern. Ergänzend soll untersucht werden, ob die Mannosylierung von synthetischen langen Peptiden eine Möglichkeit bietet, die Antigenkruzpräsentation *in vivo* effektiver zu gestalten und damit die Wirksamkeit von SLPs im Rahmen der therapeutischen Vakzinierung zu optimieren.

Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren sind die exakten molekularen Mechanismen der Antigenkruzpräsentation noch nicht endgültig aufgedeckt. Eine dieser offenen Fragen, die Rolle des Immunoproteasoms bei der Antigenkruzpräsentation, soll im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden. Speziell die Rekrutierung des Immunoproteasoms an die Kreuzpräsentationsmaschinerie soll untersucht werden. Um die Proteinzusammensetzung Antigen-haltiger Endosomen zu analysieren, wurde in den letzten Jahren in unserem Labor die Methode der endosomalen Durchflusszytometrie entwickelt (Zehner et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit soll die Methode genutzt werden, um die Rekrutierung des Immunoproteasoms an OVA-haltige Endosomen zu untersuchen.

Auch die exakten Vorgänge bei der MR-Internalisierung und der Antigenaufnahme sind bisher nur unzureichend beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit sollen deshalb das dabei verwendete Internalisierungssignal im zytoplasmatischen Teil des MR sowie das verantwortliche Adaptermolekül identifiziert werden.

## 4 Material

### 4.1 Verbrauchsmaterial, Plastikware

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Plastikwaren von der Firma Sarstedt bezogen.

Material	Anbieter
24-Well Platte	TPP
96-Well Platte	TPP
Bottle Top Filter	Corning
Cryo Tubes	Nunc
Einmalspritzen	BD Plastipak
Einwegkanülen	B. Braun Petzold
Elektroporationsküvetten 4 mm	Bio-Rad Laboratories
ELISA Platten, high binding, flat bottom, 96-Well	Greiner Bio-One GmbH
Metall-Zellsiebe	Eigenbau
Nitrozellulosemembran 0,2 µm	Whatman plc/ GE Healthcare
Objektträger und Deckgläschen	Carl Roth GmbH
PD10 Säulen	GE Healthcare
Pipettenspitzen mit Filter	Axygen Scientific, Inc
Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm/0,45 µm	Whatman plc/ GE Healthcare
Whatman Filterpapier	Whatman plc/ GE Healthcare
Zellsiebe 40 µm	BD

### 4.2 Chemikalien, Reagenzien

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Chemikalien von der Firma Carl Roth GmbH bezogen.

Chemikalie/Reagenz	Anbieter
2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)	Sigma-Aldrich
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (Dapi)	Sigma-Aldrich
AccuPrime DNA Polymerase	Life Technologies

## MATERIAL

---

Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Carl Roth GmbH
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester	eBioscience
Complete EDTA-free Proteaseinhibitor	Roche Applied Science
DNA-Leiter 1 kb	New England Biolabs GmbH
DNA-Leiter 100 bp	New England Biolabs GmbH
ECL Substrat	Pierce/ Thermo Scientific
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce/ Thermo Scientific
Ficoll-Paque™ Premium 1.084	GE Healthcare
G418	PAA/ GE Healthcare
Gentamicin	GE Healthcare
Glutathion	Sigma-Aldrich
Hoechst 33258	Life Technologies
IC Fixation Puffer	eBioscience
IL-2, rekombinant	eBioscience
Iodoacetamid	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Carl Roth GmbH
Lipofectamine 2000	Life Technologies
Lucifer Yellow	Life Technologies
Mannan	Sigma-Aldrich
MHCI OVA Peptid (257-264)	Tebu-Bio
MHCII OVA Peptid (323-339)	Tebu-Bio
Mounting Medium	Rezept der AG Thiele
Neutravidin-Horseradish Peroxidase	Pierce/ Thermo Scientific
Nonidet P-40 Substitut	Sigma-Aldrich
OptiMEM	Life Technologies
Ovalbumin	Sigma Aldrich
Ovalbumin-Alexa647/488	Life Technologies
Permeabilisierungspuffer 10x	eBioscience
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom/Merck Millipore
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH
Polybren	Sigma-Aldrich

---

## MATERIAL

---

Ponceau S	Sigma-Aldrich
Protein A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz Biotechnologie
ColorPlus™ Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa)	New England Biolabs GmbH
Restriktionsenzyme	New England Biolabs GmbH
RNase-Exitus Plus	AppliChem GmbH
SYBR Safe DNA Gel Stain	Life Technologies
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs GmbH
Transferrin-Alexa488	Life Technologies
Tween20	Sigma-Aldrich

### 4.3 Kommerzielle Reaktionssysteme, Kits

---

Kit	Anbieter
mMESSAGE mMACHINE T3 Kit	Ambion, Applied Biosystems
mMESSAGE mMACHINE T7 Kit	Ambion, Applied Biosystems
Nucleo Bond Xtra Midi Plus Kit	Macherey-Nagel GmbH
Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel GmbH
Poly-A Tailing Kit	Ambion, Applied Biosystems
Q5® site-directed mutagenesis Kit	New England Biolabs GmbH
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH

### 4.4 Puffer und Lösungen

#### 4.4.1 Puffer und Medien für die Zellkultur

Alle Zellkulturmedien und -zusätze wurden von der Firma PAA/GE Healthcare bezogen.

- 2x BBS für DNA Transfektion:  
50 mM BES; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7
- 2,5 M CaCl<sub>2</sub>
- Red Blood Cell (RBC) Lysepuffer:  
155 mM NH<sub>4</sub>Cl; 12 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,1 mM EDTA; steril filtriert

- BMDC (*bone marrow-derived dendritic cell*) Medium:  
IMDM; 10 % FCS Clone; 100 Units/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin;  
50  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol; 2,5–10 % (v/v) Überstand von R1 Zellen (GM-CSF  
haltig)
- T-Zell-Medium:  
RPMI 1640; 10 % FCS; 100 Units/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin;  
50  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol; 2 mM L-Glutamin
- Hek293T Medium:  
DMEM (4,5 g/l Glucose); 10 % FCS Clone; 1 mM Natriumpyruvat
- R1-Medium (GM-CSF produzierende Zellen):  
IMDM; 10 % FCS Clone; 100 Units/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin;  
50  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### **4.4.2 Puffer für DNA-Isolierung und -Analyse**

- Mini-Präp Lösung I (Resuspension):  
50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100  $\mu$ g/ml RNase A; Lagerung bei 4 °C
- Mini-Präp Lösung II (Lyse):  
200 mM NaOH; 1 % (v/v) SDS
- Mini-Präp Lösung III (Neutralisation):  
5 M KAc pH 5,5
- 50x TAE-Puffer (Tris-Acetat):  
2 M Tris; 1 M Essigsäure; 0,05 M EDTA; pH 8,2–8,4
- 6x DNA Ladepuffer:  
30 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 69,75 % dH<sub>2</sub>O

#### **4.4.3 Puffer für SDS-PAGE und Western Blot**

- NP40 Lysepuffer:  
50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl ; 1 % (v/v) NP-40  
unmittelbar vor Verwendung wurde Proteinaseinhibitor zugegeben
- sMR Lysepuffer:  
10 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 2 % (v/v) Triton X-100  
unmittelbar vor Verwendung wurde Proteinaseinhibitor zugegeben



## MATERIAL

- 4x Lämmli-Puffer:  
250 mM Tris pH 6,8; 8 % (v/v) SDS; 40 % (v/v) Glycerol; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; (10 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol)
- SDS-Gel (Sammel- und Trenngel):

	8 % Trenngel	10 % Trenngel	12 % Trenngel	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	2,3 ml	1,9 ml	1,6 ml	1,2 ml
30 % Acrylamid	1,3 ml	1,7 ml	2 ml	330 $\mu$ l
1,5 M Tris pH 8,8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	
1 M Tris pH 6,8				250 $\mu$ l
10 % APS	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	20 $\mu$ l
10 % SDS	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	20 $\mu$ l
TEMED	3 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l

- SDS Laufpuffer:  
25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (v/v) SDS
- Towbin's Transfer Puffer:  
25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; (0,1 % (v/v) SDS)
- TBST:  
50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween20

### 4.4.4 Puffer für ELISA

- Coating Puffer:  
0,1 M NaHCO<sub>3</sub>; pH 8,2
- Waschpuffer:  
0,05 % (v/v) Tween20 in PBS
- ABTS Puffer:  
0,1 M Zitronensäure; pH 4,35
- ABTS Substratlösung:  
1 mg/ml ABTS in ABTS Puffer; 15  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10 ml Puffer
- Blockierpuffer:  
1 % (w/v) BSA in PBS

#### 4.4.5 Puffer für Durchflusszytometrie

- FACS-Puffer:  
0,1 % (w/v) BSA; 0,005 % (w/v) NaN<sub>3</sub> in PBS
- Permeabilisierungspuffer:  
0,1 % (v/v) Triton X-100 in FACS-Puffer
- MES Puffer (Homogenisierungspuffer) für Endosomenpräparation:  
25 mM MES; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF frisch zugegeben; pH 6,5; filtriert durch 0,2 µm Filter

#### 4.5 Antikörper

Antigen	Klon/ Bezeichnung	Firma	Anwendung
Aktin	—	Sigma-Aldrich	WB
alpha Adaptin	AP6	Pierce	IP
CD11c	N418	eBioscience	FACS
CD11b	M1/70	eBioscience	FACS
CD206 (Mannoserezeptor)	MR5D3	AbD Serotec	WB, IF, FACS
CD206 intrazellulär	C-20	Santa Cruz	FACS
CD4	YTS191.1	AbD Serotec	FACS
CD40	3/23	AbD Serotec	FACS
CD8	53-6.7	eBioscience	FACS
CD80	16.10A1	eBioscience	FACS
CD86	PO3	AbD Serotec	FACS
EEA1	H-300	Santa Cruz	FACS, IF
IgG Isotyp	P3.6.2.8.1	eBioscience	IP
IL-2-Biotin	JES6-5H4	eBioscience	ELISA
IL-2	JES6-1A12	eBioscience	ELISA
LAMP1	1D4B	BD Bioscience	IF
LMP2	—	Abcam	WB
LMP7	—	Abcam	WB
Lucifer Yellow-Biotin	—	Life Technologies	IF
MHCI H2-K <sup>b</sup>	AF6-88.5	AbD Serotec	FACS

## MATERIAL

---

MHCII I-Ab	AF6-120.1	eBioscience	FACS
Rab5	D-11	Santa Cruz	FACS
TAP-1	E-20	Santa Cruz	FACS

Alle sekundären Antikörper wurden von Santa Cruz Biotechnologie (HRP-gekoppelte Antikörper für Western Blot) oder von Life Technologies (Alexa-gekoppelte Antikörper für Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz) bezogen.

### 4.6 Primer

---

Name	Sequenz
pMR Not Xba for	gatcga gcgccgc gcattctagaccctacagtaatgc
pMR EcoRI AclI rev	gcgcgc gaattc aacggt gcctcttgaggatgtgcaacgcatg
pMR Y1428A EcoRI AclI for	gcgcgc gaattc aacggt tgaaaacactctc gcc ttcaacagtaatctgagtcc
T7 promotor rev	taatacgactcactataggg
pMR YF1428,29AA EcoRI AclI for	gcgcgc gaattc aacggt tgaaaacactctc gcc gcc aacagtaatctgagtcc
pMR F1429A EcoRI AclI for	gcgcgc gaattc aacggt tgaaaacactctctac gcc aacagtaatctgagtcc
MR L1443P M1444A BamHI for	ccaggaacaagtgacacgaaggatcccgcgggcaacatcgagcagaatg
pMR M1444A BglII for	ccaggaacaagtgacacgaaagatctcgcgggcaacatcgagcagaatg
SDM-MR-M6P-MR_F	gctgtctatatcattgggggtttcttatacaagaaaaggcatgcggtg
SDM-MR-M6P-MR_R	aaccaatgatgcaaatatgacaagtaagattgctttagaagagcccttg
SDM-MR-M6P-stop_F	tgtctatatcattgggggtttcttataactaaccggggtcgacctcgag

### 4.7 Bakterienstämme

DH5 $\alpha$ , XL1Blue

### 4.8 siRNA

siRNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Dharmacon bezogen. Für jedes Target-Gen wurden zwei verschiedene Oligos verwendet. Als Kontroll-siRNA

diente spezifische siRNA gegen das Luciferase-Gen, welches in BMDCs nicht vorkommt.

#### 4.9 Peptide

Die hier verwendeten synthetischen langen Peptide (*synthetic long peptides*, SLPs) des Modellantigens Ovalbumin und des humanen Papillomavirus wurden an der Universität Leiden hergestellt.

- OVA-Peptide MHC I-spezifisch:
  - LEQLESIINFEKLAAAAAK
  - K(M2)-LEQLESIINFEKLAAAAAK
  - LEQLESIINFEKLAAAAAKC-Alexa647
  - K(M2)-LEQLESIINFEKLAAAAAKC-Alexa647
- OVA-Peptide MHC II-spezifisch:
  - ESLKISQAVHAAHAEINEAGRAAAAAAK
  - K(M2)-ESLKISQAVHAAHAEINEAGRAAAAAAK
- HPV16 E7 Peptide:
  - GQAEPDRAHYNIVTFCKCDS
  - K(M2)-GQAEPDRAHYNIVTFCKCDS

#### 4.10 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pLox-iG	lentivirales Transferplasmid mit IRES-GFP Sequenz	Addgene
pCMVΔ8.74	enthält HIV gag, pol, tat, rev	Addgene
pCMV-VSV-G	enthält das VSV-G Hüllprotein	Addgene
pCMV-Tag2b	enthält ein Flag-Tag vor der <i>multiple cloning site</i> (MSC)	Addgene
pEGFP-N1/C1	enthält EGFP nach (N1) bzw. vor der MCS (C1)	Addgene
pdsRed-N1-LMP2	Expressionsplasmid für Fusionsprotein von LMP2 mit C-terminalem dsRed	Matthias Zehner
pdsRed-N1-LMP7	Expressionsplasmid für Fusionsprotein von LMP7 mit C-terminalem dsRed	Matthias Zehner

MATERIAL

---

pEGFP-N1-LMP2	Expressionsplasmid für Fusionsprotein von LMP2 mit C-terminalem EGFP	Judith Rauen
pEGFP-N1-LMP7	Expressionsplasmid für Fusionsprotein von LMP7 mit C-terminalem EGFP	Judith Rauen
plox-CW-LMP2-EGFP	lentivirales Transferplasmid mit Sequenz für Fusionsprotein von LMP2 mit C-terminalem EGFP	Judith Rauen
plox-CW-LMP7-EGFP	lentivirales Transferplasmid mit Sequenz für Fusionsprotein von LMP7 mit C-terminalem EGFP	Judith Rauen
pCMV-MR	Expressionsplasmid mit dem WT Mannoserezeptor unter Kontrolle des CMV-Promotors	AG Burgdorf
pLox-iG-MR	lentivirales Transferplasmid mit der Mannoserezeptorsequenz gefolgt von IRES-GFP	AG Burgdorf
pCMV-MR Y1429A	Expressionsplasmid für den Mannoserezeptor mit der Mutation Y1429A	Judith Rauen
pCMV-MR Y1429A, F1430A	Expressionsplasmid für den Mannoserezeptor mit den Mutationen Y1429A, F1430A	Judith Rauen
pCMV-MR F1430A	Expressionsplasmid für den Mannoserezeptor mit der Mutation F1430A	Judith Rauen
pCMV-MR M1445A	Expressionsplasmid für den Mannoserezeptor mit der Mutation M1445A	Judith Rauen
pCMV-MR L1444P, M1445A	Expressionsplasmid für den Mannoserezeptor mit den Mutationen L1444P und M1445A	Judith Rauen
pCMV-MR-M6PR-stop	Expressionsplasmid für den chimären Rezeptor mit extrazellulärer Domäne des	Judith Rauen

---

---

	MR und Transmembrandomäne des M6PR. Der chimäre Rezeptor besitzt keinen zytoplasmatischen Teil.	
pCMV-MR-M6PR-MR	Expressionsplasmid für den chimären Rezeptor mit extrazellulärer Domäne des MR, Transmembrandomäne des M6PR und zytoplasmatischer Domäne des MR	Judith Rauen

#### 4.11 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
Hek293T	humane Fibroblasten, Produzenten-Zellen für die Produktion von Lentivirus	
Hek-MR	stabile Zelllinie mit Mannoserezeptor-IRES-GFP-Expression	Achmet Imam Chasan, (Zehner et al., 2012)
Hek-iG	stabile Zelllinie mit IRES-GFP-Expression	Achmet Imam Chasan, (Zehner et al., 2012)
R1	NIH-3T3 Zellen, stabil transduziert für GM-CSF-Expression und -Sekretion	
B3Z	T-Zell-Hybridom, CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Klon, der OVA auf MHCI-Molekülen des Haplotyps H-2K <sup>b</sup> erkennt	(Karttunen et al., 1992)

#### 4.12 Mausstämme

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
WT	Wildtyp Stamm mit C57BL/6J Hintergrund, Haplotyp H-2K <sup>b</sup>	
MR <sup>-/-</sup>	am Startcodon in Exon 1 wurde ein EGFP eingefügt. Es enthält ein Stopcodon, welches die Expression des MR verhindert. C57BL/6J Hintergrund, Haplotyp H-2K <sup>b</sup>	Lee et al. (2002)
OTI Rag1 <sup>-/-</sup>	Mausstamm mit einem CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Klon, der	(Hogquist et al.,

---

---

	das OVA <sub>257-264</sub> Epitop auf MHC I-Molekülen erkennt. Den Mäusen fehlt das Rag1 Gen, wodurch sie keine reifen T- und B-Zellen mit endogenen Rezeptoren entwickeln.	1994; Mombaerts et al., 1992)
OTII	Mausstamm mit einem CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Klon, der das OVA <sub>323-339</sub> Epitop auf MHC II-Molekülen erkennt	(Barnden et al., 1998)
LMP2 <sup>-/-</sup>	Mausstamm mit C57BL/6 Hintergrund ohne LMP2-Expression	Van Kaer et al. (1994)
LMP7 <sup>-/-</sup>	Mausstamm mit C57BL/6 Hintergrund ohne LMP7-Expression	Fehling et al. (1994)

#### 4.13 Geräte

---

Gerät	Firma
Fluoreszenzmikroskop, ApoTome	Carl Zeiss
ChemiDoc MP System	Bio-Rad Laboratories
Elektroporator Gene Pulser Xcell	Bio-Rad Laboratories
Flow Cytometer LSRII	BD Biosciences
Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan EX	Thermo Scientific

#### 4.14 Software

---

Software	Firma
Ascent Software	Thermo Scientific
EndNote X5	Thomson Reuters
Photoshop CS4	Adobe Systems
Illustrator CS4	Adobe Systems
Image Lab™ Software	Bio-Rad Laboratories
Office 2011 for Macintosh	Microsoft Corporation
Nanodrop 2000 Software	Thermo Scientific
Prism 4.0	GraphPad Software, Inc.
FlowJo 8.8.7	Tree Star, Inc.
Serial Cloner 2-5	Serialbasics

---

Image]

National Institutes of Health,  
USA



## 5 Methoden

### 5.1 Zellkulturmethoden

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C mit einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub>. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 5.1.1 Herstellung und Kultivierung von BMDCs

Zur *in vitro* Herstellung von dendritischen Zellen aus Knochenmark (*bone marrow-derived dendritic cells*, BMDCs) wurden Femur und Tibia aus ca. zwölf Wochen alten Mäusen entnommen und Muskel- und Bindegewebe von den Knochen entfernt. Unter sterilen Bedingung wurden die Knochenmarkszellen mit Hilfe von Spritze und Kanüle mit PBS aus den Knochen gewaschen. Die Zellen wurden durch 40 µm Zellsiebe filtriert, bei 1200 rpm zentrifugiert und anschließend in 17 ml Medium mit *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) auf Bakterienchalen (unbehandelte Oberfläche) kultiviert. Durch GM-CSF differenzieren die Knochenmarkszellen zu dendritischen Zellen. Die Zellen einer Maus wurden auf drei Platten gegeben und nach drei bis vier Tagen im Verhältnis 1:2 gesplittet. Die Zellen wurden an Tag sieben oder acht für Versuche verwendet, es wurden immer sowohl die adhärenenten als auch die nicht adhärenenten Zellen für Versuche verwertet. Das Ablösen der Zellen erfolgte in 3 ml 2 mM EDTA in PBS mittels einer 1 000 µl-Pipette durch wiederholtes Pipettieren.

#### 5.1.2 Handhabung und Kultivierung verschiedener Zelllinien

##### 5.1.2.1 R1-Zellen

Die transgene R1-Zelllinie wurde zur Herstellung von GM-CSF verwendet. Bevor der GM-CSF-haltige Überstand geerntet werden konnte, wurden die Zellen für ca. zehn Tage in 1 mg/ml G418 selektioniert. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen in G418-freiem Medium für weitere zehn Tage kultiviert und expandiert und anschließend der Überstand geerntet. Je nach GM-CSF-Konzentration in diesem Überstand wurden 2,5–10 % (v/v) zum BMDC Medium gegeben.

### 5.1.2.2 Hek-Zellen

Die Haltung von Hek293T und Hek-MR Zellen erfolgte auf beschichteten Zellkulturschalen. Die Zellen wurden jeden zweiten Tag passagiert. Hierfür wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 1,5 ml Trypsin/EDTA von der Zellkulturplatte gelöst. Anschließend wurde die Trypsin-Reaktion mit Medium gestoppt und die Zellen wurden bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in neuem Medium aufgenommen und in einer 1:10 bis 1:15 Verdünnung weiter kultiviert.

### 5.1.3 Transfektion und Transduktion von Zellen

#### 5.1.3.1 Elektroporation von BMDCs mit siRNA

Durch RNA-Interferenz können in eukaryotischen Zellen zielgerichtet Gene abgeschaltet werden. Hierfür kommen kurze RNA-Sequenzen zum Einsatz, die in der Zelle an mRNA binden, zur Degradation von mRNA führen und so die Translation zum Protein verhindern.

Die RNA-Interferenz kann in BMDCs sehr erfolgreich angewendet werden, die entsprechenden siRNA-Moleküle werden hierbei am besten mittels Elektroporation in die Zellen gebracht. Hierbei wird die Zellmembran mit Hilfe eines elektrischen Feldes vorübergehend permeabel gemacht, sodass die siRNA-Moleküle in das Zellinnere gelangen können. Während der gesamten Prozedur wurde mit Handschuhen und gestopften Spitzen gearbeitet und alle Flächen und Pipetten wurden mit RNase Exitus dekontaminiert, um dem Abbau der siRNA durch Ribonukleasen vorzubeugen.

Zunächst wurden BMDCs an Differenzierungstag drei oder vier geerntet und ein Mal in OptiMEM gewaschen. Für die Elektroporation wurden die Zellen in OptiMEM in einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/100  $\mu$ l aufgenommen. Es wurden 10  $\mu$ g siRNA in 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O in eine 4 mm Elektroporationsküvette vorgelegt, 100  $\mu$ l Zellen ( $4 \times 10^6$  Zellen) wurden auf die siRNA pipettiert und das Gemisch für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in zwei Pulsen bei 1000 Volt, in einem Abstand von 0,5 Sekunden und einer Pulsdauer von 5 Millisekunden. Anschließend wurden die Zellen sofort in warmes Medium aufgenommen und in den Brutschrank gestellt. Je nach Halbwertszeit des Zielproteins ist das Proteinlevel circa drei bis vier Tage nach der siRNA-

Elektroporation am geringsten, sodass die Zellen dann für die jeweiligen Versuche verwendet wurden. Die tatsächliche Expression des Zielproteins nach der RNA-Interferenz wurde jeweils in einer Zeitreihe mittels Western Blot überprüft.

### **5.1.3.2 Calcium-Phosphat-Transfektion**

Für die Calcium-Phosphat-Transfektion im 24-Well-Format wurden 40 000 Zellen/Well in 500 µl Medium ausplattiert und am nächsten Tag transfiziert. Etwa eine Stunde vor der Transfektion erhielten die Zellen 1 ml frisches Medium (ohne FCS und Antibiotika). Pro Well wurden 100 ng DNA in einem Transfektionsvolumen von 100 µl eingesetzt. Die DNA wurde in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 45 µl aufgefüllt und mit 5 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> versetzt. Dieses DNA-Gemisch wurde unter Luftzufuhr in 50 µl 2xBBS pipettiert. Der gesamte Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert, bevor er langsam und tropfenweise auf die Zellen gegeben wurde.

Das Transfektionsmedium wurde nach 12–16 Stunden durch frisches Kulturmedium ersetzt und die Zellen je nach Versuch 24–48 Stunden nach der Transfektion verwendet.

### **5.1.3.3 Lipofektion**

Für die Lipofektion im 24-Well-Format wurden 40 000 Zellen/Well in 500 µl Medium am Vortag ausplattiert. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium erneuert. Pro Well wurden je 50 µl OptiMEM in zwei Tubes vorgelegt, in eines wurden 0,8 µl Lipofectamine 2000 pipettiert, in das andere 500 ng DNA. Das DNA-Gemisch wurde anschließend zum Lipofectamine 2000 gegeben und der Ansatz für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor er tropfenweise auf die Zellen gegeben wurde. Nach sechs Stunden wurde das Transfektionsmedium durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden je nach verwendeter DNA nach 30–48 Stunden für Versuche verwendet.

### **5.1.3.4 Herstellung lentiviraler Vektoren in Hek293T-Zellen**

Lentivirale Vektoren wurden durch die gleichzeitige transiente Transfektion der Produzentenzelllinie Hek293T mit drei Expressionsplasmiden hergestellt. Die verwendeten Plasmide waren zum einen ein Transfervektor, der die *psi* ( $\psi$ )

*packaging* Sequenz sowie das transgene Gen zwischen den lentiviralen *long terminal repeats* (LTR), der Information für die Infektion der Zielzellen, enthält. Das zweite Plasmid, das *packaging* Plasmid  $\Delta 8.74$ , enthält die viralen Gene *gag* (Capsidprotein), *pol* (reverse Transkriptase/Integrase), sowie das *rev-response element* (RRE). Das dritte Plasmid enthält das Gen für ein virales Hüllprotein, in diesem Fall das G Glycoprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G).

Die drei Plasmide wurden mittels Calcium-Phosphat-Transfektion in Hek293T Zellen gebracht. Hierfür wurden die Zellen am Vortag in 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert, sodass sie am Tag der Transfektion 60–70 % konfluent waren. Eine Stunde vor der Transfektion wurden 5 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben. Die DNA wurde zunächst in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und mit H<sub>2</sub>O auf 450  $\mu$ l aufgefüllt. Pro Zellkulturschale wurden 10  $\mu$ g Transferplasmid, 3,5  $\mu$ g  $\Delta 8.74$  und 6,5  $\mu$ g VSV-G verwendet. Der Ansatz wurde mit 50  $\mu$ l 2,5 M CaCl<sub>2</sub> versetzt und unter Luftzufuhr langsam in 500  $\mu$ l 2xBBS getropft. Bevor die Zellen langsam und tropfenweise mit dem Transfektionsgemisch transfiziert wurden, wurde dieses für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Acht Stunden nach der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen und verworfen, die Zellen wurden ein Mal mit PBS gewaschen und mit 11 ml neuem Medium versorgt. Etwa 48–72 Stunden nach der Transfektion wurde der Virusüberstand geerntet, bei 2800 rpm für acht Minuten zentrifugiert und anschließend durch eine 0,45  $\mu$ m Celluloseacetat-Membran filtriert.

Die Konzentrierung der Viruspartikel erfolgte in der Ultrazentrifuge bei 21 000 rpm und 4 °C für zwei Stunden. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Viruspellet in 300  $\mu$ l OptiMEM für mehrere Stunden bei 4 °C gelöst. Idealerweise wurden die lentiviralen Vektoren direkt zur Transduktion der Zielzellen verwendet.

### **5.1.3.5 Lentivirale Transduktion von BMDCs**

Für die lentivirale Transduktion von BMDCs wurden circa eine Stunde vor der Transduktion 500 000 Zellen an Differenzierungstag drei oder vier in 500  $\mu$ l Medium pro Well einer 24-Well-Platte ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden mit lentiviralen Vektoren inkubiert. Um die Transduktionseffizienz zu steigern, wurde zum Ansatz 8  $\mu$ g/ml Polybren gegeben.

Nach 24 Stunden wurde das Medium mit Lentivirus und Polybren durch frisches Medium ersetzt. An Differenzierungstag sieben (ca. 72 Stunden nach der Transduktion) wurden die Zellen für Versuche verwendet.

### **5.1.4 Zellfärbung für die Durchflusszytometrie**

Um die Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen zu untersuchen, wurden diese mit spezifischen Antikörpern angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zunächst geerntet und in FACS-Röhrchen überführt (circa 300 000 Zellen/Röhrchen). Sie wurden ein Mal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Zu den im Röhrchen verbleibenden 50 µl Zellsuspension wurden 50 µl Antikörperlösung zugegeben (FACS-Puffer, Antikörper 1:200, Mausserum 1:100) und die Zellen wurden für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln gefärbt. Zuletzt wurden die Zellen noch ein Mal in 1 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 250 µl FACS-Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die Analyse der Zellen im Durchflusszytometer.

Auf die gleiche Weise wurden auch Proteine im Inneren von Zellen gefärbt. Die Zellen wurden vor der Färbung allerdings fixiert und die Zellmembran wurde permeabilisiert, sodass die Antikörper ins Innere der Zellen gelangen konnten. Nach dem Ernten der Zellen und einem Waschschrift mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 300 µl 4 % Paraformaldehyd (PFA) oder in 300 µl IC Fixation Buffer (eBioscience) für zehn Minuten bei 4 °C fixiert. Das Fixationsreagenz wurde in einem Wasch- und Zentrifugationsschritt (fünf Minuten bei 1200 rpm) mit FACS-Puffer entfernt und die Zellen wurden anschließend mit 1 ml Permeabilisierungspuffer für zehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Diese Reaktion wurde mit einem weiteren Waschschrift beendet. Im Anschluss wurden die Zellen wie oben beschrieben mit spezifischen Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Bei der Färbung intrazellulärer Moleküle erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper in Permeabilisierungspuffer.

### **5.1.5 Antigenaufnahmeassay**

200 000 BMDCs/Well wurden in 500 µl Medium in einer 24-Well-Platte ausplattiert und für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit

250 ng/ml Ovalbumin-Alexa647 oder mit dem mannosylierten oder dem nicht-mannosylierten Alexa647-gekoppelten Peptid in verschiedenen Konzentrationen (1,6–1000 nM) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das antigenhaltig Medium abgenommen und die Zellen wurden in 1 ml 2 mM EDTA in PBS mit einem Zellschaber gelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden ein Mal in FACS-Puffer gewaschen (1200 rpm für fünf Minuten) und schließlich wurde die Antigenaufnahme im Durchflusszytometer bestimmt.

Um die Antigenaufnahme der diversen Mannoserezeptor-Mutanten zu bestimmen, wurden zunächst Hek293T Zellen transient mit den MR-Expressionsplasmiden transfiziert. Die Transfektion mittels Lipofectamine 2000 erfolgte wie unter 5.1.3.3 beschrieben. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 250 ng/ml Ovalbumin-Alexa647 bei 37 °C inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Zellen in PBS aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Um eine Kontrolle für die Transfektionseffizienz zu bekommen, wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und der Mannoserezeptor wurde mit einem spezifischen Antikörper gefärbt wie unter 5.1.4 beschrieben.

### **5.2 Endosomenpräparation und -färbung**

Bevor Ovalbumin-haltige Endosomen aus BMDCs oder Hek-MR/ Hek-iG Zellen isoliert wurden, wurden die Zellen zunächst für 15 Minuten (BMDCs) oder 45 Minuten (Hek Zellen) mit 250 ng/ml OVA-Alexa647 bei 37 °C inkubiert.

Für die Präparation der Endosomen wurde das Medium von den Zellen abgenommen und diese wurden anschließend in 3 ml 2 mM EDTA in PBS abgeschabt, in Reaktionsgefäße überführt und zwei Mal für fünf Minuten bei 1200 rpm in PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Das Pellet wurde in 1 ml MES Puffer aufgenommen und die Zellen wurden in einen Homogenisator überführt. Mit drei langsamen, vorsichtigen Schüben wurden die Zellen homogenisiert und die Suspension wurde anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Um große Zellfragmente und -trümmer loszuwerden, wurden die Proben bei 100 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Für die Färbereaktion wurde anschließend der Endosomen-haltige Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt.

Für extraendosomale Färbungen wurden circa 400 µl Endosomensuspension in Homogenisierungspuffer mit einem Primärantikörper (400 ng/ml) für 20 Minuten bei 4 °C gefärbt. Der Sekundärantikörper wurde anschließend direkt dazu pipettiert (1 µg/ml) und die Endosomen wurden für weitere 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Schließlich wurden die Endosomen in 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 20 Minuten bei 4 °C fixiert und zuletzt durch Zentrifugation bei 8000 x g für zehn Minuten bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl Homogenisierungspuffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

Für intraendosomale Färbungen wurden die Endosomen für 20 Minuten in 4 % PFA bei 4 °C fixiert. Um die Endosomen zu permeabilisieren, wurde anschließend Triton X-100 (0,05 %) zugegeben und für weitere zehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Endosomen durch Zentrifugation für zehn Minuten bei 4 °C pelletiert und gefärbt wie oben beschrieben.

### **5.3 Methoden zur Untersuchung der T-Zell-Aktivierung**

#### **5.3.1 *In vitro* Proliferationsassay**

In diesem Versuch wurden OVA-spezifische T-Zellen durch OVA-beladene dendritische Zellen aktiviert und anschließend wurde ihre Proliferationsrate untersucht. Hierfür wurden CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus OTI beziehungsweise OTII Mäusen verwendet, die das jeweilige OVA-Peptid auf MHC-I-Molekülen (SIINFEKL) oder MHC-II-Molekülen (ISQAVHAAHAEINEAGR) auf der Oberfläche von dendritischen Zellen erkennen und dadurch aktiviert werden.

Für diesen Versuch wurden zunächst 5x10<sup>4</sup> BMDCs/Well an Differenzierungstag sieben in 50 µl Medium auf einer 96-Well-Platte ausplattiert und für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert, sodass sie sich absetzen konnten. Die nächsten drei Stunden wurden die Zellen mit 50 µl Ovalbumin oder den diversen Ovalbumin-Peptiden (50–100 nM) inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus OTI oder OTII Mäusen isoliert. Dazu wurden die Milzen aus den Mäusen entnommen und durch ein Metallsieb mechanisch zerkleinert, sodass eine Einzelzellsuspension entstand. Um Erythrozyten aus der Suspension zu entfernen, wurden die Zellen für fünf Minuten mit 2 ml *Red Cell Lysis Buffer* behandelt, anschließend in 10 ml PBS aufgenommen und zuletzt durch ein 40 µm Nylonsieb filtriert.

---

Die T-Lymphozyten wurden im nächsten Schritt bei 1500 rpm zentrifugiert, das Pellet wurde in 10 ml PBS aufgenommen und mit 1  $\mu$ M Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) für 15 Minuten bei 37 °C gefärbt. CFSE ist ein membranpermeabler, fluoreszenter Farbstoff, der in die T-Zellen eindringt. Durch Esterasen im Inneren der Zellen werden die Acetatgruppen von CFSE entfernt, wodurch die Membranpermeabilität verloren geht. Bei der Zellteilung einer CFSE-markierten Zelle wird CFSE gleichmäßig auf beide Tochterzellen verteilt und somit die Fluoreszenz halbiert. Die schrittweise Halbierung der Fluoreszenzintensität kann im Durchflusszytometer bestimmt und somit die Zellteilungen quantifiziert werden.

Die Färbereaktion wurde mit eiskaltem PBS abgestoppt und die Zellen wurden drei Mal in kaltem PBS gewaschen, um überschüssiges CFSE loszuwerden. Anschließend wurden die T-Lymphozyten in Medium aufgenommen und  $1 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l der Zellsuspension auf die dendritischen Zellen gegeben, von denen vorher das antigenhaltige Medium abgenommen worden war. Die T-Zellen wurden zusammen mit den dendritischen Zellen für drei Tage bei 37 °C inkubiert, einen Tag nach dem Ausplattieren erhielten sie 200  $\mu$ l frisches Medium.

An Tag drei wurden die T-Zellen resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt, ein Mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1500 rpm für zehn Minuten) und schließlich mit einem  $\alpha$ CD8- oder  $\alpha$ CD4-Antikörper gefärbt. Die Antikörperfärbung erfolgte in der Verdünnung 1:100 in 100  $\mu$ l FACS-Puffer zusammen mit Mausserum (1:50) für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Abschließend wurden die Zellen noch ein Mal mit FACS-Puffer gewaschen, bei 1500 rpm für zehn Minuten zentrifugiert und in 200  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen, bevor sie mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden.

### **5.3.2 Messung der IL-2-Sekretion durch aktivierte T-Zellen mittels ELISA**

Je nach Experiment wurden BMDCs von WT, MR<sup>-/-</sup>, LMP2<sup>-/-</sup> oder LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen mit Ovalbumin oder den OVA-Peptiden inkubiert und anschließend mit OVA-spezifischen T-Zellen zusammen kultiviert. Die Aktivierung von T-Zellen führt zur Sekretion von IL-2 ins Medium. Die Quantifizierung der IL-2-Sekretion wurde mittels ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) durchgeführt.



Es wurden zunächst  $5 \times 10^4$  BMDCs/Well an Differenzierungstag sieben in  $50 \mu\text{l}$  Medium auf einer 96-Well-Platte ausplattiert und für 45 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, sodass sie sich absetzen konnten. Anschließend wurden die Zellen für drei bis vier Stunden mit Ovalbumin oder den diversen Ovalbumin-Peptiden ( $50\text{--}100 \text{ nM}$ ) in  $50 \mu\text{l}$  Medium inkubiert. Zwischenzeitlich wurden  $\text{CD8}^+$  oder  $\text{CD4}^+$  T-Zellen aus OTI beziehungsweise OTII Mäusen isoliert und die roten Blutkörperchen lysiert, wie oben beschrieben (5.3.1). Die T-Zellen wurden gezählt und anschließend  $1 \times 10^5$  Zellen/Well in  $100 \mu\text{l}$  Medium auf die dendritischen Zellen gegeben, von denen zuvor das Medium abgenommen worden war. Die Zellen wurden über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  kokultiviert. Am nächsten Tag wurde der IL-2-Gehalt im Medium mittels ELISA gemessen.

### 5.4 Biochemische Methoden

#### 5.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mittels ELISA wurde der IL-2-Gehalt im Medium der Kokultur von BMDCs und T-Zellen quantifiziert, um die Aktivierung der T-Zellen zu untersuchen.

Über Nacht wurde die Oberfläche einer ELISA Platte mit einem IL-2-Antikörper (Klon JES6-1A12) bei  $4^\circ\text{C}$  benetzt. Dazu wurde der Antikörper 1:1000 in *Coating Buffer* verdünnt und davon  $50 \mu\text{l}$ /Well verwendet.

Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Platte drei Mal mit  $150 \mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen. Um unspezifische Bindestellen auf der Platte zu blocken, wurde die Platte mit  $100 \mu\text{l}$  Blockierpuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden  $50 \mu\text{l}$  der Proben (Zellkulturüberstand) oder IL-2-Standard (rekombinantes Protein, in einer 4-fachen Verdünnungsreihe von 80 bis  $0 \text{ ng/ml}$ ) in Triplikaten auf die Platte gegeben und für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Ungebundenes IL-2 wurde in einem weiteren Waschschrift entfernt. Die anschließende Inkubation mit dem biotinylierten IL-2-Antikörper (Klon JES6-5H4, 1:1000 verdünnt in Blockierpuffer) erfolgte für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$ . Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Proben mit Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppeltem Neutravidin (1:1000 in PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im weiteren Verlauf wurde die Platte ein letztes Mal gewaschen. Abschließend wurden  $50 \mu\text{l}$  Substratlösung in jedes Well gegeben ( $1 \text{ mg/ml}$  ABTS in ABTS Puffer, pro  $10 \text{ ml}$  Puffer wurden  $15 \mu\text{l}$

---

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugefügt) und die Platte wurde bei 450 nm und 620 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

#### **5.4.2 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) und Western Blot**

SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe.

Um Zellysate herzustellen, wurden die Zellen zunächst geerntet und ein Mal in PBS gewaschen, bevor sie in entsprechendem Lysepuffer mit Proteaseinhibitor aufgenommen wurden und für 30 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Circa  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in 100 µl Lysepuffer lysiert. Im Anschluss wurden Zellüberreste bei 21 000 x g für zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde in neue Gefäße überführt. Die Proben wurden zuletzt mit 4x-Lämmli-Puffer versetzt (je nach Anwendung mit oder ohne β-Mercaptoethanol) und für fünf Minuten bei 95 °C aufgeköcht.

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte im elektrischen Feld in einem Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel in SDS-Laufpuffer. Die Proben wurden zunächst bei einer konstanten Stromstärke von 15 mA in das Sammelgel geleitet, anschließend wurde die Stromstärke bis 20 mA/Gel erhöht und die Proben wurden im Trenngel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Der Transfer der Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte entweder mittels Wet-Transfer (300 mA konstant, 1 h, in Towbin's Transfer Puffer unter gekühlten Bedingungen) oder im SemiDry-Transfer (200 mA konstant, 1 h 15 min). Um unspezifische Bindung durch den Antikörper an der Membran zu vermeiden, wurde die Membran je nach verwendetem Antikörper in 5 % Milch in TBST oder in Roti-Block (Carl Roth GmbH) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach einem Waschschrift in TBST wurde die Membran mit dem Primärantikörper (1:200 bis 1:1000 in TBST) inkubiert, entweder eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Bevor die Membran anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert wurde, wurde sie drei Mal für fünf Minuten in TBST gewaschen.

Zuletzt wurde die Membran drei Mal für zehn Minuten in TBST gewaschen und mit ECL-Substrat versetzt, welches durch die Meerrettichperoxidase umgesetzt wird und im ChemiDoc detektiert werden kann.

### **5.4.3 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Die genaue intrazelluläre Lokalisation des Antigens Ovalbumin beziehungsweise des mannosylierten OVA-Peptids wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

Dafür wurden 200 000 BMDCs/Well auf Deckgläschen in 24-Well-Platten ausgesät und für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert, damit sie sich absetzen konnten. Im Anschluss wurden die Zellen für 15 Minuten bei 37 °C mit Ovalbumin-Alexa647 (250 ng/ml), dem Alexa647-gekoppelten mannosylierten Peptid (100 nM), Transferrin-Alexa488 (5 µg/ml) und/oder dem Pinozytosemarker Lucifer Yellow (0,3 mg/ml) inkubiert. Nach anschließender Inkubation mit frischem Medium für 15 Minuten wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen und für zehn Minuten mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Im nächsten Schritt folgten die Blockierung unspezifischer Bindestellen und die Permeabilisierung der Zellen für eine Stunde in 5 % (w/v) Milchpulver und 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS. Durch spezifische Antikörperfärbung wurden definierte zelluläre Kompartimente wie beispielsweise frühe Endosomen oder Lysosomen angefärbt. Die Antikörperfärbung erfolgte für eine Stunde bei RT in der Färbelösung (Antikörper 1:500; Ziegenserum 1:250; 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS). Im Anschluss wurden die Zellen für eine Stunde bei RT mit dem Sekundärantikörper (1:1000) gefärbt. Zuletzt wurden die Zellkerne für 15 Minuten bei RT mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Dapi angefärbt (1 µg/ml) und die Deckgläser auf Objektträgern eingedeckelt. Alle Färb- bzw. Inkubationsreaktionen wurden auf einer Wippe durchgeführt und nach jedem Schritt wurden die Zellen jeweils drei Mal mit PBS gewaschen.

Bevor die Proben im Fluoreszenzmikroskop analysiert wurden, härteten sie über Nacht bei 4 °C im Dunkeln aus.

## 5.5 Molekularbiologische Methoden

### 5.5.1 RNA Extraktion und cDNA-Synthese

Die Aufreinigung von RNA aus BMDCs wurde mit dem Qiagen RNeasy Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die cDNA-Synthese erfolgte anschließend direkt aus der dabei isolierten RNA.

RNA	5 µl
RNase freies Wasser	5,5 µl
5xReaktionspuffer	4 µl
Oligo-dT-T7 Primer	1 µl
0,1 M DTT	2 µl
10 mM dNTPs	1 µl
Superskript II	1 µl
RNasin	0,5 µl

Die Reaktion erfolgte bei 42 °C für 90 Minuten. Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 5.5.2 Klonierung

#### 5.5.2.1 PCR

Für die Klonierung der verschiedenen Mannoserezeptor-Konstrukte wurde die gewünschte DNA Sequenz mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus cDNA amplifiziert. Auf diese Weise konnten durch die Wahl der Primer spezifische Mutationen in den zytoplasmatischen Teil des Mannoserezeptors eingefügt werden. Der Reaktionsansatz und das PCR-Programm waren wie folgt:

10x AccuPrime Reaktionsgemisch	5 µl
Primer <i>forward</i> (10 µM)	1,5 µl
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	1,5 µl
Template DNA (~150 ng/µl)	1 µl
Accu Prime Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	40,5 µl

95 °C 2 min	} x31
95 °C 30 sec	
55 °C 30 sec	
68 °C 1,5 min	
68 °C 10 min	
4 °C ∞	

Je nach PCR Produkt wurde die Annealing-Zeit verlängert oder die Temperatur angepasst.

#### 5.5.2.2 Restriktionsverdau und Ligation

Im nächsten Schritt wurde das PCR Produkt über eine Nucleo Spin Säule aufgereinigt und mit den gewünschten Restriktionsenzymen verdaut. Auch der Vektor wurde mit den entsprechenden Enzymen verdaut.

PCR Produkt oder 1 µg Vektor	32 µl
Enzym 1	2 µl
Enzym 2	2 µl
10x Puffer	4 µl

Der Restriktionsverdau erfolgte standardmäßig für eine Stunde bei 37 °C. Wenn ApaI verwendet wurde, erfolgte der Verdau bei 25 °C.

Im Anschluss wurden das Insert und der Vektor erneut über eine Säule aufgereinigt. Der verdaute Vektor wurde zuvor mittels Agarose-Gelelektrophorese von herausgeschnittenen DNA-Teilen getrennt. Vektor und Insert wurden mittels T4-DNA Ligase bei 16 °C über Nacht ligiert. Hierfür wurden Insert und Vektor im Verhältnis 2:1 eingesetzt.

#### 5.5.2.3 Transformation von Bakterien

Die Bakterien (DH5α oder XL1Blue) wurden auf Eis aufgetaut. Zu 80 µl Bakterien wurden 100 ng DNA (Retransformation) bzw. 10 µl Ligationsansatz gegeben und vorsichtig mit diesen gemischt. Nach einer Inkubation für 30 Minuten auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden. Im weiteren Verlauf wurden die Bakterien erneut für 60 Sekunden auf Eis inkubiert, zuletzt in 900 µl LB-Medium aufgenommen und für 45 Minuten bei 37 °C vorsichtig geschüttelt. 100 µl der Suspension wurden mittels drei-Ösen-Ausstrich auf LB-Agar-Platten mit dem

---

erforderlichen Antibiotikum ausgestrichen. Bakterien, die Plasmide mit dem Mannoserezeptor enthielten, wurden für 40 Stunden bei 32 °C inkubiert, alle anderen für 16 Stunden bei 37 °C.

### **5.5.2.4 DNA Präparation aus Bakterienkulturen**

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem NucleoBond Xtra Midi Kit von Macherey-Nagel nach mitgeliefertem Protokoll. Für die Aufreinigung wurden jeweils 200–300 ml Bakterienkultur angeimpft.

### **5.5.2.5 *Site-directed mutagenesis***

Die Herstellung der chimären Rezeptoren aus Mannoserezeptor und Mannose-6-Phosphat-Rezeptor erfolgte mittels gerichteter Mutagenese mit Hilfe des *Q5 site-directed mutagenesis Kit* von NEB. Das durchgeführte Protokoll entsprach den Herstellerangaben.

## **5.6 Statistische Analyse**

Die Differenz zweier Mittelwerte wurde mittels Student T-Test auf Signifikanz getestet. Der Test wurde mit dem Programm Excel durchgeführt. Waren p-Werte kleiner als 0,05 (festgelegtes Signifikanzniveau), so lag statistische Signifikanz vor.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Mannosylierung von Peptiden führt zu erhöhter Aufnahme in BMDCs und zu einer effektiveren Kreuzpräsentation

#### 6.1.1 Ovalbumin und das mannosylierte Peptid werden spezifisch über den Mannoserezeptor in BMDCs aufgenommen

Die MR-vermittelte Aufnahme von Antigenen in BMDCs ist ein erster wichtiger Schritt im Rahmen der Kreuzpräsentation und somit Voraussetzung für eine effektive Aktivierung spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Burgdorf et al., 2007; Burgdorf et al., 2006).

Ob das Anhängen von Mannoseresten an Antigene zu einer verbesserten, spezifischen Aufnahme dieser Antigene über den Mannoserezeptor führt, wurde in einem ersten Experiment im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Hierfür wurden synthetische lange Peptide (SLPs) des Modellantigens Ovalbumin verwendet, welche über ein Lysin mit zwei Mannoseresten gekoppelt wurden (Abbildung 6-1). Die Synthese dieser Peptide erfolgte durch unseren Kooperationspartner Ramon Arens am *Leiden University Medical Center*. Es wurden sowohl SLPs mit dem OVA-spezifischen MHCI-Epitop als auch SLPs mit dem MHCII-Epitop synthetisiert. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Peptide ohne Mannosereste verwendet. Zusätzlich standen die MHCI-Peptide auch als Alexa647-gekoppelte Moleküle zur Verfügung, sodass ihre Aufnahme und ihre zelluläre Verteilung in BMDCs mittels fluoreszenz-basierter Methoden untersucht werden konnten (Abbildung 6-1).

MHCI-spezifisch:

K(M2)–LEQLESIINFEKLAAAAAK  
 LEQLESIINFEKLAAAAAK  
 K(M2)–LEQLESIINFEKLAAAAAK(C-Alexa647)  
 LEQLESIINFEKLAAAAAK(C-Alexa647)

MHCII-spezifisch:

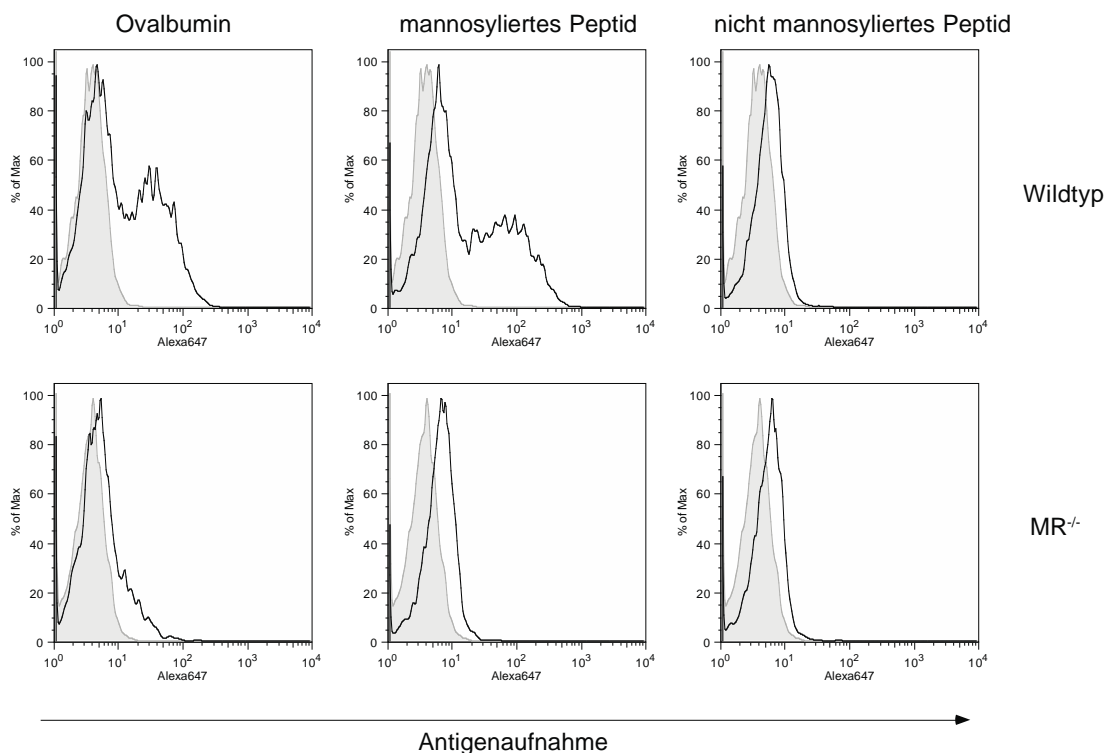
K(M2)–ESLKISQAVHAAHAEINEAGRAAAAAAK  
 ESLKISQAVHAAHAEINEAGRAAAAAAK

**Abbildung 6-1: Übersicht über die verwendeten OVA-spezifischen SLPs.**

K(M2): bis-mannosyliertes Lysin; C-Alexa647: Alexa647-gekoppeltes Cystein. Die exakten MHCI- und MHCII-Epitope sind unterstrichen.

Die MR-vermittelte Aufnahme, die intrazelluläre Verteilung sowie die Präsentation der SLPs wurden in Zusammenarbeit mit Arlette Paillard untersucht.

BMDCs von WT oder MR<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit OVA-Alexa647 oder den Alexa647-gekoppelten Peptiden bei 37 °C inkubiert und somit die Antigenaufnahme ermöglicht. Anschließend wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Wie in Abbildung 6-2 zu sehen ist, werden OVA und das mannosylierte Peptid sehr effektiv in MR-exprimierende Zellen aufgenommen, wohingegen das nicht mannosylierte Peptid kaum aufgenommen wird. Zellen, die keinen MR exprimieren, nehmen nur sehr geringe Mengen an OVA und Peptiden auf. Die Mannosylierung des Peptids erhöht also dessen Aufnahme in BMDCs, und dieser Prozess ist MR-abhängig.

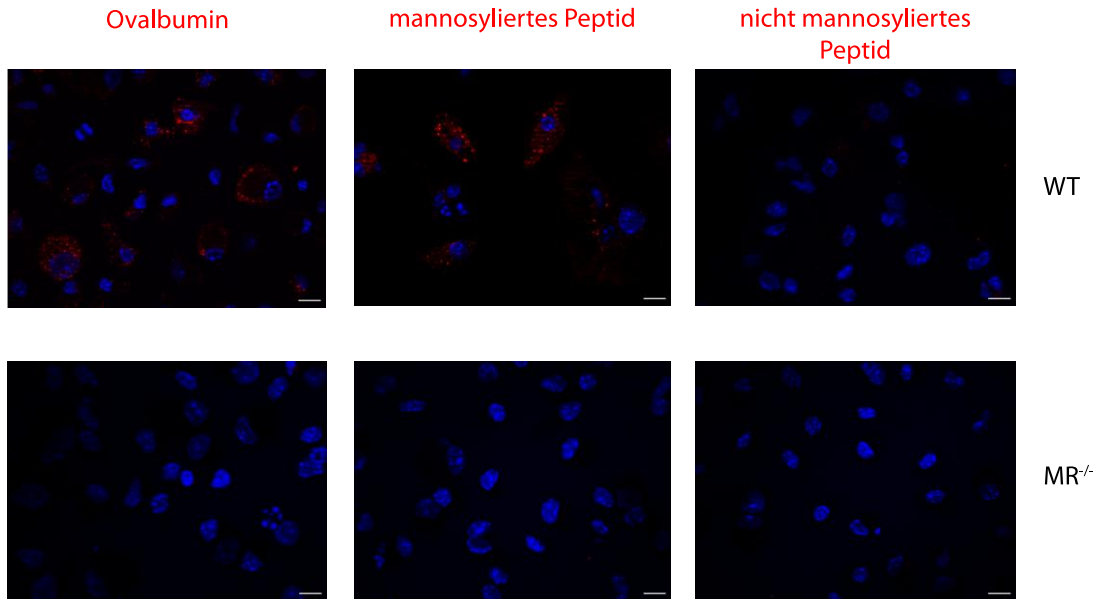


**Abbildung 6-2: Aufnahme von OVA und Peptiden in BMDCs.**

BMDCs von WT oder MR<sup>-/-</sup> Mäusen wurden in 24-Well-Platten ausplattiert und mit OVA-Alexa647 (250 ng/ml) oder den OVA-Peptiden (50 nM) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Grau hinterlegt: Zellen ohne Antigen. Die Abbildung zeigt repräsentative Ergebnisse von mindestens vier unabhängigen Experimenten.

Die MR-abhängige Aufnahme des mannosylierten Peptids in BMDCs konnte ferner mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden (Abbildung 6-3).

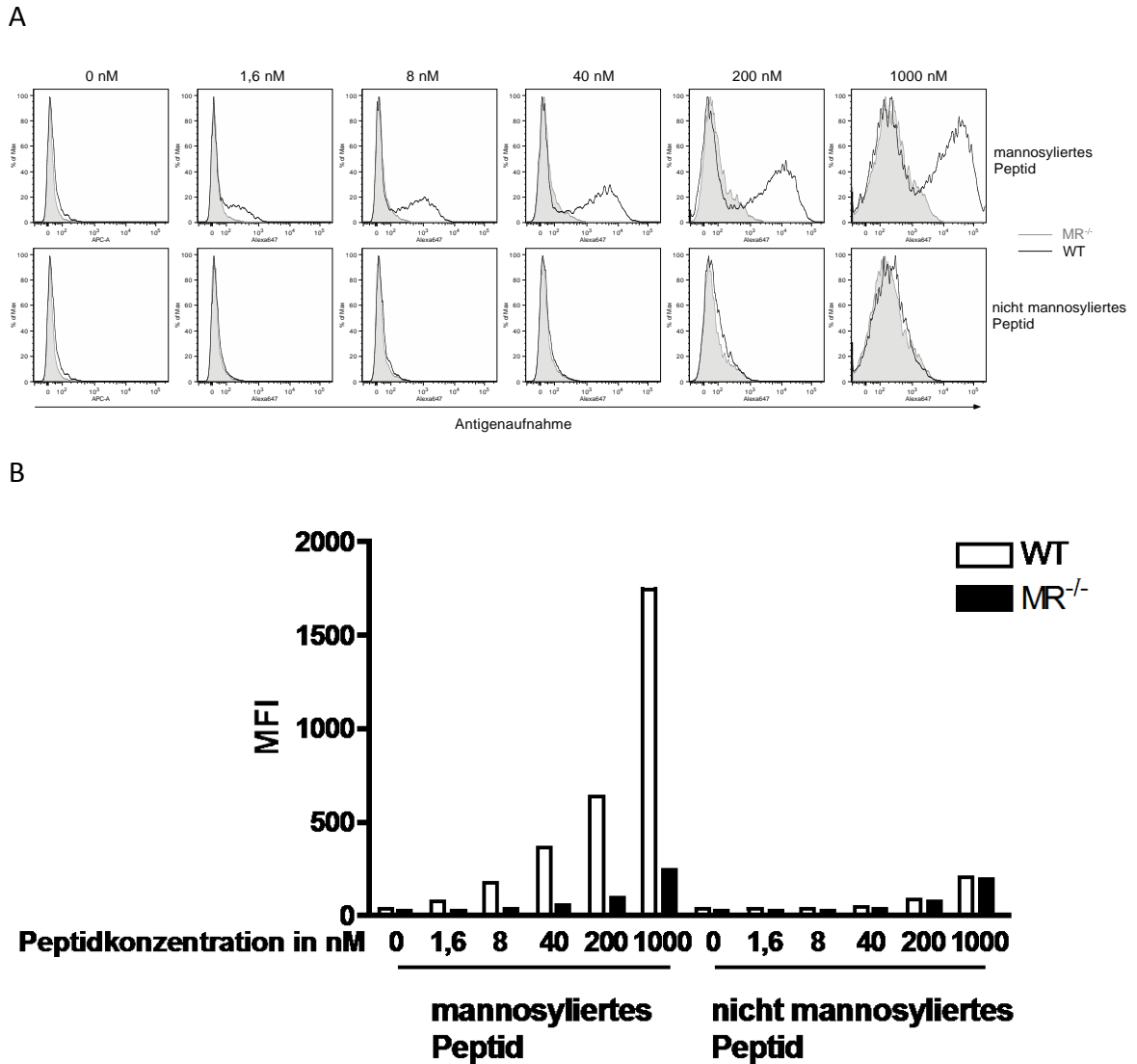




**Abbildung 6-3: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der MR-abhängigen Antigenaufnahme.**

WT oder MR<sup>-/-</sup> BMDCs wurden auf Deckgläschen ausplattiert und nach einer Stunde mit OVA-Alexa647 (250 ng/ml) oder den OVA-Peptiden (50 nM) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Dapi gefärbt. Der Größenbalken entspricht 10 µm. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Um die optimale Konzentration der Peptide für die Mannoserezeptor-vermittelte Aufnahme zu bestimmen, wurde eine Konzentrationsreihe der Alexa647-markierten Peptide hergestellt und die Aufnahme in WT oder MR<sup>-/-</sup> BMDCs mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Im Konzentrationsbereich von 1,6–1000 nM wird das mannosylierte Peptid deutlich besser in WT BMDCs aufgenommen als das nicht mannosylierte Peptid. Die Aufnahme ist für alle getesteten Konzentrationen abhängig von der MR-Expression, da MR<sup>-/-</sup> BMDCs kaum Antigen aufnehmen (Abbildung 6-4). Für alle weiteren Versuche wurden die Peptide 50–100 nM eingesetzt, da bei dieser Konzentration der Unterschied in der Aufnahme des mannosylierten und des nicht mannosylierten Peptids sehr deutlich und gleichzeitig die MR-unabhängige Aufnahme (grau hinterlegt) gering ist. Abbildung 6-4 B zeigt die Quantifizierung der Peptidaufnahme, bei der die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen im Alexa647-Kanal bestimmt wurde.



**Abbildung 6-4: Konzentrationsreihe für die Peptidaufnahme in WT und MR<sup>-/-</sup> BMDCs.**

**A** BMDCs von WT oder MR<sup>-/-</sup> Mäusen wurden für 15 Minuten bei 37 °C mit steigenden Konzentrationen der Alexa647-gekoppelten Peptide inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Schwarze Linie: WT Zellen; grau hinterlegt: MR<sup>-/-</sup> Zellen.

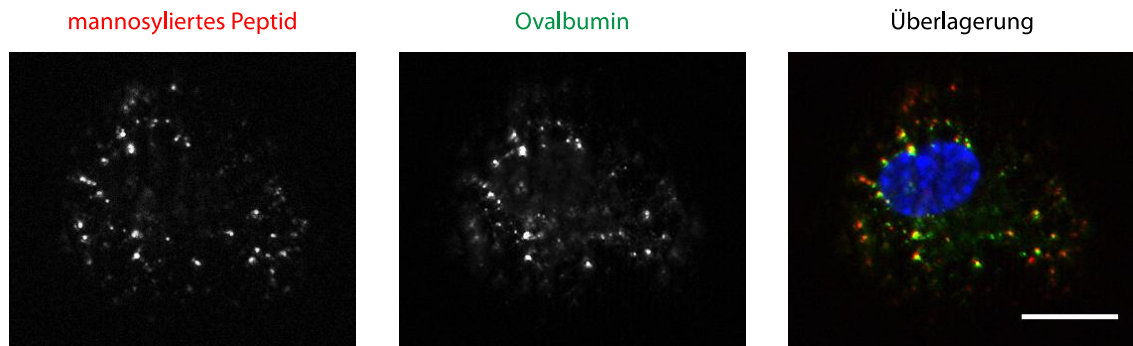
**B** Quantifizierung der Ergebnisse aus A; die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen im Alexa647-Kanal wurde bestimmt.

Das Experiment wurde drei Mal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

### 6.1.2 OVA und das mannosylierte Peptid werden über den MR in die gleichen Kompartimente – stabile frühe Endosomen – geleitet

Abhängig vom Aufnahmemechanismus werden Antigene in definierte zelluläre Kompartimente geleitet. Wie in früheren Studien gezeigt wurde, ist für eine effektive MR-vermittelte Kreuzpräsentation eine Antigenaufnahme in stabile früh-

endosomale Kompartimente erforderlich (Burgdorf et al., 2007; Burgdorf et al., 2008). Einen ersten Hinweis für eine entsprechende Aufnahme des mannosylierten Peptids in stabile frühe Endosomen lieferte folgender Versuch: BMDCs wurden gleichzeitig mit OVA und dem mannosyliertem Peptid inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei waren die beiden Antigene mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekennzeichnet, sodass im Fluoreszenzmikroskop ihre jeweilige subzelluläre Lokalisation nachvollzogen werden konnte. Wie die Überlagerung der beiden Signale zeigt, befinden sich die Antigene nach Aufnahme über den MR in identischen intrazellulären Kompartimenten (Abbildung 6-5).

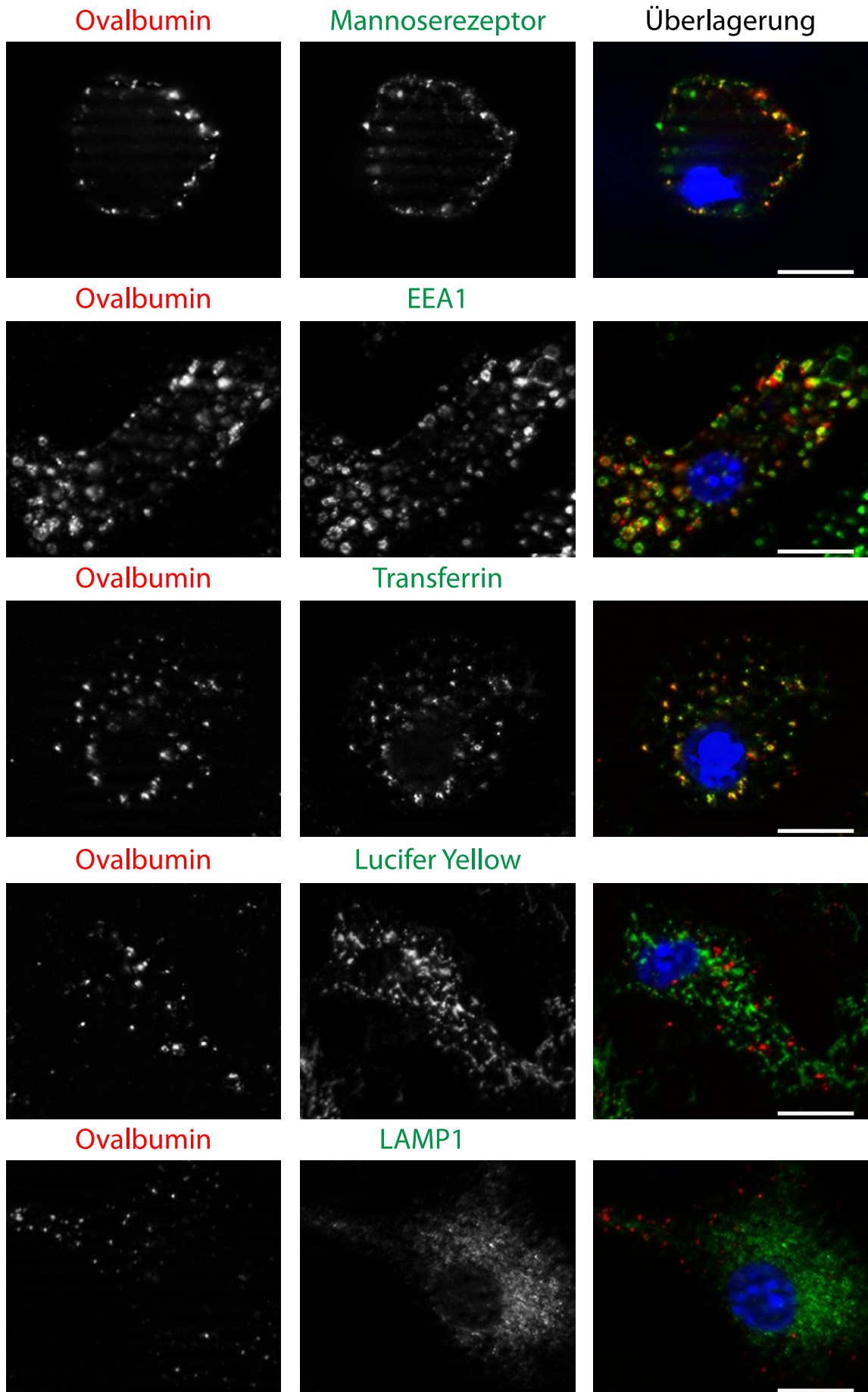


**Abbildung 6-5: OVA und das mannosylierte Peptid befinden sich in den gleichen intrazellulären Kompartimenten.**

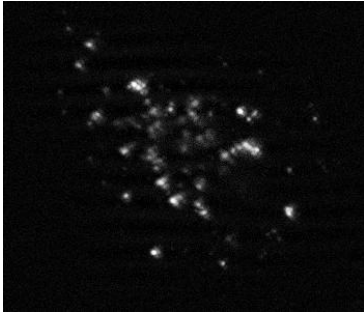
BMDCs wurden auf Deckgläschen ausplattiert. Nach Absetzen der Zellen folgte eine Inkubation mit OVA-Alexa488 (500 ng/ml) oder dem mannosylierten Peptid-Alexa647 (50 nM) für 15 Minuten bei 37 °C und anschließend für 20 Minuten mit frischem Medium. Zuletzt wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Dapi gefärbt. Der Größenbalken entspricht 10 µm. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Um die antigenhaltigen Kompartimente genauer zu charakterisieren, wurde im Folgenden eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen durchgeführt. WT BMDCs wurden auf Deckgläschen ausplattiert und bekamen die Gelegenheit, OVA-Alexa647 oder das Alexa647-gekoppelte mannosylierte Peptid zu internalisieren. Die Zellen wurden daraufhin fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen diverse endosomale und lysosomale Marker gefärbt. Der Versuch bestätigte, dass das mannosylierte Peptid – genau wie OVA – in Organellen aufgenommen wird, die positiv für den MR und das *Early Endosome Antigen 1* (EEA1, ein früh-endosomaler Marker) sind (Abbildung 6-6). Weiterhin werden OVA und das mannosylierte Peptid in die gleichen Kompartimente geleitet wie das Glykoprotein Transferrin

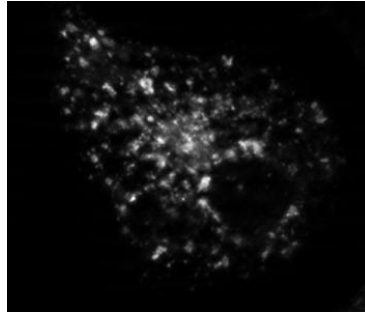
(Abbildung 6-6), welches erwiesenermaßen in stabile frühe Endosomen aufgenommen wird (Burgdorf et al., 2008). Ebenfalls wurde mit diesem Versuch eine Kolo-kalisation von OVA und dem mannosylierten Peptid mit dem Pinozytosemarker Lucifer Yellow, welcher nach seiner Aufnahme in Lysosomen gelangt, und dem lysosomalen Marker LAMP1 (*Lysosomal-associated membrane protein 1*) ausgeschlossen (Abbildung 6-6).



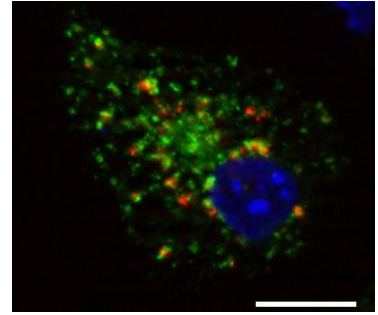
mannosyliertes Peptid



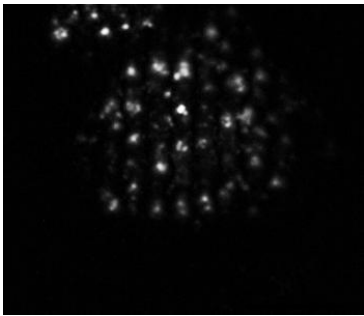
Mannoserezeptor



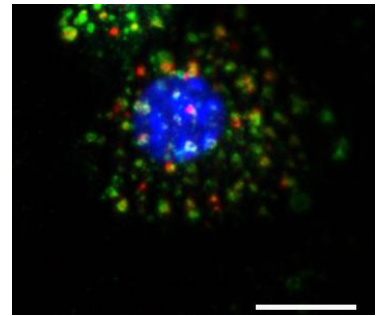
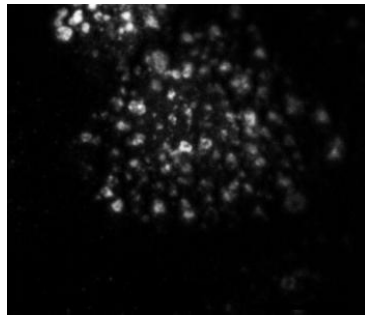
Überlagerung



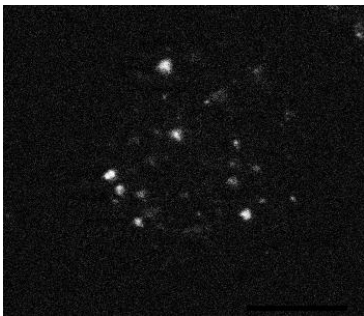
mannosyliertes Peptid



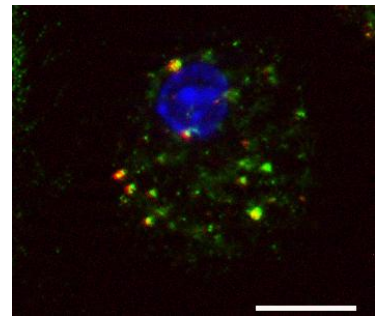
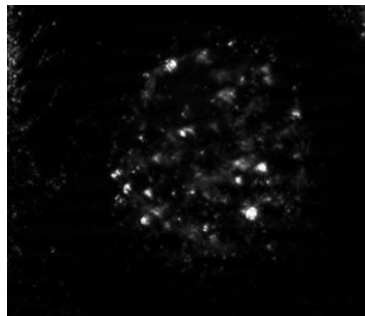
EEA1



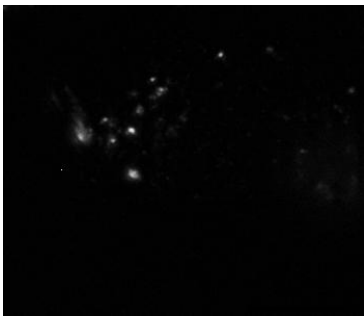
mannosyliertes Peptid



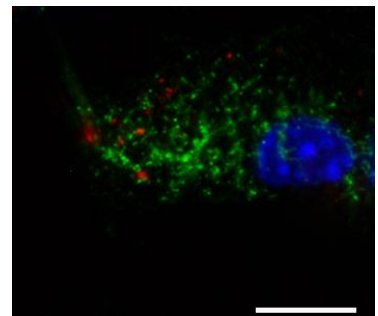
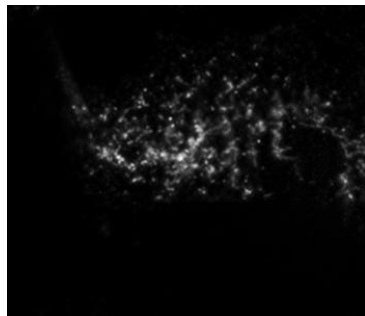
Transferrin



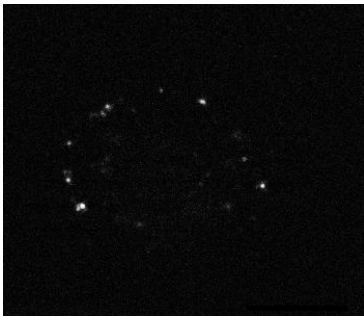
mannosyliertes Peptid



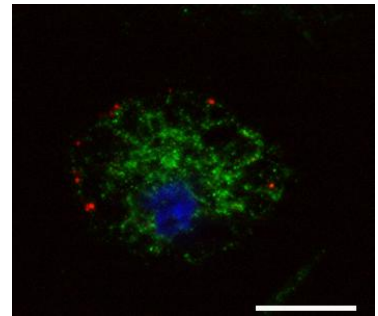
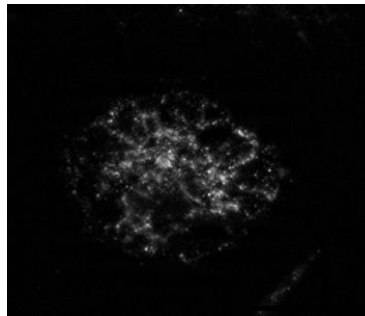
Lucifer Yellow



mannosyliertes Peptid



LAMP1





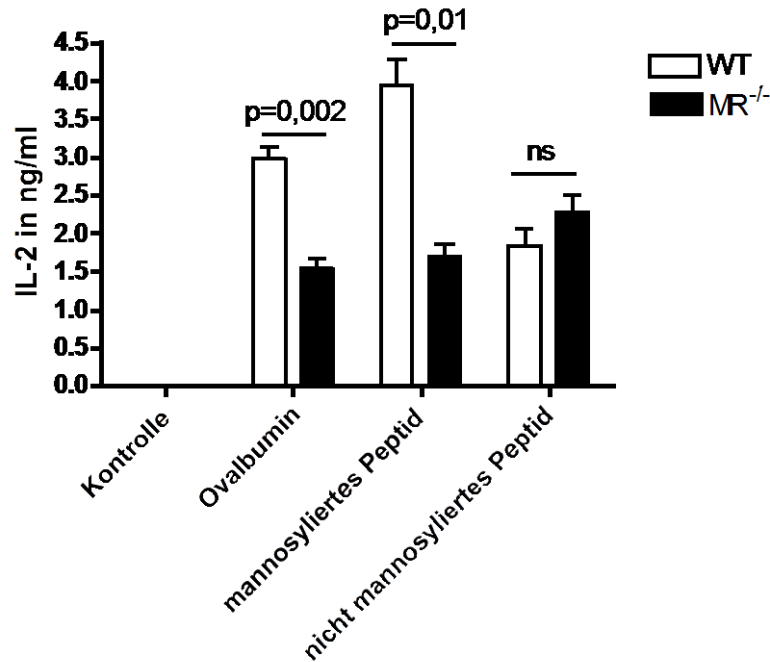
**Abbildung 6-6: OVA und das mannosylierte Peptid werden über den MR in stabile frühe Endosomen geleitet.**

Immunfluoreszenzmikroskopie von BMDCs, die für 15 Minuten mit Alexa647-gekoppeltem Ovalbumin (250 ng/ml) oder Alexa647-gekoppeltem mannosylierten Peptid (50 nM) und Transferrin-Alexa488 (5 µg/ml) oder Lucifer Yellow (0,3 mg/ml) inkubiert wurden. Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen den Mannoserezeptor, EEA1, LAMP1 oder Lucifer Yellow gefärbt. Zellkerne wurden mit Dapi sichtbar gemacht. Der Größenbalken entspricht 10 µm. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

**6.1.3 Das mannosylierte Peptid wird effektiver kreuzpräsentiert**

Nachdem die Mannoserezeptor-abhängige Aufnahme des mannosylierten Peptids in für die Kreuzpräsentation spezialisierte Kompartimente in BMDCs experimentell bestätigt wurde, sollte weiterhin die Kreuzpräsentation des mannosylierten und des nicht mannosylierten Peptids in Abhängigkeit des Mannoserezeptors untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden BMDCs von WT oder MR<sup>-/-</sup> Mäusen mit löslichem OVA oder den OVA-Peptiden inkubiert und ihre Fähigkeit zur Aktivierung von OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. Die Aktivierung der T-Zellen wurde zunächst anhand ihrer IL-2-Sekretion ins Medium quantifiziert. Die absolute IL-2-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt.

OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen sezernieren signifikant mehr IL-2 nach Kultivierung mit WT BMDCs, welche mit OVA oder dem mannosylierten Peptid inkubiert wurden, als CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Kultivierung mit MR<sup>-/-</sup> BMDCs mit den gleichen Antigenen. BMDCs, die mit dem nicht mannosylierten Peptid inkubiert wurden, sind nicht in der Lage, CD8<sup>+</sup> T-Zellen effizient zu aktivieren (Abbildung 6-7).



**Abbildung 6-7: IL-2-Antwort von spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Aktivierung durch OVA- oder Peptid-beladene BMDCs.**

WT oder MR<sup>-/-</sup> BMDCs wurden ausplattiert und 60 Minuten später für drei Stunden bei 37 °C mit OVA oder den OVA-SLPs inkubiert. CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus der Milz einer OTI Maus gewonnen und mit den BMDCs über Nacht kultiviert. Nach ca. 18 Stunden wurde die IL-2-Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Das Experiment wurde drei Mal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte von Triplikaten ± SEM, p-Werte wurden mittels Student T-Test bestimmt, p-Werte <0,05 werden als statistisch signifikant angesehen, ns: nicht signifikant.

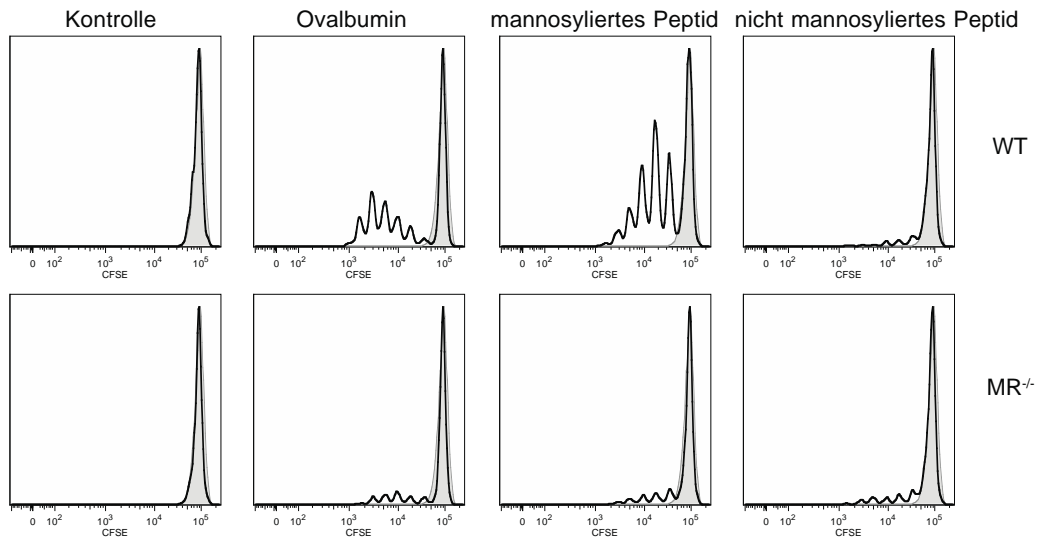
Im Zuge ihrer Aktivierung durch BMDCs werden T-Zellen neben der Produktion von IL-2 auch zur Proliferation angeregt. Im Folgenden wurde die Kreuzpräsentation von OVA und den OVA-spezifischen Peptiden anhand der Proliferationsrate der aktivierten T-Zellen untersucht. Mit diesem Ziel wurden OTI T-Zellen vor Kokultur mit BMDCs mit CFSE gefärbt, einem Farbstoff, der bei der Zellteilung gleichmäßig auf beide Tochterzellen verteilt wird. Die daraus resultierende sequenzielle Halbierung der Fluoreszenzintensität kann im Durchflusszytometer bestimmt werden.

Übereinstimmend mit der erhöhten IL-2-Produktion proliferieren OTI T-Zellen signifikant besser nach Aktivierung durch WT BMDCs mit dem mannosylierten Peptid im Vergleich zur Aktivierung durch WT BMDCs mit dem nicht mannosylierten Peptid. Durch MR<sup>-/-</sup> BMDCs hingegen werden die T-Zellen nicht zur Proliferation angeregt (Abbildung 6-8).

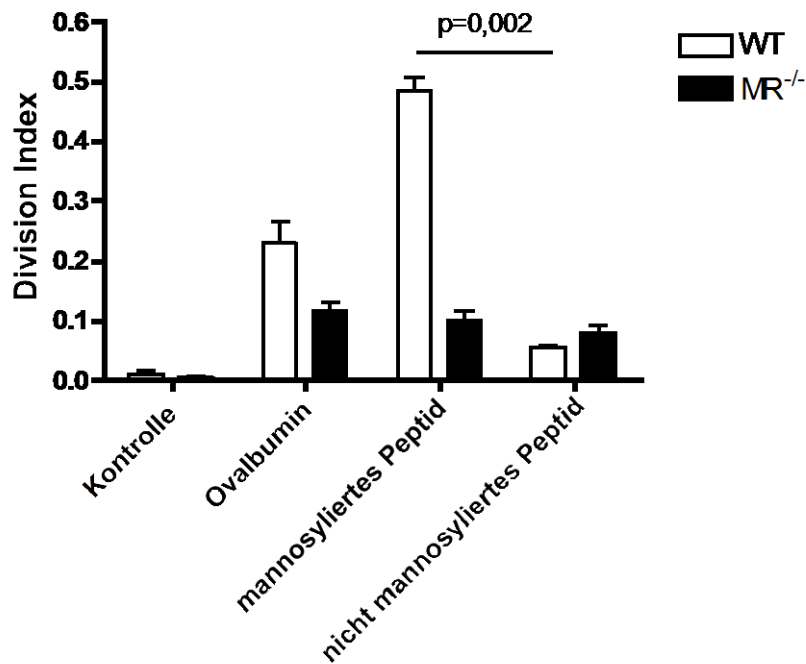


Zusammengefasst wird das mannosylierte Peptid nicht nur deutlich besser von MR-exprimierenden BMDCs aufgenommen, es wird *in vitro* auch effektiver kreuzpräsentiert als das nicht mannosylierte Peptid.

A



B



**Abbildung 6-8: Proliferation von aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen.**

BMDCs wurden für drei Stunden mit den entsprechenden Antigenen beladen und für 72 Stunden mit CFSE-gefärbten OTI T-Zellen kokultiviert. Die Proliferation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde daraufhin mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Kontrolle: BMDCs ohne Antigen. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

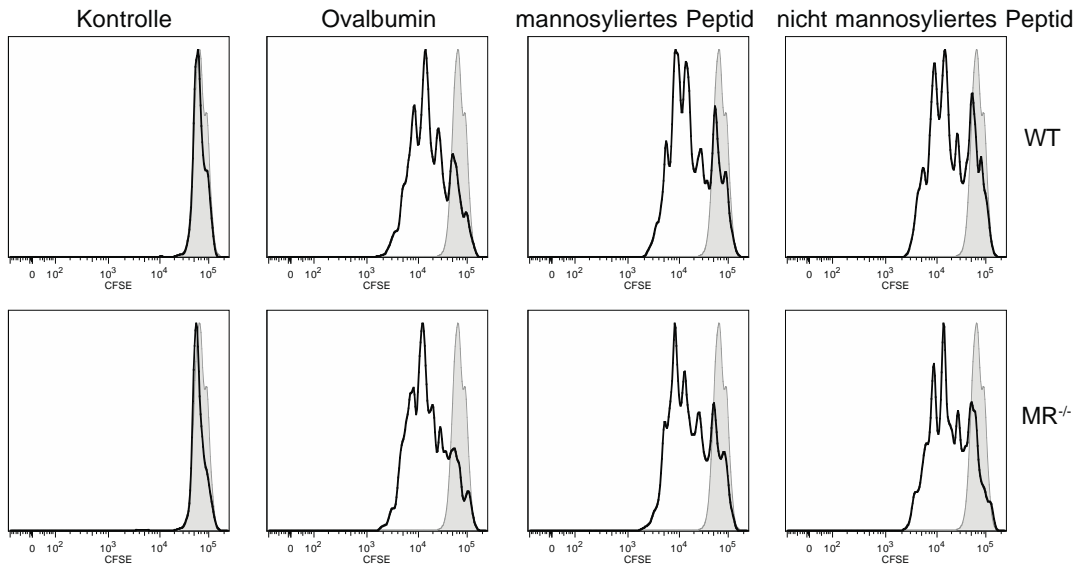
A Histogramme von repräsentativen Proben, grau hinterlegt: T-Zellen, die nicht mit BMDCs kokultiviert wurden.

B Das Diagramm zeigt den Division Index (mittlere Anzahl an Zellteilungen einer Zelle), es sind Mittelwerte von Triplikaten  $\pm$  SEM abgebildet, p-Werte wurden bestimmt mittels Student T-Test.

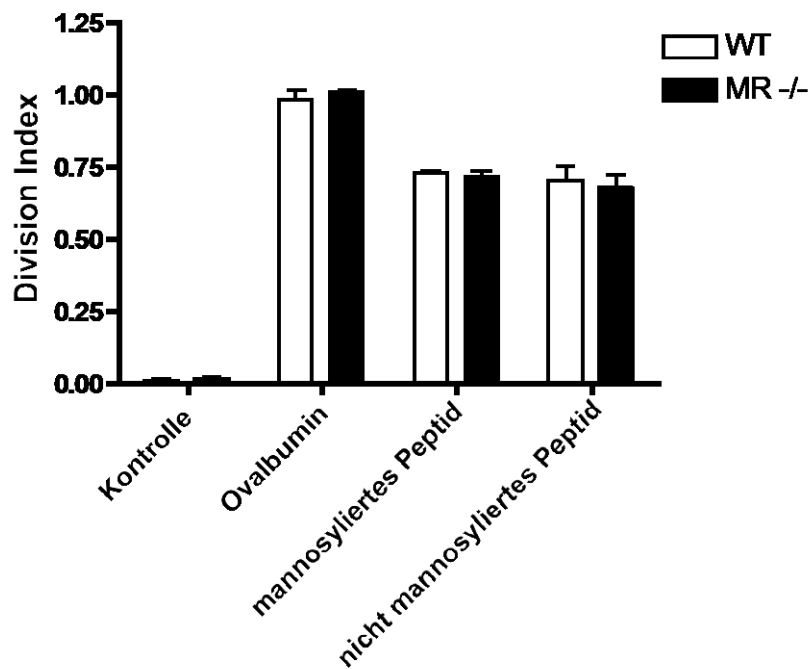
Bekanntermaßen entscheidet der Mechanismus, über den ein Antigen in die Zelle gelangt, über die Art der Antigenpräsentation. Die Präsentation von löslichem OVA auf MHCII-Molekülen (zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen) erfolgt unabhängig vom Mannoserezeptor, stattdessen werden Antigene für diesen Prozess über Pinozytose zur Verfügung gestellt (Burgdorf et al., 2007).

Um zu bestätigen, dass die Mannosylierung der Peptide und die verbesserte Aufnahme über den Mannoserezeptor keinen Effekt auf die MHCII-Präsentation haben, wurden MR-exprimierende oder MR-defiziente BMDCs mit dem mannosylierten oder dem nicht mannosylierten MHCII-SLP beladen und zusammen mit OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (OTII Zellen) kultiviert. Nach drei Tagen wurde die Proliferation der T-Zellen untersucht (Abbildung 6-9).

A



B



**Abbildung 6-9: Präsentation von OVA und den OVA-Peptiden auf MHCII-Molekülen zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgt unabhängig vom MR.**

BMDCs von WT oder MR<sup>-/-</sup> Mäusen wurden für drei Stunden mit den entsprechenden Antigenen beladen und anschließend mit CFSE-gefärbten CD4<sup>+</sup> OTII T-Zellen kokultiviert. Nach 72 Stunden wurde die Proliferation der T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

A Histogramme von repräsentativen Proben, grau hinterlegt: T-Zellen, die nicht mit BMDCs kultiviert wurden.

B Mittelwerte von Division Indices in Triplikaten ± SEM, p-Werte wurden mittels Student T-Test bestimmt.

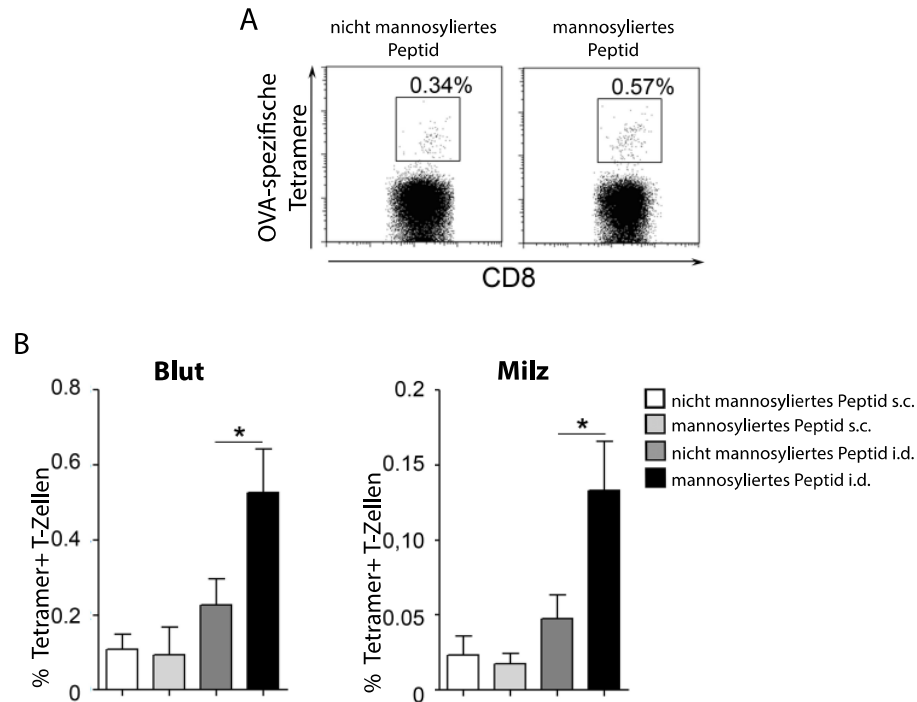
Wie in diesem Versuch bestätigt wurde, erfolgt die Präsentation von OVA, dem mannosylierten Peptid und dem nicht mannosylierten Peptid auf MHCII-Molekülen tatsächlich unabhängig vom Mannoserezeptor. Sowohl OVA als auch die beiden Peptide werden effektiv auf MHCII-Molekülen präsentiert und sind in der Lage, spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Diese Aktivierung erfolgt gleichermaßen durch WT und MR<sup>-/-</sup> BMDCs (Abbildung 6-9).

Die Mannosylierung der Peptide hat folglich einen spezifischen Effekt auf die Antigenkruzpräsentation, die Präsentation auf MHCII-Molekülen wird dagegen nicht beeinflusst.

#### **6.1.4 Mannosylierung von synthetischen langen Peptiden führt auch *in vivo* zu einer erhöhten Kreuzpräsentation**

Zuletzt wurde in diesem Projekt der Effekt der Mannosylierung auf die *in vivo* Kreuzpräsentation der Peptide untersucht. Zu diesem Zweck wurden C57BL/6 Mäuse mit den Peptiden vakziniert. Sieben Tage später wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut und Splenozyten aus den Mäusen isoliert und mit OVA-spezifischen Tetrameren und einem  $\alpha$ CD8-Antikörper gefärbt. Alle *in vivo* Experimente wurden von Ramon Arens vom *Leiden University Medical Center* durchgeführt.

Mäuse, die intradermal mit dem mannosylierten Peptid geimpft wurden, haben eine signifikant größere Anzahl an OVA-spezifischen zytotoxischen T-Zellen als Mäuse, die mit dem nicht mannosylierten Peptid geimpft wurden. Dies gilt gleichermaßen für CD8<sup>+</sup> mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wie für CD8<sup>+</sup> Splenozyten (Abbildung 6-10). Das mannosylierte Peptid wird demnach auch *in vivo* effektiver kreuzpräsentiert als das nicht mannosylierte Peptid. Diese verbesserte *in vivo* Kreuzpräsentation wurde allerdings nur beobachtet, wenn die Peptide intradermal appliziert wurden, jedoch nicht bei subcutaner Verabreichung (Abbildung 6-10).



**Abbildung 6-10: *In vivo* T-Zellproliferation als Antwort auf die Vakzinierung mit OVA-spezifischen Peptiden.**

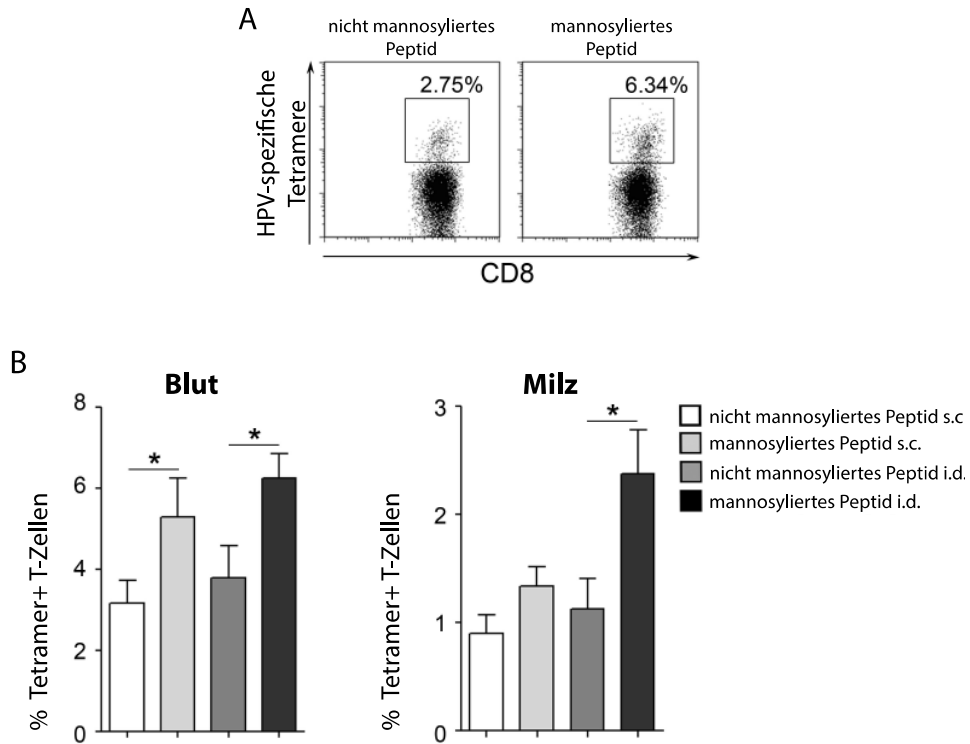
C57BL/6 Mäuse wurden mit dem mannosylierten oder dem nicht mannosylierten Peptid zusammen mit CpG (20 µg/Maus) als Adjuvans vakziniert. 75 µg Peptid/Maus wurden in 200 µl oder 50 µl PBS gelöst und subcutan (s.c.) beziehungsweise intradermal (i.d.) injiziert. Sieben Tage nach der Impfung wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) und Splenozyten aus den Mäusen isoliert und mit OVA-spezifischen Tetrameren und einem αCD8-Antikörper gefärbt. Die Proben wurden in einem BD LSRII Durchflusszytometer eingelesen und mittels FlowJo Software analysiert.

**A** Repräsentative DotPlots von OVA-spezifischen Tetramer<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen aus dem Blut.

**B** Die Balken zeigen Mittelwerte ± SEM der Prozentzahl von OVA-spezifischen Tetramer<sup>+</sup> Zellen innerhalb der gesamten CD8<sup>+</sup> Zellpopulation. Das Diagramm zeigt zusammengefasste Daten aus zwei unabhängigen Experimenten, n=9-10. \* p-Wert < 0,05, die Signifikanz wurde mittels Student T-Test ermittelt. Die Experimente wurden von Ramon Arens durchgeführt.

Hinsichtlich der Mannosylierung von Impfstoffen zur Verbesserung ihrer Effektivität ist vor allem interessant, ob auch die Mannosylierung von weiteren (klinisch relevanten) SLPs zu einer effektiveren *in vivo* Kreuzpräsentation führt. Vor diesem Hintergrund wurde ein synthetisches langes Peptid für das humane Papillomavirus HPV16 E7<sub>43-63</sub> (GQAEPDRAHYNIVTFCCKCDS) mannosyliert und die spezifische *in vivo* T-Zell-Antwort von Mäusen untersucht, die mit diesem Peptid vakziniert wurden. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie oben bereits für die OVA-Peptide beschrieben.

Dieser Versuch zeigt für ein Peptid-basiertes Vakzin, welches bereits in klinischen Studien der Phase II Anwendung findet (van Poelgeest et al., 2013), den positiven Effekt der Mannosylierung auf die *in vivo* Kreuzpräsentation. Sowohl im Blut als auch in der Milz der Mäuse sind nach Vakzinierung mit dem mannosylierten HPV-Peptid signifikant mehr spezifische zytotoxische T-Zellen vorhanden als nach Vakzinierung mit dem nicht mannosylierten Peptid (Abbildung 6-11).



**Abbildung 6-11: *In vivo* CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort auf HPV-spezifische Peptide.**

C57BL/6 Mäuse wurden mit dem mannosylierten oder dem nicht mannosylierten HPV-Peptid zusammen mit CpG (20 µg/Maus) als Adjuvans vakziniert. Die Peptide wurden subcutan (s.c.) oder intradermal (i.d.) injiziert. Sieben Tage nach der Vakzinierung wurden PBMCs und Splenozyten aus den Mäusen isoliert und mit einem αCD8-Antikörper und dem HPV-spezifischen H-2D<sup>b</sup> E7<sub>49-57</sub> Tetramer gefärbt. Die Proben wurden im Durchflusszytometer eingelesen und mittels FlowJo Software analysiert.

**A** Repräsentative Dot Plots von HPV-spezifischen Tetramer<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen.

**B** Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± SEM der Prozentzahl an HPV-spezifischen CD8<sup>+</sup> Zellen innerhalb der gesamten CD8<sup>+</sup> Zellpopulation, es enthält zusammengefasste Daten aus zwei unabhängigen Experimenten, n=9–10. \* p-Wert < 0,05 nach Student T-Test. Die Experimente wurden von Ramon Arens durchgeführt.

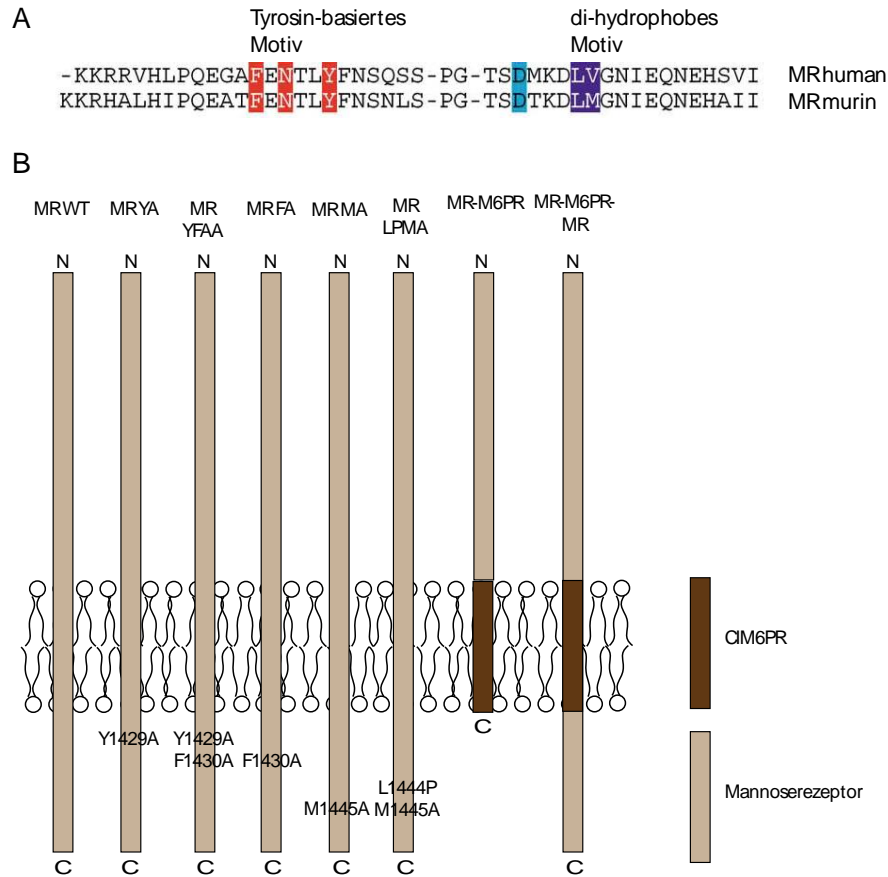
## 6.2 Molekulare Mechanismen der Mannoserezeptor-Internalisierung

Wie oben gezeigt, stellt der Mannoserezeptor auf Grund seiner zentralen Funktion bei der Antigenkruzpräsentation, speziell durch die zielgerichtete Antigenaufnahme in stabile frühe Endosomen, ein wichtiges Ziel zur Verbesserung von Impfstoffen dar. Die exakten molekularen Mechanismen der Clathrin-vermittelten Mannoserezeptor-Internalisierung, insbesondere das Internalisierungs- und Sortier-Signal sowie das verantwortliche Adapterprotein, sind dabei allerdings bisher nur unzureichend erforscht.

Der murine Mannoserezeptor besitzt in seiner zytoplasmatischen Domäne zwei bekannte Internalisierungssignale, ein Tyrosin-basiertes Endozytosemotiv (FENTLY) und ein di-hydrophobes Motiv (LM) (Abbildung 6-12 A) (East and Isacke, 2002). Diese Motive sind bereits von anderen Rezeptoren bekannt und vermitteln dort die Interaktion mit Adapterproteinen und die Rekrutierung an Clathrin-umhüllte Einbuchtungen. Auch das Phenylalanin direkt nach der FENTLY-Sequenz scheint eine wichtige Funktion zu haben, gemeinsam mit dem Tyrosin bildet es ein di-aromatisches Motiv (Schweizer et al., 2000).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde nun die Bedeutung dieser Motive für die MR-vermittelte OVA-Aufnahme untersucht. Zu diesem Zweck wurden zunächst Expressionsvektoren für das MR-Gen mit gezielten Punktmutationen im zytoplasmatischen Teil des MR hergestellt. Um zusätzlich die Funktion der Transmembrandomäne (TM-Domäne) des MR zu untersuchen, wurde mittels gerichteter Mutagenese die TM-Domäne des MR gegen die des (*cation-independent*) Mannose-6-Phosphatrezeptors ((CI)M6PR) ausgetauscht. Ein weiterer verwendeter chimärer Rezeptor enthält die extrazelluläre Domäne des Mannoserezeptors und die TM-Domäne des CIM6PR, aber keine zytoplasmatische Domäne. Ein Schema der generierten MR-Konstrukte ist in Abbildung 6-12 B zu sehen.





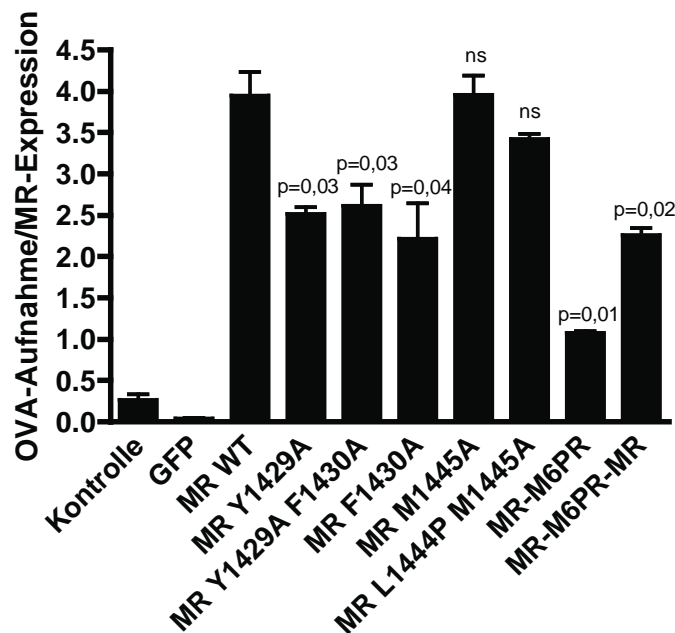
**Abbildung 6-12: Untersuchte Mannoserezeptormutanten und chimäre Rezeptoren.**

- A** Aminosäure (AS)-Sequenz der zytoplasmatischen Domänen des humanen und murinen MR mit den relevanten Endozytosemotiven. Die Aminosäuren sind dem Einbuchstabencode entsprechend dargestellt. Verändert aus (East and Isacke, 2002).
- B** N- und C-Termini sind mit den entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet. Die Aminosäuren sind nach dem Einbuchstabencode benannt, die Zahlen beschreiben die Stelle der mutierten AS vom Startcodon aus. Beispiel Y1429A: das Tyrosin an Stelle 1429 wurde zu einem Alanin mutiert. CIM6PR: (*Cation-independent*) Mannose-6-Phosphatrezeptor.

### 6.2.1 Das di-aromatische Endozytosesignal im zytoplasmatischen Teil des MR ist für die OVA-Aufnahme von Bedeutung

Da BMDCs sich im Allgemeinen äußerst schlecht transfizieren lassen, insbesondere nicht mit einem so großen Molekül wie dem Mannoserezeptor, wurden zunächst Hek293T Zellen als Modellsystem eingesetzt. Die Zellen wurden transient transfiziert und 40–48 Stunden nach der Transfektion wurde die MR-vermittelte Aufnahme von OVA-Alexa647 untersucht. Um trotz möglicher Unterschiede in der Transfektionseffizienz der verschiedenen Konstrukte die OVA-Aufnahme dennoch vergleichen zu können, wurden die Zellen anschließend fixiert, permeabilisiert

und mit einem  $\alpha$ MR-Antikörper gefärbt, sodass für jede Probe die OVA-Aufnahme zur MR-Expression normalisiert werden konnte (Abbildung 6-13).



**Abbildung 6-13: OVA-Aufnahme in Hek Zellen durch verschiedene MR-Mutanten.**

Hek293T Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die angezeigten MR-Mutanten oder für das *green fluorescent protein* (GFP) transfiziert und nach ca. 48 Stunden mit OVA-Alexa647 für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Transfektionseffizienz wurde mittels intrazellulärer Antikörperfärbung bestimmt. Die MFI aller MR<sup>+</sup> Zellen im Alexa647- und FITC-Kanal (MR-Expression) wurden mit FlowJo berechnet und die OVA-Aufnahme zur MR-Expression normalisiert. Das Diagramm zeigt Mittelwerte von Triplikaten  $\pm$  SEM. Kontrolle: untransfizierte Zellen, p-Werte beziehen sich auf die jeweilige Probe im Vergleich zum MR WT und wurden mittels Student T-Test bestimmt, ns: nicht signifikant. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Die Transfektion von Hek Zellen mit MR-DNA befähigt die Zellen zur OVA-Aufnahme. Da Zellen, die mit GFP-DNA transfiziert wurden, kein OVA aufnehmen, ist die OVA-Aufnahme kein der Transfektion geschuldetes Artefakt, sondern ein spezifischer Effekt des Mannoserezeptors. Alaninsubstitution des Tyrosin oder des Phenylalanin aus dem di-aromatischen Internalisierungsmotiv verursacht eine signifikant verminderte MR-vermittelte OVA-Aufnahme. Punktmutationen des dihydrophoben Internalisierungssignals (L1444P, M1445A) haben im Gegensatz dazu keinen signifikanten Effekt auf die Antigenaufnahme (Abbildung 6-13).

Durch Austausch der TM-Domäne des MR mit der TM-Domäne des Mannose-6-Phosphatrezeptors konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch sie eine wichtige Funktion bei der OVA-Aufnahme besitzt. Wird zusätzlich dazu der

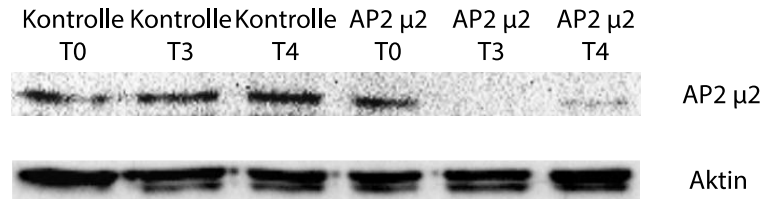
zytoplasmatische Teil des MR entfernt, ist die OVA-Aufnahme fast vollständig beeinträchtigt (Abbildung 6-13). Zusammengefasst besitzt also sowohl die TM-Domäne als auch die zytoplasmatische Domäne des MR eine wichtige Funktion bei der Internalisierung, besonders relevant ist hierbei das di-aromatische Endozytosesignal (YF).

### **6.2.2 AP2 spielt eine Rolle bei der MR-vermittelten OVA-Aufnahme**

Für die Internalisierung von Rezeptoren im Zuge der Clathrin-vermittelten Endozytose sind Adapterproteine vonnöten, welche den Rezeptor mit Clathrin verbinden (Robinson, 2004; Traub, 2003). Hierbei entscheidet wahrscheinlich das verwendete Adapterprotein darüber, in welche Kompartimente ein Ligand aufgenommen wird (Lakadamyali et al., 2006). Da das Adapterprotein AP2 die Internalisierung des Transferrinrezeptors vermittelt (Motley et al., 2003) und OVA sowie Transferrin bekanntermaßen in die gleichen Kompartimente geleitet werden (Burgdorf et al., 2008), wurde in dieser Arbeit die Bedeutung von AP2 bei der MR-vermittelten OVA-Aufnahme untersucht.

Wie oben gezeigt wurde, ist das di-aromatische Motiv (YF) im zytoplasmatischen Schweif des MR für die Internalisierung ausschlaggebend. Da die  $\mu$ 2-Untereinheit von AP2 für die Interaktion mit Tyrosin-basierten Signalen verantwortlich ist (Ohno et al., 1995), wurde diese für die folgenden Versuche mittels siRNA herunterreguliert und der Effekt auf die MR-abhängige OVA-Aufnahme ermittelt.

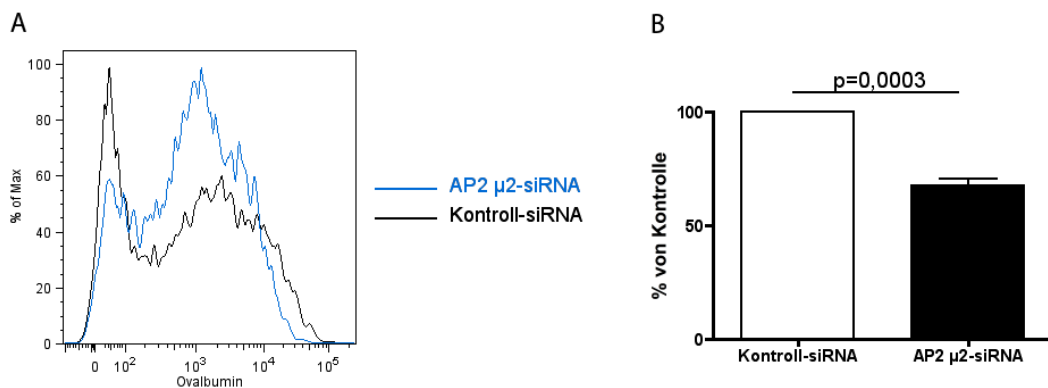
Um den Zeitpunkt mit der geringsten AP2  $\mu$ 2-Expression nach der siRNA-Elektroporation zu bestimmen, wurde zunächst eine Zeitreihe (Tag null, drei und vier) durchgeführt. An Tag drei nach der Elektroporation ist die AP2  $\mu$ 2-Expression fast vollständig gehemmt, nach weiteren 24 Stunden ist wieder mehr Protein in den Zellen vorhanden (Abbildung 6-14). Auf Grundlage dieser Zeitreihe wurden die BMDCs in den folgenden Versuchen mit AP2  $\mu$ 2-Knockdown immer an Tag drei nach der Elektroporation verwendet.



**Abbildung 6-14: Zeitreihe für siRNA-Knockdown von AP2 μ2.**

BMDCs wurden mit 10 μg siRNA elektroporiert. An Tag null, drei und vier wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot das AP2 μ2-Expressionslevel untersucht. Kontrollzellen wurden mit Luciferase-siRNA elektroporiert. Um die gleichmäßige Beladung des SDS-Gels nachzuweisen, wurde der Blot mit einem αAktin-Antikörper gefärbt. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Wie in Abbildung 6-15 zu sehen, nehmen BMDCs ohne AP2 μ2 weniger OVA auf als die Kontrollzellen. Die Berechnung der MFI von OVA<sup>+</sup> Zellen ergibt eine Reduktion der Fluoreszenzintensität von ca. 30% im Vergleich zu den Kontrollzellen. Das Adapterprotein AP2 und speziell seine μ2-Untereinheit spielt demnach eine Rolle bei der MR-vermittelten OVA-Aufnahme.



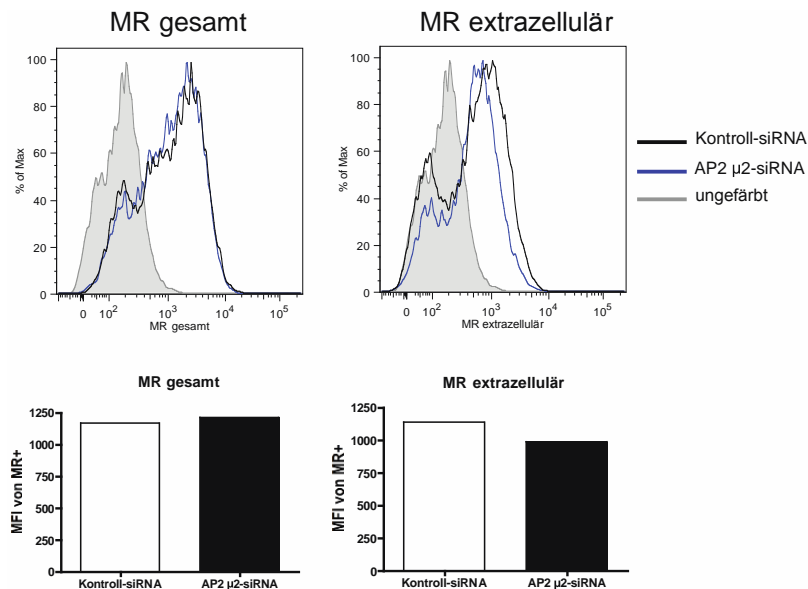
**Abbildung 6-15: Der Einfluss von AP2 auf die MR-vermittelte OVA-Aufnahme.**

BMDCs wurden mit 10 μg siRNA transfiziert. Als Kontrolle wurde siRNA gegen das Luciferase-Gen verwendet. 72 Stunden nach der Elektroporation wurde die Aufnahme von OVA-Alexa647 (250 ng/ml, 15 Minuten bei 37 °C) mittels Durchflusszytometrie untersucht.

- A Ein repräsentatives Histogramm für die OVA-Aufnahme.
- B Das Balkendiagramm zeigt Mittelwerte ± SEM der mittleren Fluoreszenzintensität der OVA<sup>+</sup> Events von fünf unabhängigen Experimenten. Der p-Wert wurde mittels Student T-Test berechnet.

Mit dem Ziel, die verminderte OVA-Aufnahme direkt mit einer Beeinträchtigung der MR-Internalisierung in Zusammenhang zu bringen, wurde weiterhin die Verteilung des MR innerhalb der Zelle nach Knockdown von AP2 μ2 untersucht. BMDCs wurden mit AP2 μ2-siRNA transfiziert und die MR-Expression innerhalb

der gesamten Zelle oder ausschließlich auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 6-16).



**Abbildung 6-16: Intra- und extrazelluläre Verteilung des MR nach AP2  $\mu$ 2-Knockdown.**

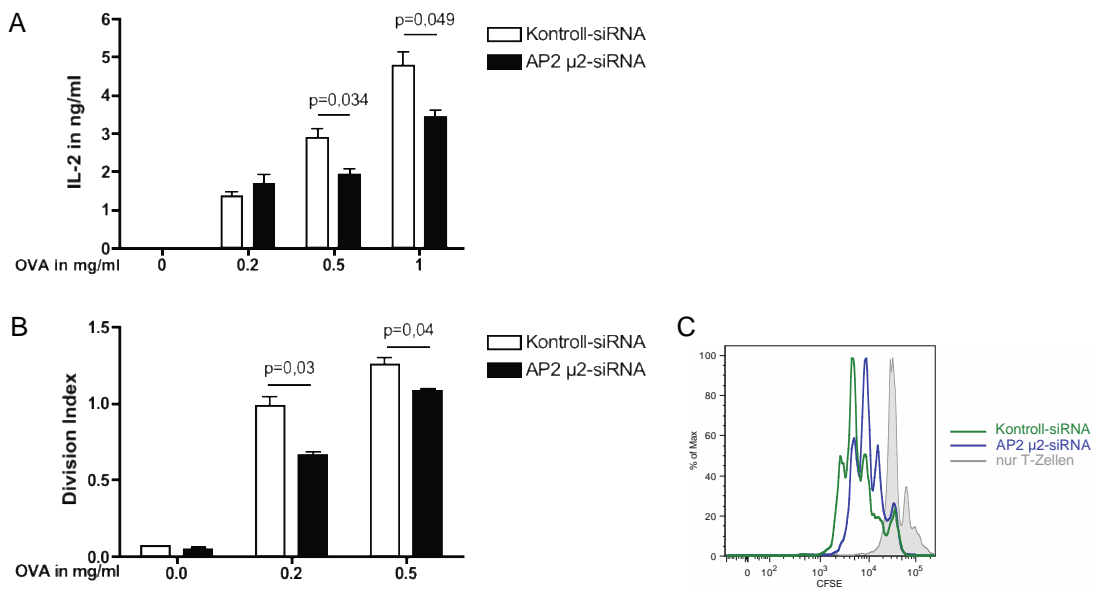
BMDCs wurden mit siRNA transfiziert und nach drei Tagen extrazellulär oder intrazellulär mit einem spezifischen  $\alpha$ MR-Antikörper gefärbt. Zur Quantifizierung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität aller MR<sup>+</sup> Zellen berechnet. Kontroll-siRNA: Luciferase, grau hinterlegt: ungefärbte Zellen. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Wie mit diesem Experiment gezeigt werden konnte, wird das generelle Expressionslevel des MR (intra- und extrazellulär) durch die Herunterregulation von AP2  $\mu$ 2 nicht beeinflusst. Jedoch zeigt der Knockdown einen Effekt auf die zelluläre Verteilung des MR: In Zellen, die kein oder wenig AP2  $\mu$ 2 exprimieren, sind weniger MR-Moleküle an der Zelloberfläche vorhanden als in Zellen mit normaler AP2  $\mu$ 2-Expression (Abbildung 6-16).

### 6.2.3 Die Bedeutung von AP2 für die Antigenpräsentation

Wie bereits mehrfach gezeigt, ist die MR-vermittelte Aufnahme eine entscheidende Voraussetzung für eine effektive Kreuzpräsentation von OVA (Abbildung 6-7, Abbildung 6-8) (Burgdorf et al., 2007). Ob der Verlust der AP2  $\mu$ 2-Expression und die damit verbundene reduzierte Aufnahme des Modellantigens OVA auch eine Auswirkung auf die OVA-Kreuzpräsentation hat, sollte im weiteren Verlauf geklärt werden.

Die Fähigkeit von BMDCs mit reduzierter AP2  $\mu$ 2-Expression zur Kreuzpräsentation und zur Aktivierung spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde mittels IL-2-ELISA und Proliferationsassay untersucht (wie in 5.3 beschrieben). BMDCs mit verminderter AP2  $\mu$ 2-Expression sind deutlich schlechter in der Lage, OVA auf MHCII-Molekülen zu kreuzpräsentieren und dadurch CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren als Kontroll-BMDCs, was in einer geringeren IL-2-Produktion und verminderten Proliferationsrate der T-Zellen resultiert (Abbildung 6-17). Die AP2  $\mu$ 2-Untereinheit hat also nicht nur eine relevante Funktion bei der OVA-Aufnahme, sie ist dadurch auch für eine effektive OVA-Kreuzpräsentation erforderlich.



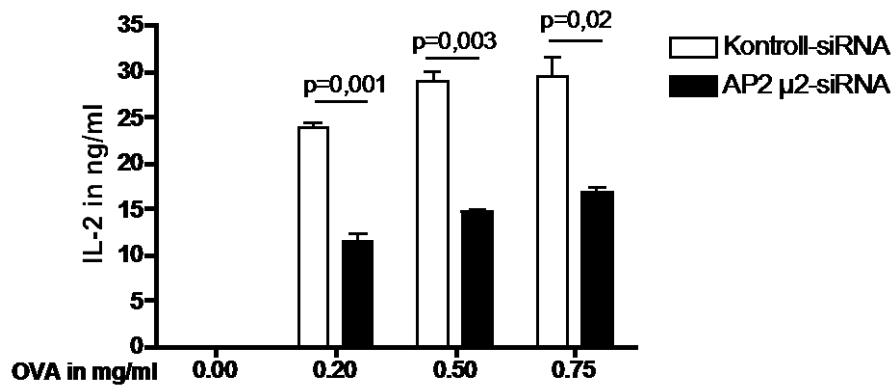
**Abbildung 6-17: Bedeutung von AP2 für die OVA-Kreuzpräsentation.**

BMDCs wurden mit 10  $\mu$ g AP2  $\mu$ 2- oder Kontroll-siRNA elektroporiert. 72 Stunden später wurden die Zellen ausplattiert und für drei Stunden mit Ovalbumin beladen.

- A** Die DCs wurden für 16 Stunden zusammen mit OTI T-Zellen kultiviert, anschließend wurde mittels ELISA die IL-2-Konzentration im Überstand gemessen. Die Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student T-Test bestimmt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.
- B** Vor der Kokultivierung mit BMDCs für drei Tage wurden die OTI T-Zellen mit CFSE gefärbt, damit die Proliferationsrate der Zellen anschließend im Durchflusszytometer analysiert werden konnte. Balken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM der Division Indices von Triplikaten, die p-Werte wurden mittels Student T-Test bestimmt. Das Experiment wurde zwei Mal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.
- C** Repräsentatives Histogramm proliferierter T-Zellen.

Die Präsentation von OVA auf MHCII-Molekülen erfolgt unabhängig von der Aufnahme über den MR. Auf Grund dessen wurde in einem Kontrollversuch die

MHCII-bedingte Präsentation von OVA in BMDCs nach AP2  $\mu$ 2-Knockdown untersucht. Hierfür wurden siRNA-behandelte BMDCs mit OVA beladen und ihre Fähigkeit zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup> OTII T-Zellen untersucht (Abbildung 6-18).

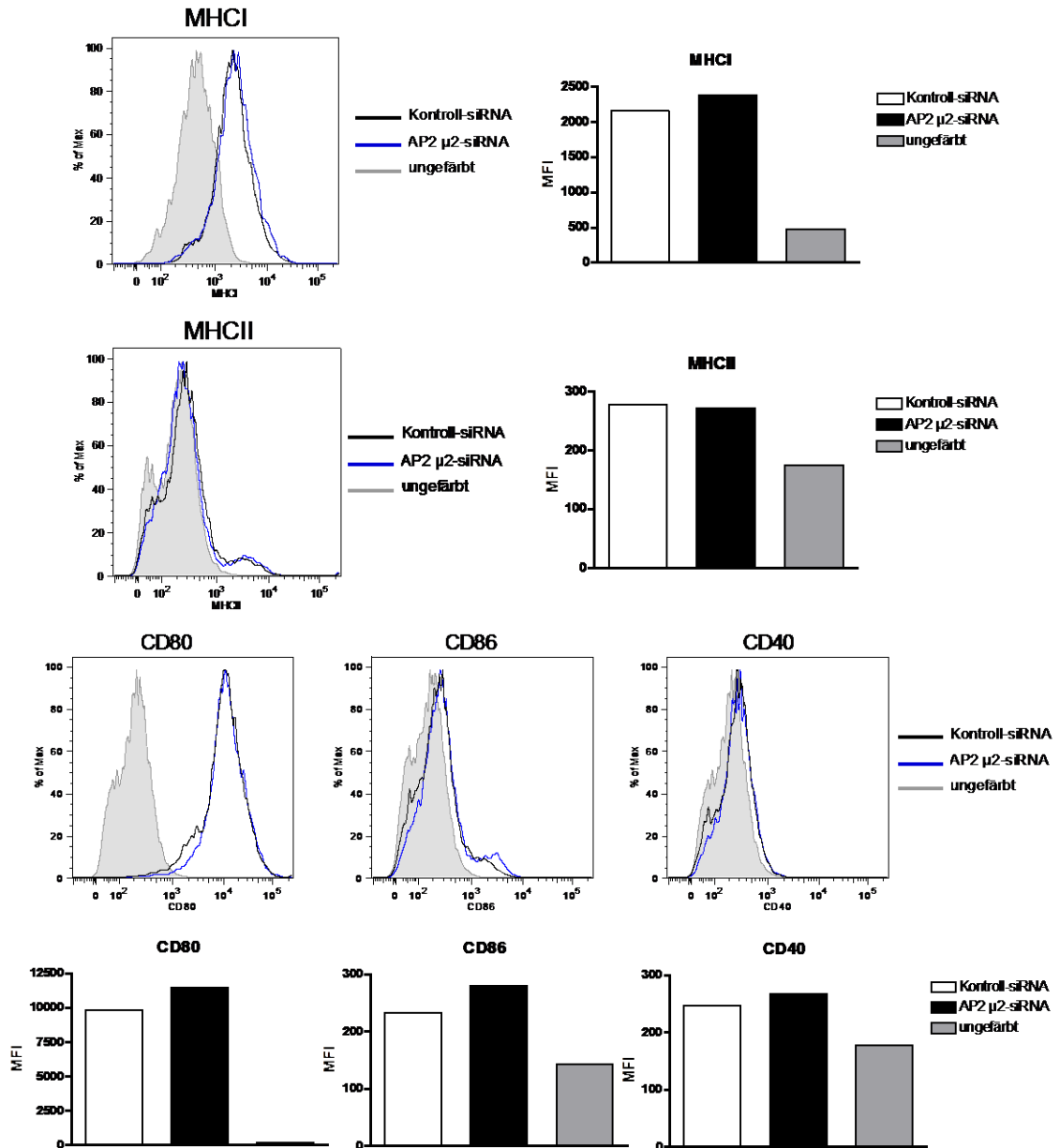


**Abbildung 6-18: Präsentation von OVA auf MHCII-Molekülen von BMDCs mit verminderter AP2  $\mu$ 2-Expression.**

SiRNA-transfizierte BMDCs wurden für drei Stunden mit OVA behandelt und anschließend zusammen mit CD4<sup>+</sup> OTII T-Zellen kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Aktivierung der T-Zellen durch Quantifizierung der IL-2-Konzentration im Überstand untersucht. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM von Triplikaten, die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student T-Test geprüft.

Überraschenderweise verursacht die Herunterregulierung der AP2  $\mu$ 2-Expression neben einer verminderten Kreuzpräsentation auch eine Abnahme in der Präsentation von OVA auf MHCII-Molekülen (Abbildung 6-18). Wodurch dieser Effekt möglicherweise verursacht wird, wird in der Diskussion genauer abgehandelt.

Um den hemmenden Effekt des AP2  $\mu$ 2-Knockdowns auf die OVA-Kreuzpräsentation der verringerten OVA-Aufnahme zuschreiben zu können und gleichzeitig den Einfluss auf andere, für die Kreuzpräsentation relevante Mechanismen auszuschließen, wurden im Folgenden weitere Kontrollexperimente durchgeführt. Im Rahmen dieser Kontrollexperimente wurde der Einfluss des AP2  $\mu$ 2-Knockdowns auf die Expression von MHCI- und MHCII-Molekülen sowie verschiedener Aktivierungsmarker auf der Zelloberfläche untersucht (Abbildung 6-19).



**Abbildung 6-19: Oberflächenexpression von MHC-Molekülen und Aktivierungsmarkern nach Herunterregulation der AP2  $\mu$ 2-Expression.**

AP2  $\mu$ 2 wurde mittels siRNA herunterreguliert und nach 72 Stunden die Expression von MHC I, MHC II, CD80, CD86 und CD40 auf der Zelloberfläche bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen jeweils die Quantifizierung der zugehörigen Histogramme. MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität; als Kontrolle wurde Luciferase-siRNA verwendet. Grau hinterlegt: ungefärbte Zellen. Die Färbungen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

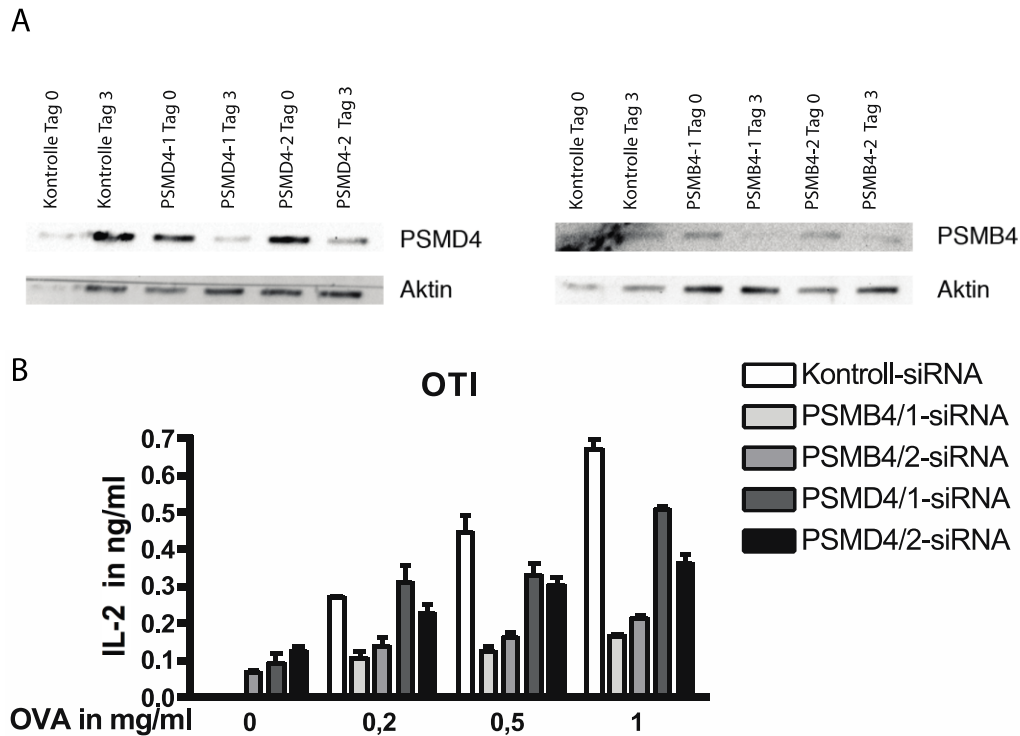
Ein Einfluss der AP2  $\mu$ 2-siRNA-Behandlung auf die Oberflächenexpression von MHC I- und MHC II-Molekülen sowie der Aktivierungsmarker CD80, CD86 oder CD40 konnte mit diesen Experimenten ausgeschlossen werden. AP2  $\mu$ 2-siRNA-



behandelte DCs und Kontroll-siRNA-behandelte DCs zeigen für alle untersuchten Moleküle eine vergleichbare Expression auf der Zelloberfläche (Abbildung 6-19).

### **6.3 Das Immunproteasom ist wichtig für die OVA-Kreuzpräsentation**

Trotz zahlreicher Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Antigenkreuzpräsentation bleiben diverse Faktoren noch ungeklärt. Beispielsweise wurden bisherige Nachweise über die Rolle des Proteasoms bei der Kreuzpräsentation hauptsächlich indirekt über Versuche mit generellen Proteasominhibitoren erbracht (Ackerman and Cresswell, 2004; Burgdorf et al., 2006; Burgdorf et al., 2008; Shen et al., 2004). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle des Proteasoms bei der Antigenkreuzpräsentation durch siRNA-vermittelten Knockdown einzelner Proteasomuntereinheiten untersucht. Als Ziel wurde die nicht-ATPase Untereinheit des 19S Regulators (PSMD4) und die 20S Proteasomuntereinheit beta Typ 4 (PSMB4) verwendet. Wie Abbildung 6-20 A zeigt, geht die Expression der Untereinheiten PSMD4 und PSMB4 nach Knockdown mittels siRNA deutlich zurück, wenn auch eine gewisse Restmenge an Protein noch in den Zellen vorhanden ist.



**Abbildung 6-20: Die Rolle des Proteasoms bei der OVA-Kreuzpräsentation.**

BMDCs wurden mit 10 µg siRNA elektroporiert. Als Kontrolle wurde siRNA gegen das Luciferase-Gen verwendet.

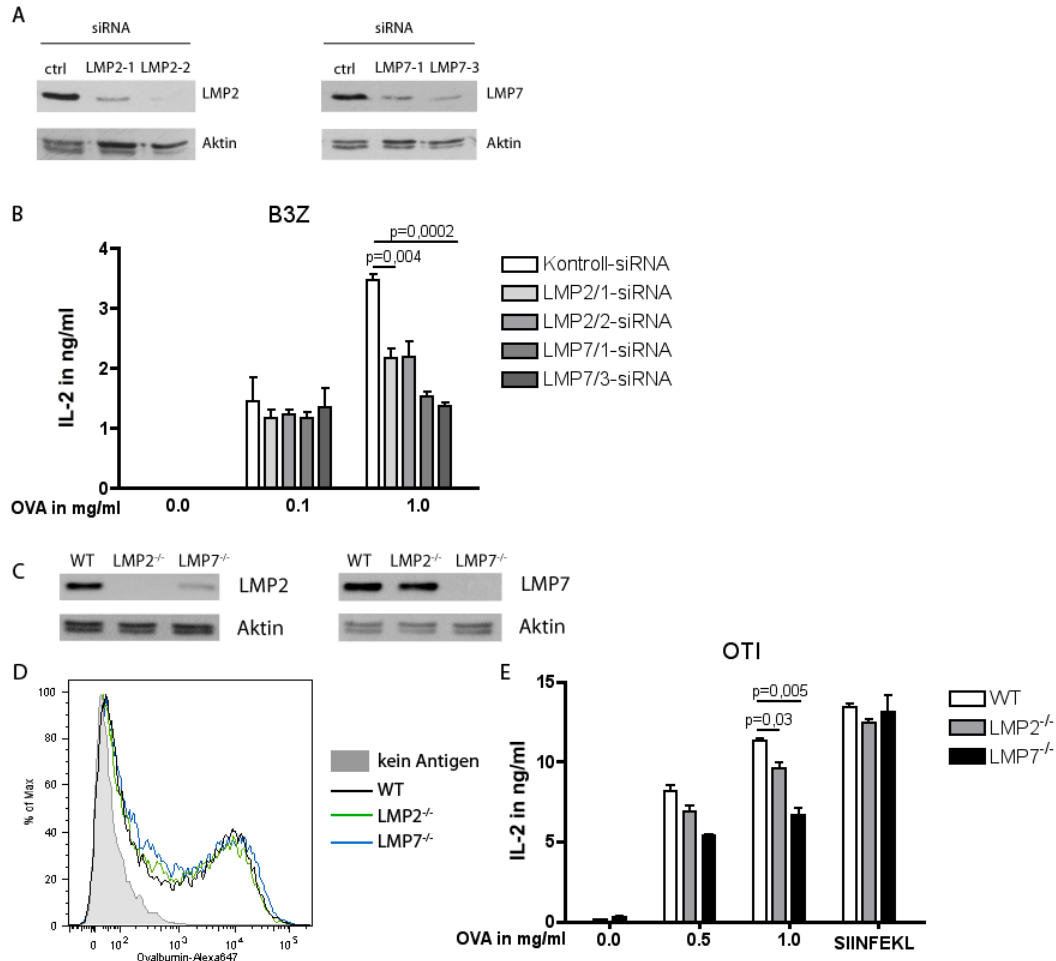
**A** An Tag null oder drei nach der Elektroporation wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot wurde das Expressionslevel der Proteasomuntereinheiten bestimmt.

**B** An Tag drei nach der Elektroporation wurden die Zellen mit Ovalbumin beladen und mit OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert. Am nächsten Tag wurde die IL-2-Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Das Experiment wurde drei Mal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Durch Kultivierung von siRNA-behandelten BMDCs zusammen mit CD8<sup>+</sup> OTI T-Zellen und anschließender Bestimmung der IL-2-Konzentration im Überstand wurde der Effekt dieses Knockdowns auf die OVA-Kreuzpräsentation untersucht. Nach Herunterregulieren der beiden Untereinheiten in BMDCs ist eine verminderte T-Zell-Aktivierung durch Kreuzpräsentation, sichtbar durch die reduzierte IL-2-Sekretion der T-Zellen, zu beobachten. Knockdown der 20S-UE PSMB4 zeigt dabei einen größeren Einfluss als die Herunterregulierung der 19S-UE PSMD4 (Abbildung 6-20).

Neben diesem direkten Nachweis über die Notwendigkeit des Proteasoms für eine effektive Antigenkreuzpräsentation sollte im Folgenden geklärt werden, ob das Immunoproteasom, welches in DCs konstitutiv exprimiert wird, hierbei eine Rolle spielt. In diesem Sinne wurden die induzierbaren Immunoproteasom-UE LMP2

und LMP7 in BMDCs herunterreguliert und die Fähigkeit dieser DCs zur Kreuzpräsentation untersucht. Als zusätzliche Kontrolle wurden zudem BMDCs aus LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen verwendet.



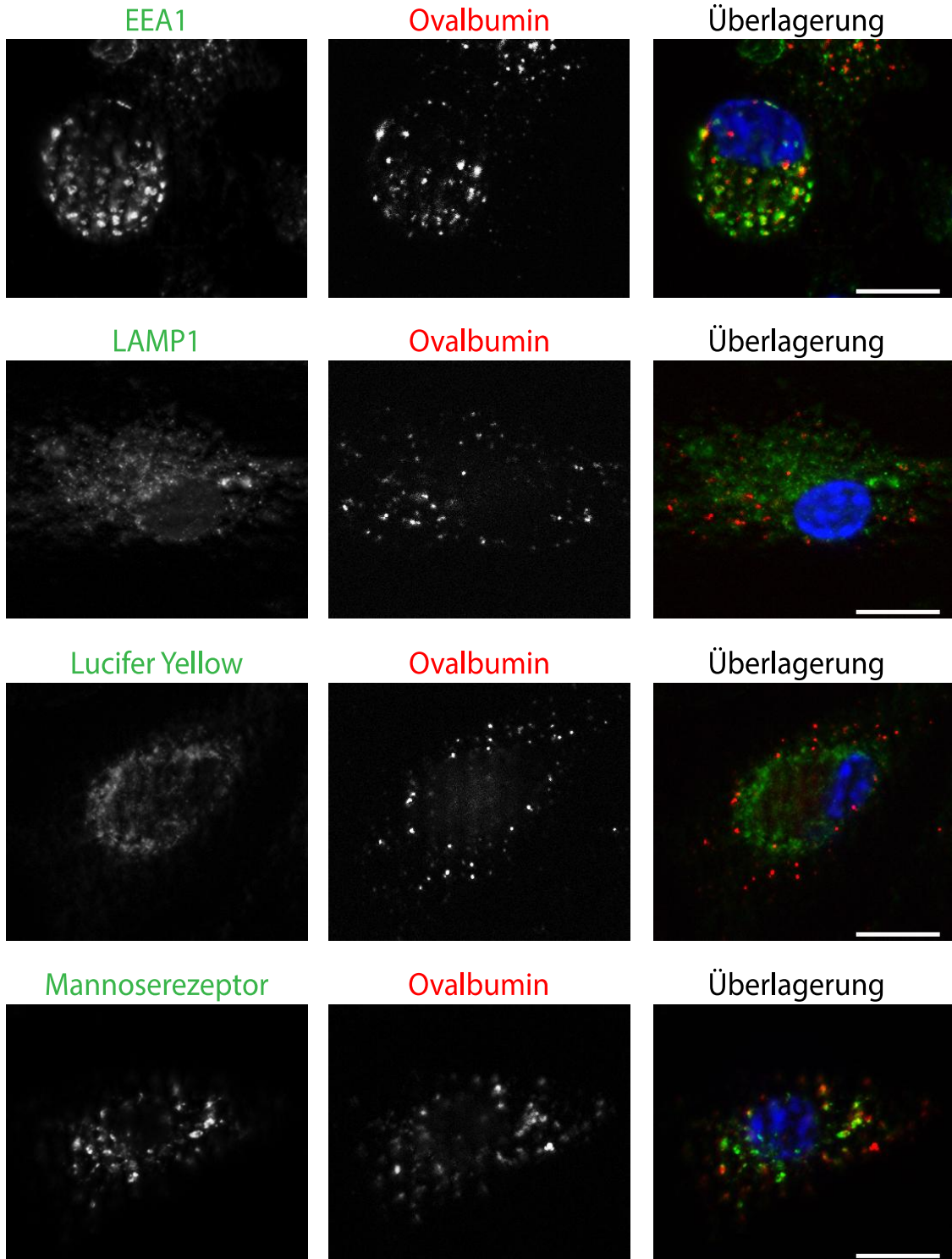
**Abbildung 6-21: Die Bedeutung des Immunoproteasoms bei der Antigenkruzpräsentation.**

BMDCs wurden mit siRNA elektroporiert und nach 72 Stunden für SDS-PAGE und Western Blot lysiert (A) oder mit OVA behandelt und mit OVA-spezifischen T-Zellen (B3Z) über Nacht kokultiviert. Am nächsten Tag wurde der IL-2-Gehalt im Überstand ermittelt (B). BMDCs aus WT, LMP2<sup>-/-</sup> oder LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen wurden an Differenzierungstag sieben lysiert und mittels Western Blot das LMP2/7-Expressionslevel ermittelt (C) oder die Aufnahme von OVA nach 15 Minuten Inkubation mit OVA-Alexa647 (250 ng/ml) bei 37 °C getestet (D). Die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation in diesen Zellen wurde nach Beladung mit OVA und Inkubation mit OTI Zellen über Nacht anhand der IL-2-Sekretion bestimmt. Die Balken zeigen Triplikate ± SEM, die p-Werte wurden durch den Student T-Test ermittelt. Als Kontrolle diente siRNA gegen das Luciferase-Gen. Die hier gezeigten Experimente wurden zwei Mal (LMP2<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Zellen) beziehungsweise drei Mal (siRNA-Knockdown) mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

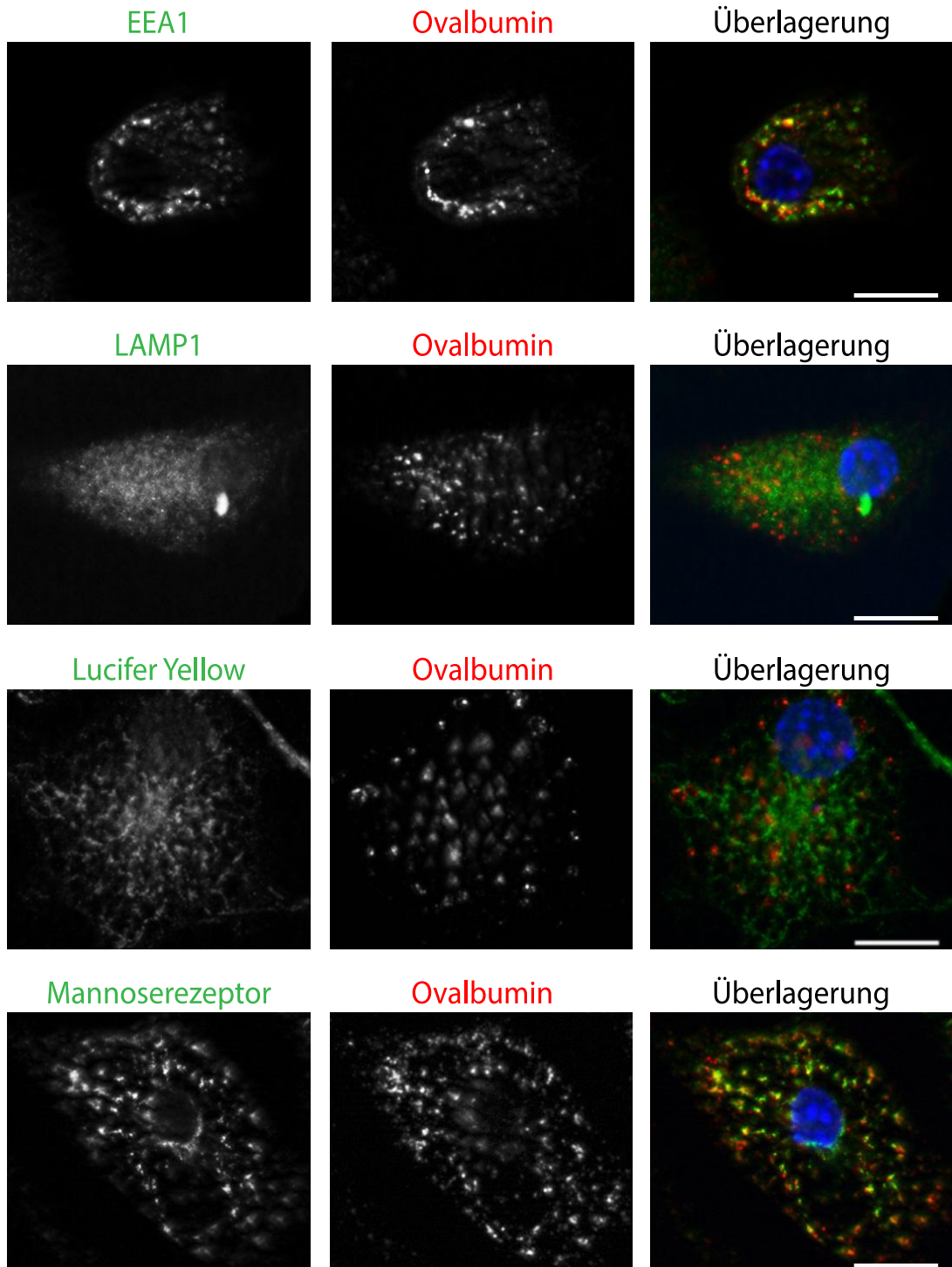
Durch Elektroporation von spezifischer siRNA konnte die Expression der Immunoproteasom-UE LMP2 und LMP7 deutlich verringert, jedoch nicht vollständig gehemmt werden (Abbildung 6-21 A). Trotz der verbleibenden

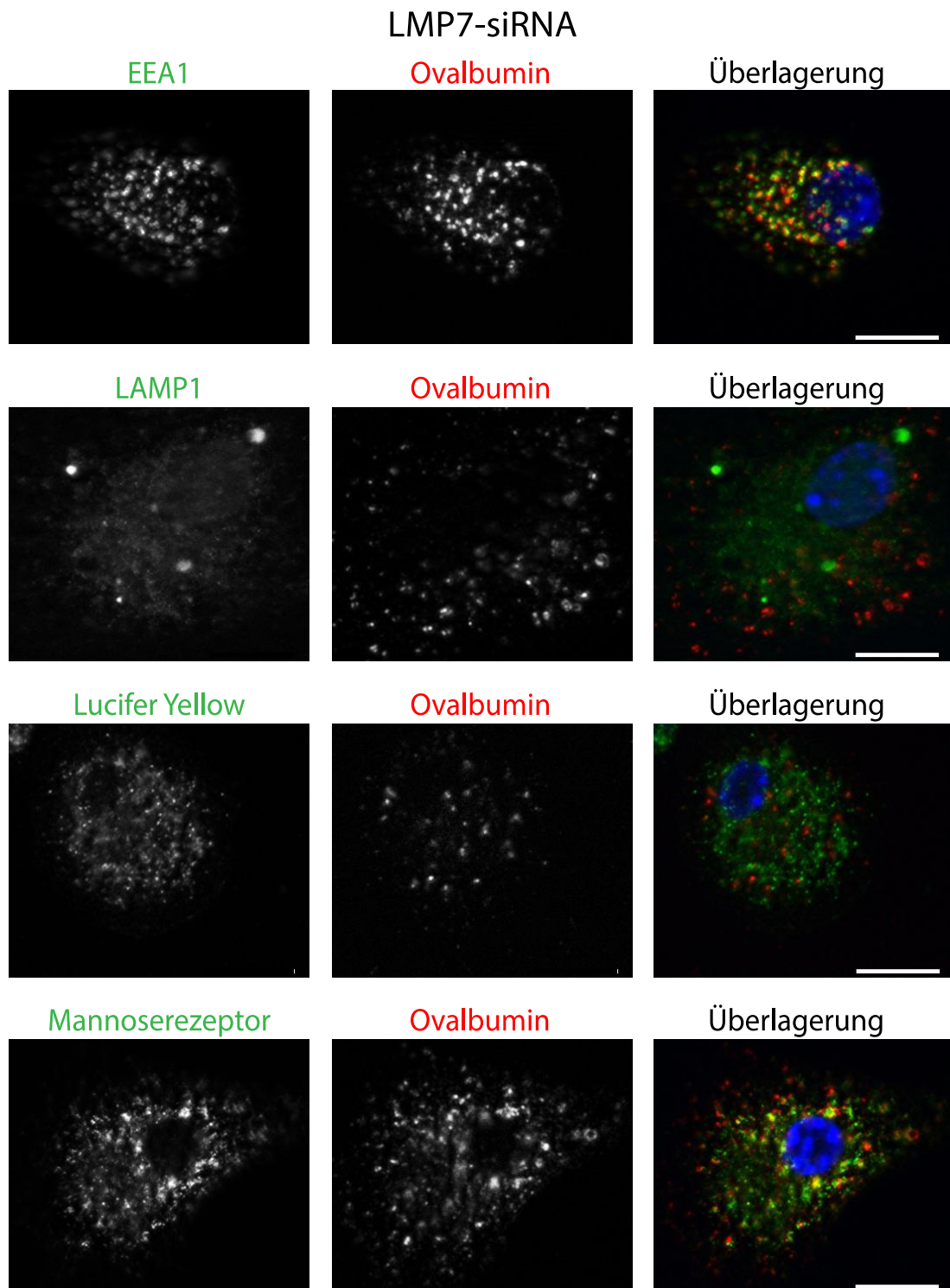
Restexpression von LMP2 und LMP7 sind die BMDCs in ihrer Fähigkeit, OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren, stark beeinträchtigt, was sich in einer signifikant verminderten Ausschüttung von IL-2 durch die T-Zellen manifestiert (Abbildung 6-21 B). Um die Restexpression der Immunoproteasom-UE nach dem siRNA-vermittelten Knockdown zu umgehen, wurde der Versuch mit LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> BMDCs wiederholt. In diesen Zellen ist keinerlei Expression von LMP2 beziehungsweise LMP7 zu detektieren, wie die Western Blot Analyse zeigt (Abbildung 6-21 C). Auch diese BMDCs vermitteln im Vergleich zu WT Zellen eine signifikant schlechtere Aktivierung von OTI T-Zellen und sind demzufolge nicht zu einer effektiven Kreuzpräsentation des Modellantigens OVA in der Lage (Abbildung 6-21 E). Im Gegensatz dazu ist kein Unterschied bei der direkten Beladung mit dem OVA-Peptid SIINFEKL zu beobachten (Abbildung 6-21 E), ein Hinweis darauf, dass tatsächlich die Antigenprozessierung und nicht die Beladung der MHCI-Moleküle in den Knockout-DCs gestört ist. Auch ein Effekt des Knockouts auf die Antigenaufnahme wurde ausgeschlossen (Abbildung 6-21 D). Darüber hinaus zeigt der Knockdown von LMP2 und LMP7 keinen Effekt auf die Aufnahme des Antigens in stabile frühe Endosomen, von wo aus das Antigen effektiv kreuzpräsentiert wird. Ovalbumin kolokalisiert mit dem MR und dem früh-endosomalen Marker EEA1, wohingegen keine Kolokalisation mit dem lysosomalen Marker LAMP1 und dem Pinozytosemarker Lucifer Yellow, der nach seiner Aufnahme in Lysosomen geleitet wird, erkennbar ist (Abbildung 6-22).

Kontroll-siRNA



LMP2-siRNA





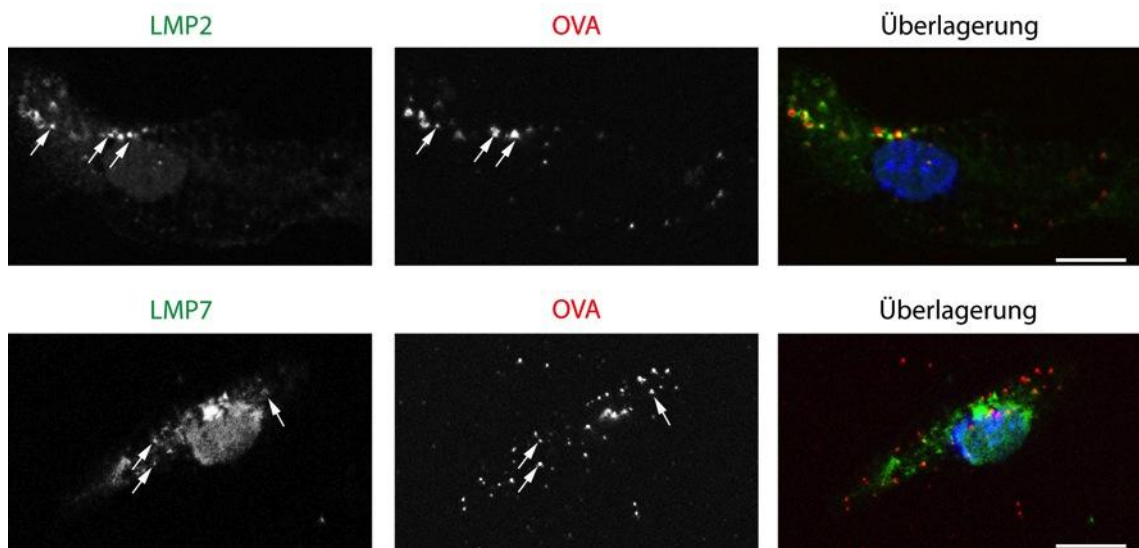
**Abbildung 6-22: Intrazelluläre Lokalisation von OVA in BMDCs nach Herunterregulation von LMP2 und LMP7.**

BMDCs wurden mit siRNA elektroporiert, nach 72 Stunden auf Deckgläschen ausplattiert und für 15 Minuten mit Alexa647 gekoppeltem Ovalbumin (250 ng/ml) oder Lucifer Yellow (0,3 mg/ml) inkubiert. Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen den Mannoserezeptor, EEA1, LAMP1 oder Lucifer Yellow gefärbt. Zellkerne wurden mit Dapi sichtbar gemacht. Der Maßstabbalken entspricht 10 µm.



### 6.3.1 Das Immunproteasom wird an OVA<sup>+</sup> Endosomen rekrutiert

Da Peptide nach dem Abbau durch das Proteasom relativ instabil sind und schnell abgebaut werden (Reits et al., 2003), ist eine unmittelbare räumliche Nähe des Proteasoms zu den Kompartimenten, in welche die Peptide für eine effektive Kreuzpräsentation wieder aufgenommen werden, notwendig. Die Lokalisation des Immunproteasoms in räumlicher Nähe von Antigen-beladenen Endosomen wurde zunächst durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (Abbildung 6-23).



**Abbildung 6-23: Das Immunproteasom ist an OVA<sup>+</sup> Endosomen vorhanden.**

BMDCs wurden lentiviral zur Expression von LMP2 oder LMP7-GFP Fusionsproteinen transduziert, auf Deckgläsern ausplattiert und mit Ovalbumin-Alexa647 für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Dapi gefärbt. Die Pfeile zeigen Kolokalisation der Fusionsproteine mit OVA an, der Maßstabbalken entspricht 10 µm. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Um das Immunproteasom im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wurden BMDCs lentiviral mit LMP2-GFP und LMP7-GFP Fusionsproteinen transduziert. Das GFP befindet sich dabei am C-Terminus von LMP2 und LMP7. Auf diese Weise können die Untereinheiten weiterhin in das Proteasom eingebaut werden und der Komplex ist nach wie vor proteolytisch aktiv (Reits et al., 1997). Abbildung 6-23 zeigt die Verteilung der Fusionsproteine innerhalb der Zelle. Das Immunproteasom befindet sich im Zytoplasma in punktförmigen Strukturen, an einigen Stellen ist Kolokalisation mit Ovalbumin erkennbar (Abbildung 6-23).



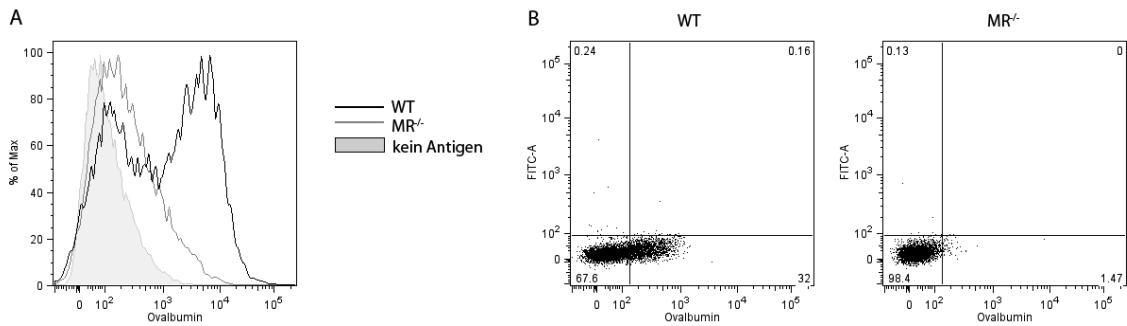
## 6.4 Charakterisierung von OVA-haltigen Endosomen mittels

### Durchflusszytometrie

Mit Hilfe von Fusionsproteinen und Fluoreszenzmikroskopie wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits ein erster Hinweis für die Rekrutierung des Immunoproteasoms an OVA-beladene Endosomen geliefert. Jedoch lässt sich auf diese Weise nur eine Aussage über einzelne Zellen treffen.

In den letzten Jahren entwickelten zwei Mitarbeiter unserer Gruppe, Achmet Imam Chasan und Matthias Zehner, ein Protokoll, mit dem OVA-haltige Endosomen isoliert werden können und ihre Proteinzusammensetzung mittels spezifischer Antikörperfärbung und anschließender Durchflusszytometrie untersucht werden kann (Zehner et al., 2012). Auf diese Weise können gleichzeitig viele Zellen und OVA<sup>+</sup> Endosomen untersucht werden und die Menge interessanter Proteine an den Endosomen kann sogar quantifiziert werden. Im Rahmen meiner Doktorarbeit arbeitete ich an der Weiterentwicklung und Validierung der Methode mit und wendete sie für relevante Fragestellungen an.

Für die endosomale Durchflusszytometrie wurden BMDCs von WT oder MR<sup>-/-</sup> Mäusen zunächst mit OVA-Alexa647 bei 37 °C behandelt, um die Antigenaufnahme zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen homogenisiert und die Endosomen isoliert wie in 5.2 beschrieben. In Übereinstimmung mit der MR-abhängigen OVA-Aufnahme in BMDCs (Abbildung 6-24 A) enthalten WT BMDCs OVA<sup>+</sup> Vesikel, während MR<sup>-/-</sup> BMDCs ausschließlich OVA<sup>-</sup> Vesikel enthalten (Abbildung 6-24 B). Die untersuchten Vesikel werden also spezifisch durch den MR mit OVA gespeist.

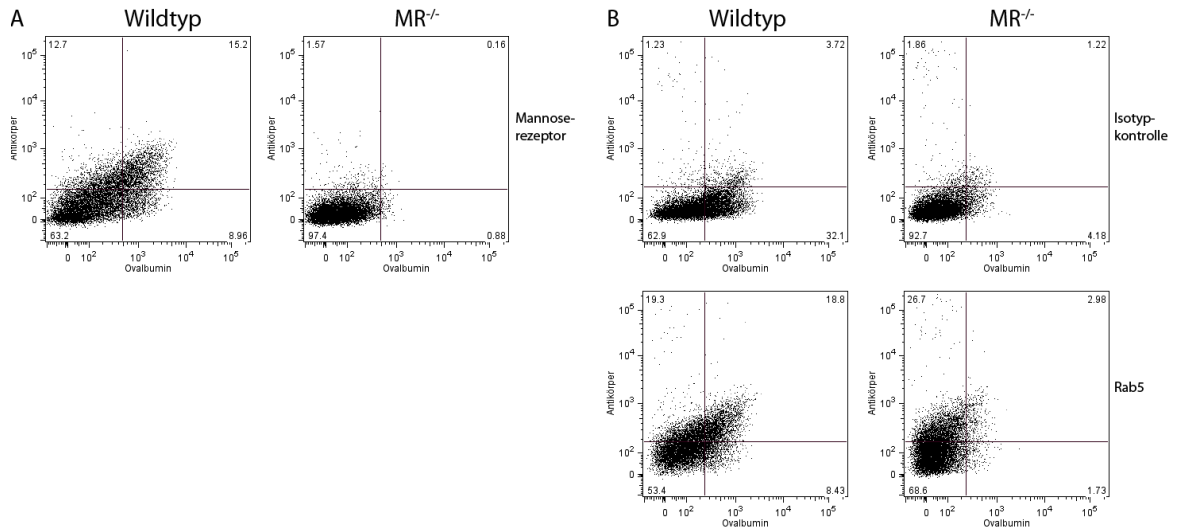


**Abbildung 6-24: Endosomen aus WT und MR<sup>-/-</sup> BMDCs.**

WT oder MR<sup>-/-</sup> BMDCs wurden mit OVA-Alexa647 (250 ng/ml) bei 37 °C inkubiert und die Zellen (A) oder isolierte Endosomen (B) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten sind repräsentativ für mindestens vier unabhängige Experimente.

- A OVA-Aufnahme von BMDCs aus WT oder MR<sup>-/-</sup> Mäusen. Kontrollzellen (grau hinterlegt) wurden nur mit Medium inkubiert.
- B Nach Inkubation mit OVA wurden die Zellen homogenisiert, die Endosomen durch mehrere Zentrifugationsschritte isoliert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

Durch Vergleich mit kalibrierten Größenbeads konnten Achmet Imam Chasan und Matthias Zehner die Größe dieser isolierten OVA-haltigen Vesikel auf circa 500 nm bestimmen. Mit Hilfe diverser Detergenzien konnten sie weiterhin bestätigen, dass es sich um intakte Organellen handelt (Zehner et al., 2012). Ferner konnten die isolierten Organellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt werden, eine wichtige Voraussetzung für die Identifizierung von Proteinen an der Oberfläche dieser Endosomen. Abbildung 6-25 zeigt beispielhaft eine spezifische Färbungen des MR und des endosomalen Markers Rab5 an der Membran von OVA<sup>+</sup> Endosomen. Unter Verwendung sowohl WT als auch MR<sup>-/-</sup> BMDCs wurde die Spezifität der MR-Färbung sichergestellt (Abbildung 6-25 A). Die Spezifität der Rab5 Färbung wurde durch den Einsatz eines unspezifischen Antikörpers als Isotypkontrolle nachgewiesen (Abbildung 6-25 B). Weitere Färbungen belegen die Existenz von EEA1 und TAP1 an OVA<sup>+</sup> Vesikeln, während LAMP1 und Rab7 nicht an den isolierten Endosomen vorhanden sind, und bekräftigen damit den schon beschriebenen früh-endosomalen Charakter der OVA<sup>+</sup> Endosomen (Burgdorf et al., 2007; Zehner et al., 2012).



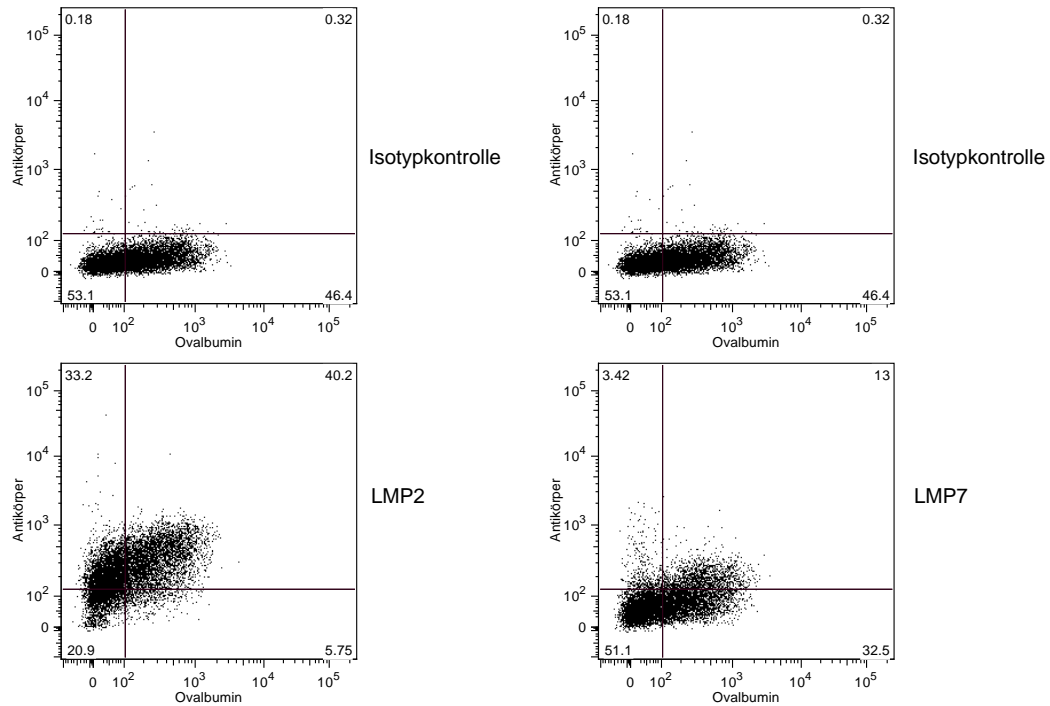
**Abbildung 6-25: Spezifische Färbung von Proteinen auf der Oberfläche von Endosomen.**

BMDCs wurden mit OVA-Alexa647 inkubiert, homogenisiert und die Endosomen isoliert. Anschließend wurden die Endosomen mit einem  $\alpha$ MR-Antikörper (A), einem  $\alpha$ Rab5-Antikörper oder einer Isotypkontrolle (B) gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Abbildungen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

#### 6.4.1 Einsatz der endosomalen Durchflusszytometrie zum Nachweis des Immunoproteasoms an OVA<sup>+</sup> Endosomen

Zur Bestätigung der in Abbildung 6-23 gezeigten Rekrutierung des Immunoproteasoms an OVA-beladene Kompartimente wurden im Folgenden Endosomen aus OVA-beladenen WT BMDCs isoliert und mit spezifischen Antikörpern gegen LMP2 und LMP7 gefärbt. In der Tat konnten mit dieser Methode beide Immunoproteasom-UE an OVA-haltigen Endosomen nachgewiesen werden (Abbildung 6-26).

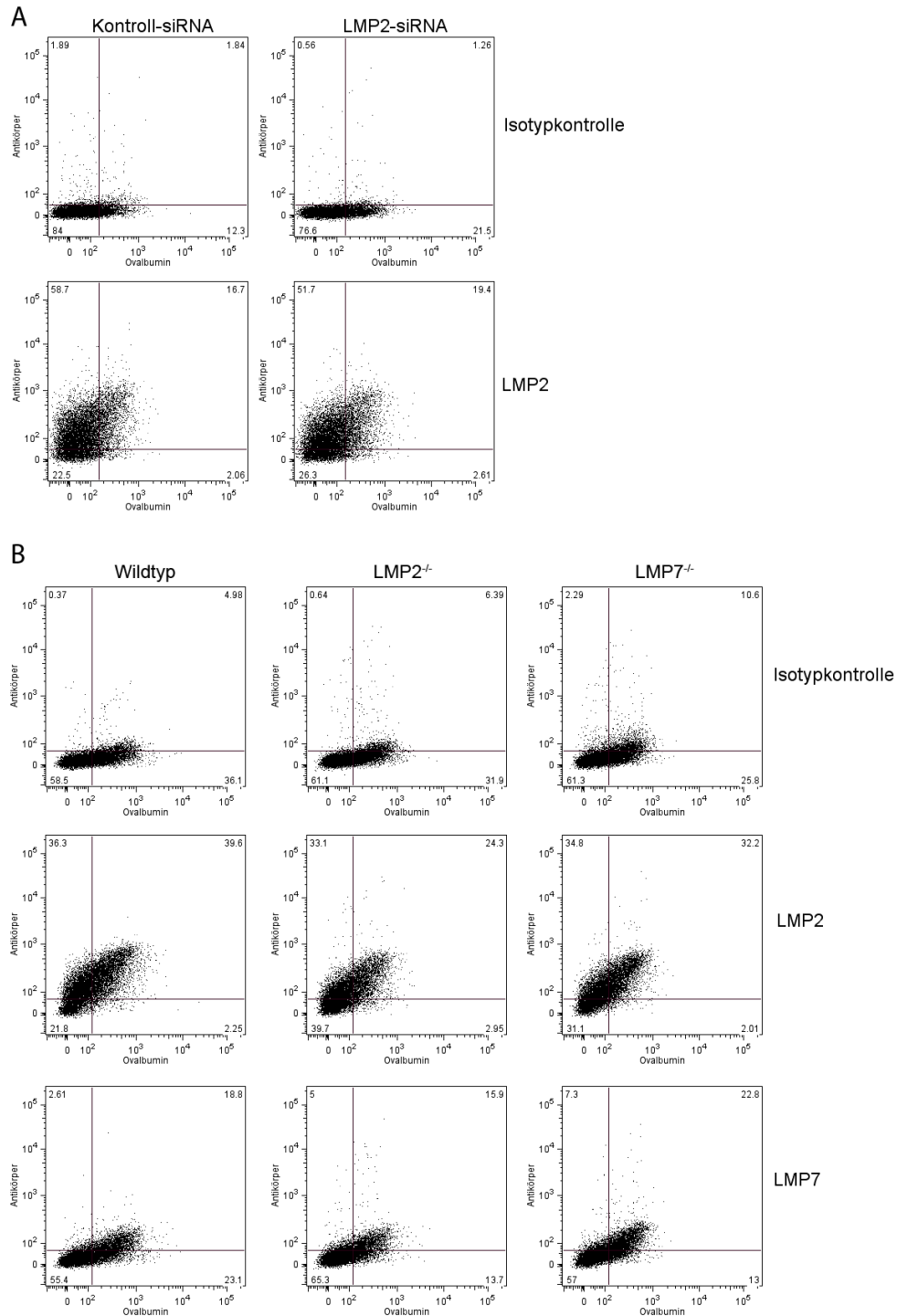
## ERGEBNISSE



**Abbildung 6-26: Färbung von LMP2 und LMP7 an OVA-haltigen Endosomen.**

OVA-Alexa647 beladene BMDCs wurden homogenisiert und zentrifugiert, um Endosomen zu isolieren. Die Endosomen wurden im Anschluss mit einem  $\alpha$ LMP2-Antikörper, einem  $\alpha$ LMP7-Antikörper oder einem unspezifischen Antikörper als Isotypkontrolle gefärbt. Zuletzt wurden die Endosomen im Durchflusszytometer analysiert. Die Färbung wurde mindestens drei Mal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Zwar wurde bei dem Versuch ein unspezifischer Antikörper als Isotypkontrolle verwendet, dennoch sollte die Spezifität der Färbung eindeutiger belegt werden. Aus diesem Grund wurde die Färbung an Endosomen aus BMDCs nach siRNA-vermitteltem Knockdown von LMP2 sowie in LMP2<sup>-/-</sup> oder LMP7<sup>-/-</sup> BMDCs wiederholt.



**Abbildung 6-27: Die Färbung von LMP2 und LMP7 an Endosomen ist unspezifisch.**

- A** WT BMDCs wurden mit LMP2- oder Kontroll-siRNA elektroporiert. Nach Inkubation mit OVA-Alexa647 wurden die Endosomen isoliert und mit einem  $\alpha$ LMP2-Antikörper oder einer Isotypkontrolle gefärbt. Zuletzt wurden die Endosomen im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.
- B** Endosomen wurden aus mit OVA-Alexa647 behandelten WT, LMP2<sup>-/-</sup> oder LMP7<sup>-/-</sup> BMDCs isoliert und mit spezifischen Antikörpern oder einer Isotypkontrolle gefärbt. Anschließend wurden sie mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

Fatalerweise zeigen sowohl die Versuche nach Herunterregulation der LMP2-Expression als auch die Versuche mit LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> Zellen, dass die Färbung der beiden Immunoproteasom-UE an OVA<sup>+</sup> Endosomen nicht spezifisch zu sein scheint (Abbildung 6-27). Entgegen aller Erwartungen ging die Intensität der LMP2-Färbung in siRNA-behandelten BMDCs oder Knockout-BMDCs im Vergleich zu WT Zellen nicht zurück. Auch das vermeintlich spezifische LMP7 Signal ist in Endosomen aus LMP7<sup>-/-</sup> BMDCs so deutlich wie in WT BMDCs. Mit den hier verwendeten Antikörpern war demnach kein eindeutiger Nachweis über die Rekrutierung des Immunoproteasoms an OVA<sup>+</sup> Endosomen möglich.

## 7 Diskussion

### 7.1 Mannosylierung von SLPs führt zu einer erhöhten MR-vermittelten Aufnahme und einer verbesserten Kreuzpräsentation

Bekanntermaßen können Virus-infizierte Zellen und Tumorzellen besonders effektiv mit einer zellvermittelten adaptiven Immunantwort bekämpft werden. Im Hinblick auf die Verbesserung von therapeutischen Impfstoffen ist daher das Auslösen einer stabilen, zytotoxischen T-Zell-Antwort das Hauptziel.

Mit ihrer Fähigkeit, eine große Anzahl vielfältiger Antigene aufzunehmen, auf MHC-I-Molekülen zu präsentieren und auf diese Weise zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren, stellen dendritische Zellen ein wichtiges Ziel für die therapeutische Vakzinierung dar.

Das Targeting von Antigenen an endozytotische Rezeptoren auf dendritischen Zellen ist mittlerweile eine bewährte Methode, um die Wirkung von Impfstoffen zu erhöhen. Entscheidend hierbei ist, dass die Antigene nicht nur effektiv in die antigenpräsentierende Zelle aufgenommen werden, sondern auch direkt in die richtigen intrazellulären Kompartimente geleitet werden, an denen alle notwendigen Komponenten für die Antigenprozessierung und -präsentation vorhanden sind.

Der Mannoserezeptor ist in der Lage, große Mengen an löslichem OVA in BMDCs aufzunehmen und das Antigen in für die Kreuzpräsentation spezialisierte Kompartimente zu leiten, wo es prozessiert und auf MHC-I-Moleküle geladen wird (Burgdorf et al., 2007; Burgdorf et al., 2008). Aus diesem Grund ist der Mannoserezeptor ein besonders interessantes Objekt für die zielgerichtete Vakzinierung.

Viele Anläufe wurden mittlerweile unternommen, um die gezielte Aufnahme von Antigenen über den Mannoserezeptor zu verbessern. Beispielsweise wurden Vakzine mit Mannoseresiden versehen (Agnes et al., 1998; Engering et al., 1997; Hattori et al., 2004; Tan et al., 1997), mit Mannan konjugiert (Sasaki et al., 1997; Toda et al., 1997) oder an monoklonale Antikörper (mAb) gegen den MR gebunden (He et al., 2007; He et al., 2004; Ramakrishna et al., 2004).

In vielen dieser Studien wurde bereits beschrieben, dass das Anbringen von Mannoseresten an Antigene zu einer erhöhten spezifischen Immunantwort führt. Da jedoch Mannosereste nicht ausschließlich über den MR aufgenommen werden, sondern auch von anderen C-Typ-Lektinen (z.B. DC-SIGN) mittels ihrer Kohlehydraterkennungsdomäne (CRD) erkannt werden, fehlte bisher der Beweis dafür, dass tatsächlich der MR für die verbesserte Immunantwort von mannosylierten Peptiden verantwortlich ist.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Aufnahme und Kreuzpräsentation von mannosylierten Peptiden im Kontext von WT oder MR<sup>-/-</sup> DCs untersucht. Auf diese Weise können die beobachteten Effekte direkt mit der MR-Expression in Verbindung gebracht werden. Mannosylierung des SLPs führt zu einer deutlich verbesserten MR-abhängigen Aufnahme in BMDCs im Vergleich zum nicht mannosylierten Peptid (Abbildung 6-2, Abbildung 6-3, Abbildung 6-4).

Wie zusätzlich gezeigt wurde, gelangt das mannosylierte Peptide nicht nur über den gleichen Rezeptor in die Zelle, es wird auch in die gleichen subzellulären Kompartimente wie OVA gebracht (Abbildung 6-5). Die genauere Charakterisierung der Vesikel bestätigte die zielgerichtete Aufnahme des mannosylierten Peptids in stabile frühe Endosomen (Abbildung 6-6).

Mit verschiedenen *in vitro* Versuchen wurde in dieser Arbeit die Abhängigkeit der Kreuzpräsentation des mannosylierten Peptids von der MR-Expression bewiesen. In Übereinstimmung mit der sehr geringen Aufnahme des nicht mannosylierten Peptids in BMDCs können die Zellen mit diesem Peptid auch keine nennenswerte T-Zell-Antwort auslösen (Abbildung 6-7, Abbildung 6-8). Die Mannosylierung von Peptiden bietet also in der Tat die Möglichkeit, eine zielgerichtete MR-abhängige Aufnahme hervorzurufen und somit die Kreuzpräsentation zu verbessern.

Der MR führt OVA fast ausschließlich in Kompartimente, von denen aus OVA sehr effektiv kreuzpräsentiert wird, die MHCII-Präsentation bleibt davon unbeeinflusst (Burgdorf et al., 2007). In Übereinstimmung damit erfolgt auch die MHCII-Präsentation der Peptide unabhängig davon, ob das Peptid mannosyliert ist oder nicht und ob die BMDCs den MR exprimieren oder nicht (Abbildung 6-9). Da sowohl die CD4<sup>+</sup> als auch die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort wertvoll im Sinne einer erfolgreichen therapeutischen Vakzinierung ist, war es wichtig, zu zeigen, dass die



MHCII-Präsentation der Peptide durch Mannosylierung nicht negativ beeinflusst wird.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ruft das mannosylierte Peptid *in vitro* eine erhöhte zytotoxische T-Zell-Antwort im Vergleich zum nicht-mannosylierten Peptid hervor. Deutlich interessanter ist allerdings, dass die Mannosylierung des Peptids auch *in vivo* zu einer effizienten Aktivierung und Proliferation von spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt (Abbildung 6-10). Dies trifft sowohl für das OVA-spezifische Peptid als auch für das HPV16 E7-spezifische Peptid zu (Abbildung 6-11).

Besonders deutlich war der Effekt, wenn die Peptide intradermal verabreicht wurden. Eine Beeinflussung der Immunantwort durch die Art der Verabreichung wurde schon in früheren Studien beobachtet (Karanikas et al., 2001) und kann durch eine generell bessere Verbreitung des Antigens nach intradermaler Verabreichung oder durch eine unterschiedliche Gewebeverteilung MR-exprimierender APCs zustande kommen. Tatsächlich ist der MR auf DCs der Dermis reichlich vorhanden (Keler et al., 2004), wird jedoch von Langerhans Zellen in der Epidermis nicht exprimiert (Figdor et al., 2002; Mommaas et al., 1999).

Mit der Wahl des HPV16 E7-spezifischen Peptids wurde dieses Projekt in einen größeren, klinisch relevanten Zusammenhang gesetzt. Annähernd 100 % aller Zervixkarzinome werden durch eine anhaltende Infektion mit dem humanen Papillomavirus hervorgerufen (Bosch and de Sanjose, 2003). Vakzinierung mit langen HPV16 E7 Peptiden wurde bereits angewendet, um HPV16<sup>+</sup> Tumore in Mäusen zu bekämpfen (Zwaveling et al., 2002). In einer klinischen Phase I Studie wurden lange HPV16-Peptide zudem erfolgreich an Patienten mit Zervixkarzinom getestet und waren in der Lage, eine breite IFN $\gamma$ -assoziierte T-Zellantwort zu entfachen (Kenter et al., 2008). Die Tatsache, dass die SLP-vermittelte Immunantwort durch eine zielgerichtete Aufnahme über den MR noch weiter verbessert werden kann, eröffnet ganz neue Möglichkeiten zur Optimierung bereits genutzter therapeutischer Vakzine.

Im Gegensatz zu der Funktion des MR beim Auslösen einer effektiven CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort (Burgdorf et al., 2007; Burgdorf et al., 2006; Burgdorf et al., 2008)

---

sind DCs und andere MR-exprimierende Zellen auch in die Vermittlung von Toleranz involviert (Engering et al., 2002; van Kooyk et al., 2004).

Wie sich in einem anderen Projekt unserer Gruppe herauskristallisierte, ist der MR tatsächlich in der Lage, Toleranz zu vermitteln (Verena Schütte, unveröffentlicht). In Übereinstimmung mit dieser Erkenntnis löste das Targeting des MR in einigen Studien eine anti-inflammatorische, immunsuppressive Antwort aus (Allavena et al., 2010; Chieppa et al., 2003). Durch Zugabe von Endotoxin (TLR4-Ligand) kann dieser tolerogene Effekt jedoch überwunden werden (McKenzie et al., 2007). Auch gegen DEC205 gerichtete Impfstoffe verlangen eine gleichzeitige Verabreichung eines Adjuvans, um Immunität anstatt Toleranz zu vermitteln (Bonifaz et al., 2004). Frühere Studien unserer Gruppe zeigten bereits die Abhängigkeit der MR-vermittelten OVA-Kreuzpräsentation von TLR4 und MyD88 (Burgdorf et al., 2008). Für eine effiziente Immunantwort durch MR-gerichtete Vakzine ist es daher notwendig, die APC gleichzeitig durch ein Gefahren-Signal zu aktivieren. In diesem Sinne wurde in den hier gezeigten Experimenten den Mäusen bei der Vakzinierung neben den SLPs auch ein Adjuvans verabreicht, um die Entwicklung von Toleranz zu vermeiden.

## **7.2 Das Tyrosin-basierte Motiv im zytoplasmatischen Teil des MR ist bedeutsam für die MR-vermittelte OVA-Aufnahme**

Die molekularen Mechanismen der MR-vermittelten Antigenkreuzpräsentation sind seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschungsarbeit. Die mechanistischen Details der MR-Internalisierung wurden bisher allerdings nur anhand von chimären Rezeptoren beschrieben (Kruskal et al., 1992; Schweizer et al., 2000) und wurden daher im Rahmen dieser Arbeit am vollständigen Mannoserezeptor untersucht.

Übereinstimmend mit früheren Studien erwiesen sich sowohl die Transmembran-Domäne als auch die zytoplasmatische Domäne des MR als relevant für die Rezeptorinternalisierung (Abbildung 6-13) (Ezekowitz et al., 1990; Kruskal et al., 1992). Zwar ist die zytoplasmatische Domäne des MR mit dem Internalisierungssignal essentiell, aber nicht hinreichend für die MR-vermittelte OVA-Aufnahme. Sowohl die TM-Domäne als auch die zytoplasmatische Domäne des MR müssen für eine effektive Internalisierung vorhanden sein (Abbildung 6-13).

---

---

Wie in einigen Studien bereits beschrieben wurde, können Mutationen in der Transmembran-Domäne großen Einfluss auf die Funktionalität von Transmembranproteinen nehmen (Brandt-Rauf et al., 1990; Chung et al., 1989; Kruskal et al., 1992; Shaw et al., 1990). Über welchen Mechanismus die TM-Domäne die Internalisierung des MR beeinflusst, ist ungeklärt. Denkbar ist, dass die TM-Domäne selber ein Endozytosemotiv enthält oder die Endozytosemaschinerie direkt oder über ein anderes Transmembranprotein mit der TM-Domäne interagiert. Alternativ könnte die Konformation des zytosolischen Teils durch die TM-Domäne beeinflusst und somit Endozytose ermöglicht oder verhindert werden.

Wie Sequenzvergleiche der zytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren aus der MR Familie (MR, PLA<sub>2</sub>R, DEC-205 und Endo180) ergaben, befinden sich in jedem dieser Rezeptoren zwei konservierte Endozytose motive: ein Tyrosin-basiertes (FXNXXY) und ein di-hydrophobes (DXXXLL) Motiv (East and Isacke, 2002). Der LDL Rezeptor besitzt ein ganz ähnliches Motiv (FXNPXY), welches bei der LDL-vermittelten Endozytose eine entscheidende Rolle spielt (Chen et al., 1990).

Mehrere Studien weisen mittlerweile auf eine wichtige Funktion des Tyrosin aus dem FENTLY-Motiv im zytoplasmatischen Teil des humanen MR bei seiner Internalisierung hin (Kruskal et al., 1992; Schweizer et al., 2000). Auch im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Relevanz des Tyrosin<sup>1429</sup> am C-terminalen Ende des MR für die Internalisierung bestätigt (Abbildung 6-13). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Schweizer et al. wurde hier allerdings auch dem Phenylalanin<sup>1430</sup> eine Bedeutung bei der Internalisierung zugeschrieben (Abbildung 6-13).

Möglicherweise erklärt werden könnten diese Differenzen auf Grund der Verwendung der humanen MR Sequenz im einen Fall (Schweizer et al., 2000) und der murinen MR Sequenz in der vorliegenden Studie. Des Weiteren verwendeten Schweizer et al. chimäre Rezeptoren aus MR und CDMPR. Der Einfluss des CDMPRs auf die Tertiärstruktur der TM-Domäne und zytosolischen Domäne des MR ist jedoch nicht bekannt und könnte möglicherweise die Internalisierung verändern. Auch wurde bei Schweizer et al. generell die zelluläre Verteilung und die *steady state* Internalisierung des MR untersucht, wohingegen in dieser Doktorarbeit die spezifische Aufnahme eines Liganden durch den MR untersucht wurde. Möglicherweise hat die Bindung des Liganden einen Effekt auf die Tertiärstruktur

---

des MR, was zur Aggregation des Rezeptors und schließlich zur Internalisierung in die Zelle führen kann. Diese Art der Liganden-abhängigen Internalisierung wurde bereits für den EGF Rezeptor beschrieben (Glenney et al., 1988; Schlessinger, 1988).

Nachdem der MR seinen Liganden an der Zellmembran gebunden hat, wird dieser Komplex in Endosomen aufgenommen. Auf Grund des dort herrschenden leicht sauren Milieus wird die Bindung zwischen Rezeptor und Ligand aufgelöst und der Rezeptor wandert zurück an die Plasmamembran, um erneut für Endozytose zur Verfügung zu stehen (Tietze et al., 1980, 1982). Nicht nur die Internalisierung, sondern auch das Sortieren in die richtigen zellulären Kompartimente (statische/dynamische Endosomen) ist durch spezifische Signale im zytosolischen Teil des Rezeptors geregelt (Bonifacino and Traub, 2003).

Lakadamyali und Kollegen schlagen ein Modell vor, bei dem schon bei der Bildung der Clathrin-umhüllten Einbuchtung entschieden wird, in welche Sorte früher Endosomen ein Ligand aufgenommen wird. Hierbei wird zwischen dynamischen und statischen frühen Endosomen unterschieden. Material, welches abgebaut werden soll (z.B. LDL oder EGF), wird direkt in dynamische, schnell reifende Endosomen geleitet, wohingegen Material, das nach der Internalisierung wiederverwertet werden soll, in statische frühe Endosomen geschleust wird (Lakadamyali et al., 2006).

Im Einklang mit diesem Modell haben Schweizer et al. in ihren chimären Konstrukten das di-aromatische Motiv (YF) am C-terminalen Ende des MR als Sortier-Signal für die Aufnahme in frühe Endosomen identifiziert (Schweizer et al., 2000). In Anlehnung an diese Erkenntnis wäre es für zukünftige Studien interessant, die intrazelluläre Route der hier vorgestellten MR-Konstrukte und die Lokalisation in dynamischen oder statischen Endosomen in Abhängigkeit der Mutationen zu untersuchen.

Nach diesem ersten Experiment in humanen Hek293T Zellen wäre es weiterhin erforderlich, die Internalisierung der MR-Konstrukte auch in murinen BMDCs zu untersuchen. Speziell in diesen Zellen spielt die MR-vermittelte Antigenaufnahme eine entscheidende Rolle für die Funktion der Zellen, da sie die Grundlage für eine effektive Antigenkruzpräsentation und die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bildet (Burgdorf et al., 2007). Allerdings lassen sich BMDCs bekanntermaßen sehr

---

schlecht transfizieren. Die vielversprechendste Möglichkeit, BMDCs genetisch zu verändern, ist die lentivirale Transduktion. Jedoch ist auch diese Methode in ihrer Effektivität begrenzt, speziell durch die Größe der zu transportierenden DNA. Tatsächlich ist es unserer Gruppe in den letzten Jahren trotz zahlreicher Anläufe nicht gelungen, BMDCs lentiviral mit den sehr großen MR-Konstrukten zu transduzieren. Sobald dies gelingt, sollte in zukünftigen Untersuchungen der Effekt der hier vorgestellten MR-Mutanten auf die OVA-Aufnahme und die Sortierung in frühe Endosomen sowie die MR-vermittelte Kreuzpräsentation untersucht werden.

### **7.3 Das Adaptermolekül AP2 übernimmt eine wichtige Funktion bei der MR-Internalisierung und der MR-abhängigen Antigenkruzpräsentation**

Membranproteine, die über den Clathrin-Signalweg in die Zelle gelangen, werden über Adapterproteine in Clathrin-umhüllte Einbuchtungen aufgenommen. Diese Adapterproteine binden zum einen Clathrin und erkennen außerdem Signalsequenzen im zytosolischen Teil der Membranproteine.

Verschiedene Proteine, darunter AP2, Dab2 und Clathrin selber, spielen eine Rolle bei der Erkennung des NPXY Signals, welches verändert auch im MR vorkommt (Boll et al., 2002; Bonifacino and Traub, 2003; Kibbey et al., 1998). Des Weiteren konnte unsere Gruppe in früheren Experimenten AP2 an isolierten OVA<sup>+</sup>/MR<sup>+</sup> Endosomen nachweisen (nicht veröffentlicht), was uns veranlasste, die Rolle von AP2 bei der MR-vermittelten OVA-Aufnahme und der Antigenkruzpräsentation genauer zu untersuchen.

Da die  $\mu$ 2-Untereinheit des heterotetrameren AP2-Komplexes mit Tyrosin-basierten Sortier-Signalen interagiert (Boll et al., 2002; Ohno et al., 1995) und ein solches Signal in der zytoplasmatischen Domäne des MR vorhanden ist, wurde diese UE als Ziel für Knockdown-Experimente genutzt.

In der Tat bestätigen die Experimente dieser Arbeit eine Funktion von AP2 bei der MR-vermittelten OVA-Aufnahme (Abbildung 6-15). In der oben erwähnten Studie von Lakadamyali et al. führte der AP2  $\mu$ 2-Knockdown zu einer Dysbalance in der Verteilung der Endosomenpopulationen, sodass deutlich mehr dynamische und weniger statische Endosomen im Vergleich zur Kontrollsituation vorhanden waren (Lakadamyali et al., 2006). Eine reduzierte AP2-Expression resultiert also in einer vermehrten Aufnahme in dynamische Endosomen und dadurch in einem schnellen

lysosomalen Abbau. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die MR-Verteilung innerhalb der Zelle durch den Knockdown von AP2  $\mu$ 2 beeinflusst. Zwar bleibt die Gesamtmenge an MR-Molekülen in der Zelle unverändert, allerdings ist nach Behandlung mit AP2  $\mu$ 2-siRNA weniger MR an der Zelloberfläche vorhanden (Abbildung 6-16). Nach AP2-Knockdown wird der MR-Ligand-Komplex möglicherweise statt in statische bevorzugt in dynamische Endosomen aufgenommen, welche schneller zu Lysosomen reifen und dadurch den Abbau von Proteinen begünstigen. Der MR kann auf diese Weise nicht wieder an die Zellmembran gebracht werden und nicht weiter für Endozytose verwendet werden, was die beobachtete verminderte OVA-Aufnahme hervorruft.

Auffallend ist, dass die OVA-Aufnahme durch verminderte AP2  $\mu$ 2-Expression zwar verringert, aber nicht komplett gehemmt wird. Das mag zum einen an einer (nicht detektierbaren) Restexpression von AP2  $\mu$ 2 nach dem siRNA-Knockdown liegen. Da ein Knockdown nie vollständig ist, ist möglicherweise noch genug Protein vorhanden, um einige OVA-beladene MR-Moleküle in die Zelle zu leiten. Endgültigen Aufschluss über die Rolle von AP2 bei der MR-Internalisierung können nur Versuche mit AP2-Knockout-Zellen geben. Jedoch stehen solche Zellen nicht zur Verfügung, da AP2  $\mu$ 2-defiziente Mäuse sehr früh während der Embryonalentwicklung sterben (Mitsunari et al., 2005).

Alternativ könnten in dem hier untersuchten System auch andere Adapterproteine für AP2 einspringen und sein Fehlen kompensieren. Dab2 und ARH sind beispielsweise in der Lage, NPXY Motive zu binden (He et al., 2002; Maurer and Cooper, 2006; Mishra et al., 2002a; Mishra et al., 2002b) und sind infolgedessen möglicherweise auch in die MR-Internalisierung involviert. Zukünftige Studien sollten zur Klärung dieser Möglichkeit beitragen.

Trotz der Rolle, die AP2 bei der MR-Internalisierung zukommt, ist eine Interaktion der beiden Proteine bisher noch nicht nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Interaktion der endogenen Proteine mittels Co-Immunopräzipitation in Zelllysaten zu bestätigen (nicht gezeigt). Leider gelang es mit dieser Methode nicht, die Interaktion des MR mit AP2 zu belegen, dies bedeutet jedoch keineswegs, dass keine Bindung stattfindet. Die Interaktion zwischen Adaptermolekülen und Sortier-Signalen ist relativ schwach, ihre Dissoziationskonstanten liegen im mikromolaren Bereich (Owen et al., 2004).

---

---

Infolgedessen scheint es nahezu unmöglich, die Interaktion der endogenen Proteine mittels Co-IP zu detektieren. In den letzten Jahren haben sich das Hefe-Zwei-Hybrid-System und die Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie als hilfreich erwiesen, um die schwache Interaktion zwischen Adapterproteinen und Rezeptoren nachzuweisen (Honing et al., 2005; Janvier et al., 2003). Diese Methoden sollten in Zukunft genutzt werden, um die Interaktion des MR mit AP2 zu bestätigen. Auch der Effekt von Mutationen im di-aromatischen Motiv des MR auf die Interaktion zwischen AP2 und MR sollte zukünftig überprüft werden.

Neben seiner Funktion bei der Rezeptorinternalisierung spielt AP2 auch bei der Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln eine entscheidende Rolle. AP2-Knockdown führt zu einem zwölfmal geringeren Vorkommen von Clathrin-umhüllten Einbuchtungen an der Plasmamembran (Motley et al., 2003). Selbst wenn AP2 nicht an den MR binden und dessen Internalisierung initiieren sollte, kann der Knockdown die Clathrin-abhängige MR-Internalisierung zumindest auf diese Weise beeinflussen.

Nachdem die Abhängigkeit der MR-vermittelte OVA-Aufnahme von AP2 gezeigt worden war, war der beobachtete hemmende Effekt des AP2-Knockdown auf die OVA-Kreuzpräsentation nicht überraschend (Abbildung 6-17), da bekanntermaßen die Aufnahme über den MR ein erster wichtiger Schritt für die OVA-Kreuzpräsentation ist (Burgdorf et al., 2007).

Unerwartet jedoch war die Beeinträchtigung der MHCII-bedingten Präsentation von OVA durch den Knockdown von AP2  $\mu 2$ . Dieses Ergebnis könnte durch folgende Umstände erklärt werden: Neu synthetisierte MHCII  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten werden im ER mit der invarianten Kette (Ii) verknüpft und von dort über das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) – entweder direkt oder über die Plasmamembran – in endosomale Kompartimente geleitet, um anschließend mit Peptiden beladen zu werden (Neefjes et al., 2011). Wie in früheren Studien gezeigt wurde, bindet die invariante Kette (Ii) AP2, höchstwahrscheinlich die  $\mu 2$ -UE, mit hoher Affinität (Hofmann et al., 1999). Zwei di-Leucin basierte Motive im zytoplasmatischen Teil von Ii sind hierbei kritisch für die Bindung und somit die Clathrin-abhängige Aufnahme der  $\alpha$ - $\beta$ -Ii-Komplexe von der Plasmamembran (Bremnes et al., 1994; Odorizzi et al., 1994; Roche et al., 1993). Zwar scheint die Menge an MHCII-Molekülen an der Zellmembran durch den AP2  $\mu 2$ -Knockdown nicht beeinflusst zu

---

---

werden (Abbildung 6-19), jedoch könnte die Internalisierung der  $\alpha$ - $\beta$ -Li-Komplexe gestört sein und somit könnten weniger MHCII-Moleküle zur Peptidbeladung in Lysosomen zur Verfügung stehen.

#### **7.4 Durchflusszytometrische Charakterisierung Antigen-beladener**

##### **Endosomen**

Durch den MR gespeiste Antigen-beladene Endosomen spielen eine zentrale Rolle bei der Antigenkreuzpräsentation. Sie ermöglichen eine langfristige Lagerung des Antigens und tragen somit zu einer effektiven Kreuzpräsentation über einen langen Zeitraum hinweg und schließlich zu einer effizienten Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei. An diesen OVA<sup>+</sup> Kompartimenten sind wichtige Komponenten der Kreuzpräsentationsmaschinerie wie MHCI, TAP, p97 (Burgdorf et al., 2008; Zehner et al., 2011) oder das Immunoproteasom (Abbildung 6-26) vorhanden. Eine Methode zur genaueren Untersuchung der Proteinzusammensetzung dieser Kompartimente verspricht daher, weiter Aufschluss über die molekularen Mechanismen der Kreuzpräsentation zu liefern.

Zwar war die Isolierung von Phagosomen mit partikelförmigen Antigenen schon vor einiger Zeit geglückt (Ackerman et al., 2003; Guermonprez et al., 2003; Houde et al., 2003), die Aufreinigung von Endosomen mit löslichen Antigenen gestaltete sich allerdings schwieriger. Mehrere Gruppen haben Methoden zur Aufreinigung von Endosomen publiziert, die auf zeitintensiver Dichtegradientenzentrifugation beruhen (de Araujo et al., 2008; Singer-Kruger et al., 1993). Ein Nachteil hierbei ist, dass Vesikel mit ähnlicher Dichte nicht voneinander getrennt und unabhängig voneinander untersucht werden können.

In den letzten Jahren hat unsere Gruppe (Achmet Imam Chasan, Matthias Zehner) eine Methode entwickelt, mit der über den MR-beladene OVA<sup>+</sup> Endosomen schnell und einfach isoliert werden können und ihre Proteinzusammensetzung mittels Durchflusszytometrie analysiert werden kann (Zehner et al., 2012). Auf diese Weise stehen für jedes einzelne, isolierte Vesikel Informationen zur Verfügung. Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit, die Ergebnisse anschließend zu quantifizieren und somit auch statistische Auswertungen durchzuführen.

Mit der in unserer Gruppe entwickelten Methode ist es möglich, in Zukunft noch ungeklärte mechanistische Details der Antigenkreuzpräsentation, beispielsweise



---

die Frage nach dem verantwortlichen Transportkanal für den Export von OVA ins Zytoplasma, zu klären.

### **7.5 Das Immunoproteasom übernimmt eine wichtige Funktion bei der OVA-Kreuzpräsentation**

Das Immunoproteasom wird in einigen hämatopoetischen Zellen, einschließlich DCs, konstitutiv exprimiert und kann in anderen Zellen durch IFN $\gamma$  induziert werden (Macagno et al., 1999; Macagno et al., 2001; Nil et al., 2004; Tanaka, 1994). Hierbei werden die katalytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5) bei der Neubildung von Proteasomen durch die induzierbaren Immunoproteasom-Untereinheiten LMP2 ( $\beta$ 1i), LMP7 ( $\beta$ 5i) und MECL-1 ( $\beta$ 2i) ersetzt. Infolgedessen verändert sich die katalytische Aktivität, was schließlich zu einer vermehrten Herstellung von Peptiden für die Präsentation auf MHCI-Molekülen führt (Schwarz et al., 2000; Sijts et al., 2000b; Toes et al., 2001). Das Immunoproteasom gestaltet somit das Repertoire an antigenen Peptiden (Chen et al., 2001; Kincaid et al., 2012). Tatsächlich zeigen Mäuse, denen die drei katalytischen Immunoproteasom-Untereinheiten fehlen, Mängel bei der Präsentation verschiedener MHCI-Epitope, unter anderem auch bei der Präsentation des Modellantigens Ovalbumin (Kincaid et al., 2012).

In der vorliegenden Studie wurde darüber hinaus eine Rolle des Immunoproteasoms bei der *in vitro* OVA-Kreuzpräsentation bestätigt (Abbildung 6-21). Erste Hinweise darauf wurden in früheren Studien bereits durch die Verwendung von generellen Proteasominhibitoren gewonnen (Burgdorf et al., 2006; Burgdorf et al., 2008). Diese haben allerdings einen breitgefächerten Effekt (bis hin zum Zelltod) und beeinträchtigen dadurch vielseitige zelluläre Vorgänge. Durch die Verwendung spezifischer siRNA gegen einzelne Untereinheiten können die beobachteten Effekte speziell auf das Fehlen einer UE zurückgeführt werden. Auch Experimente mit LMP2<sup>-/-</sup> und LMP7<sup>-/-</sup> BMDCs liefern einen eindeutigen Hinweis auf die Bedeutung einzelner Untereinheiten des Immunoproteasoms bei der Antigenkreuzpräsentation (Abbildung 6-21). Da weder die Beladung der MHCI-Moleküle mit SIINFEKL noch die Aufnahme des Antigens in die Zellen oder die Weiterleitung in frühe Endosomen durch das Fehlen der Immunoproteasom-UE beeinträchtigt wird (Abbildung 6-21, Abbildung 6-22), scheint tatsächlich die

erschwerter Prozessierung des Antigens für die verminderte Kreuzpräsentation verantwortlich zu sein.

Dabei hat das Fehlen der LMP7-UE einen größeren Effekt auf die Antigenkruzpräsentation als das der LMP2-UE (Abbildung 6-21). Diese Ergebnisse stimmen mit Erkenntnissen aus früheren Studien überein, die eine deutlich reduzierte MHCI-Oberflächenexpression in LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen beobachteten (Fehling et al., 1994), wohingegen die MHCI-Oberflächenexpression in LMP2<sup>-/-</sup> Mäusen nur geringfügig beeinflusst war (Van Kaer et al., 1994). Die reduzierte MHCI-Expression wird auf die Abwesenheit passender Peptide, die für die korrekte Faltung, den Transport und schließlich die Stabilität der MHCI-Moleküle erforderlich sind, zurückgeführt. Diese Hinweise deuten darauf hin, dass LMP7 eine größere Rolle bei der Generierung der OVA-MHCI-Peptide spielt als LMP2. Auffälliger Weise zeigen LMP7<sup>-/-</sup> Mäuse auch eine reduzierte LMP2-Expression (Abbildung 6-21 C). Die Expression der Antigentransporter TAP1 und TAP2 in LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen ist nicht verringert (Fehling et al., 1994), der Transport antigener Peptide in die Kompartimente, in welchen die Beladung der MHCI-Moleküle zur Kreuzpräsentation erfolgt, wird also nicht beeinträchtigt.

Damit die Peptide nach der Prozessierung durch das Immunoproteasom nicht durch weiteren Abbau zerstört werden, ist eine unmittelbarer Nähe des Proteasekomplexes zu den frühen Endosomen, in welche die Peptide nach dem proteasomalen Abbau wieder aufgenommen werden und von wo aus sie effektiv kruzpräsentiert werden, nötig. Diese räumliche Nähe wurde an Phagosomen schon vor einiger Zeit nachgewiesen (Houde et al., 2003) und im Rahmen dieser Arbeit mittels Fluoreszenzmikroskopie auch für Endosomen bestätigt (Abbildung 6-23). Weiterhin wurde die oben beschriebene neue Methode der endosomalen Durchflusszytometrie (6.4) verwendet, um die Rekrutierung des Immunoproteasoms an Antigen-beladene Endosomen nachzuweisen. Unglücklicherweise stellte sich im Laufe der Experimente heraus, dass die gezeigten Färbungen unspezifisch zu sein scheinen (Abbildung 6-27). Höchstwahrscheinlich werden nach dem Knockout von LMP2 und LMP7 die konstitutiven Untereinheiten ( $\beta$ 1 und  $\beta$ 5) wieder ins Proteasom eingebaut und möglicherweise ähneln diese LMP2 und LMP7 so sehr, dass sie von den

verwendeten Antikörpern erkannt werden. Wie vorangegangene Experimente mit den gleichen Antikörpern allerdings zeigten, binden die Antikörper zumindest im Western Blot (Abbildung 6-21) und in der FACS-Färbung von Zellen (nicht gezeigt) sehr spezifisch nur an die gewünschte Untereinheit. Im Laufe der Arbeit wurden diverse  $\alpha$ LMP2- und  $\alpha$ LMP7-Antikörper getestet, die hier verwendeten Antikörper waren die einzigen, die in der Endosomenfärbung überhaupt ein Signal zeigten.

Um das Problem der Antikörperspezifität zu umgehen, wurde in einem weiteren Ansatz versucht, BMDCs mit LMP2- und 7-GFP-Fusionsproteinen zu transduzieren und diese für die Endosomenfärbung zu verwenden. Prinzipiell ist es möglich, GFP-Fusionsproteine an Endosomen mittels Durchflusszytometrie nachzuweisen, jedoch erfordert dies eine effektive Transduktion der Zellen mit den Fusionsproteinen. In diesem Fall gestaltete sich selbst die lentivirale Transduktion von BMDCs mit den Fusionsproteinen schwierig. Mit den erreichten 15 % war die Transduktionseffizienz mit den LMP2- und LMP7-GFP-Fusionsproteinen in BMDCs nicht ausreichend, um genug transduzierte Zellen für die Endosomenpräparation zur Verfügung zu stellen.

Bezüglich der Rolle des Immunoproteasoms bei der MR-vermittelten Kreuzpräsentation ist eine Reihe an Fragen nach wie vor offen. Hierunter fällt beispielsweise die Frage, ob der Effekt der LMP2 und LMP7 Herunterregulation auf die Kreuzpräsentation ausschließlich durch eine veränderte katalytische Aktivität verursacht wird, oder ob womöglich auch die Rekrutierung und die Mobilität des Proteasoms beeinflusst werden.

Die wohl bedeutsamste Frage ist, über welchen Mechanismus das Immunoproteasom an die Endosomen rekrutiert wird. Die AAA ATPase p97 spielt eine wichtige Rolle bei der Antigenkruzpräsentation und ist an OVA<sup>+</sup> Endosomen vorhanden (Ackerman et al., 2006; Giodini et al., 2009; Zehner et al., 2011). Zudem interagiert p97 mit dem Proteasom (Besche et al., 2009; Dai et al., 1998; Isakov and Stanhill, 2011) und ist möglicherweise für die Rekrutierung des Proteasoms an ER Proteine verantwortlich (Ikeda et al., 2009). Vor diesem Hintergrund ist eine Funktion von p97 bei der Rekrutierung des Immunoproteasoms an OVA<sup>+</sup> Endosomen denkbar. Zukünftige Studien sollten die Bedeutung von p97 bei der Proteasomrekrutierung klären.

Weiterhin wäre es interessant, zu untersuchen, ob die Rekrutierung des Proteasoms an die Endosomen eine notwendige Voraussetzung für die Kreuzpräsentation ist. Die Interaktion von p97 mit dem Proteasom erfolgt nicht direkt, sondern wird über die Verbindungsmoleküle Dsk2 und Rad23 vermittelt (Chen and Madura, 2002; Elsasser et al., 2004; Richly et al., 2005; Wilkinson et al., 2001). Auf Grund dessen könnte in einem zukünftigen Experiment durch Knockdown der Verbindungsmoleküle die Proteasomrekrutierung gestört werden und anschließend der Effekt auf die Antigenkreuzpräsentation analysiert werden.

## Literaturverzeichnis

Ackerman, A.L., and Cresswell, P. (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* 5, 678-684.

Ackerman, A.L., Giodini, A., and Cresswell, P. (2006). A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25, 607-617.

Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampe, R., and Cresswell, P. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12889-12894.

Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampe, R., and Cresswell, P. (2005). Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 107-113.

Agnes, M.C., Tan, A., Jordens, R., Geluk, A., Roep, B.O., Ottenhoff, T., Drijfhout, J.W., and Koning, F. (1998). Strongly increased efficiency of altered peptide ligands by mannosylation. *International immunology* 10, 1299-1304.

Alegre, M.L., Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature reviews Immunology* 1, 220-228.

Allavena, P., Chieppa, M., Bianchi, G., Solinas, G., Fabbri, M., Laskarin, G., and Mantovani, A. (2010). Engagement of the mannose receptor by tumoral mucins activates an immune suppressive phenotype in human tumor-associated macrophages. *Clinical & developmental immunology* 2010, 547179.

Apostolopoulos, V., Pietersz, G.A., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., and McKenzie, I.F. (2000). Aldehyde-mannan antigen complexes target the MHC class I antigen-presentation pathway. *European journal of immunology* 30, 1714-1723.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 18, 767-811.

Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunology and cell biology* 76, 34-40.

Bertholet, S., Goldszmid, R., Morrot, A., Debrabant, A., Afrin, F., Collazo-Custodio, C., Houde, M., Desjardins, M., Sher, A., and Sacks, D. (2006). Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *J Immunol* 177, 3525-3533.

---

Besche, H.C., Haas, W., Gygi, S.P., and Goldberg, A.L. (2009). Isolation of mammalian 26S proteasomes and p97/VCP complexes using the ubiquitin-like domain from HHR23B reveals novel proteasome-associated proteins. *Biochemistry* 48, 2538-2549.

Bevan, M.J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *The Journal of experimental medicine* 143, 1283-1288.

Bijker, M.S., van den Eeden, S.J., Franken, K.L., Melief, C.J., van der Burg, S.H., and Offringa, R. (2008). Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *European journal of immunology* 38, 1033-1042.

Blanchard, N., Kanaseki, T., Escobar, H., Delebecque, F., Nagarajan, N.A., Reyes-Vargas, E., Crockett, D.K., Raulet, D.H., Delgado, J.C., and Shastri, N. (2010). Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing defines the composition and structure of MHC class I peptide repertoire in normal and virus-infected cells. *J Immunol* 184, 3033-3042.

Boes, B., Hengel, H., Ruppert, T., Multhaup, G., Koszinowski, U.H., and Kloetzel, P.M. (1994). Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *The Journal of experimental medicine* 179, 901-909.

Boll, W., Rapoport, I., Brunner, C., Modis, Y., Prehn, S., and Kirchhausen, T. (2002). The mu2 subunit of the clathrin adaptor AP-2 binds to FDNPVY and YppO sorting signals at distinct sites. *Traffic* 3, 590-600.

Bonifacino, J.S., and Traub, L.M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annual review of biochemistry* 72, 395-447.

Bonifaz, L.C., Bonnyay, D.P., Charalambous, A., Darguste, D.I., Fujii, S., Soares, H., Brimnes, M.K., Moltedo, B., Moran, T.M., and Steinman, R.M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *The Journal of experimental medicine* 199, 815-824.

Bosch, F.X., and de Sanjose, S. (2003). Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 3-13.

Brandt-Rauf, P.W., Rackovsky, S., and Pincus, M.R. (1990). Correlation of the structure of the transmembrane domain of the neu oncogene-encoded p185 protein with its function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 8660-8664.

Bremnes, B., Madsen, T., Gedde-Dahl, M., and Bakke, O. (1994). An LI and ML motif in the cytoplasmic tail of the MHC-associated invariant chain mediate rapid internalization. *Journal of cell science* 107 ( Pt 7), 2021-2032.

---

Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P.A., and Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 316, 612-616.

Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., and Kurts, C. (2006). The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J Immunol* 176, 6770-6776.

Burgdorf, S., Scholz, C., Kautz, A., Tampe, R., and Kurts, C. (2008). Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol* 9, 558-566.

Cerdan, C., Martin, Y., Courcoul, M., Mawas, C., Birg, F., and Olive, D. (1995). CD28 costimulation regulates long-term expression of the three genes (alpha, beta, gamma) encoding the high-affinity IL2 receptor. *Research in immunology* 146, 164-168.

Chakraborty, P., Ghosh, D., and Basu, M.K. (2001). Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes. *The Journal of parasitology* 87, 1023-1027.

Chambers, C.A., and Allison, J.P. (1999). Costimulatory regulation of T cell function. *Current opinion in cell biology* 11, 203-210.

Chatterjee, B., Smed-Sorensen, A., Cohn, L., Chalouni, C., Vandlen, R., Lee, B.C., Widger, J., Keler, T., Delamarre, L., and Mellman, I. (2012). Internalization and endosomal degradation of receptor-bound antigens regulate the efficiency of cross presentation by human dendritic cells. *Blood* 120, 2011-2020.

Chen, L., and Madura, K. (2002). Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Molecular and cellular biology* 22, 4902-4913.

Chen, W., Norbury, C.C., Cho, Y., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2001). Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *The Journal of experimental medicine* 193, 1319-1326.

Chen, W.J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *The Journal of biological chemistry* 265, 3116-3123.

Chieppa, M., Bianchi, G., Doni, A., Del Prete, A., Sironi, M., Laskarin, G., Monti, P., Piemonti, L., Biondi, A., Mantovani, A., *et al.* (2003). Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J Immunol* 171, 4552-4560.

Chung, S.W., Wolff, L., and Ruscetti, S.K. (1989). Transmembrane domain of the envelope gene of a polycythemia-inducing retrovirus determines erythropoietin-independent growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 7957-7960.

---

- Ciechanover, A. (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 79-87.
- Collins, B.M., McCoy, A.J., Kent, H.M., Evans, P.R., and Owen, D.J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* 109, 523-535.
- Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T., and Diedrich, G. (1999). The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunological reviews* 172, 21-28.
- Curtsinger, J.M., and Mescher, M.F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* 22, 333-340.
- Dai, R.M., Chen, E., Longo, D.L., Gorbea, C.M., and Li, C.C. (1998). Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha. *The Journal of biological chemistry* 273, 3562-3573.
- de Araujo, M.E., Huber, L.A., and Stasyk, T. (2008). Isolation of endocytic organelles by density gradient centrifugation. *Methods Mol Biol* 424, 317-331.
- de Verteuil, D., Muratore-Schroeder, T.L., Granados, D.P., Fortier, M.H., Hardy, M.P., Bramouille, A., Caron, E., Vincent, K., Mader, S., Lemieux, S., *et al.* (2010). Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 9, 2034-2047.
- East, L., and Isacke, C.M. (2002). The mannose receptor family. *Biochimica et biophysica acta* 1572, 364-386.
- Elsasser, S., Chandler-Militello, D., Muller, B., Hanna, J., and Finley, D. (2004). Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *The Journal of biological chemistry* 279, 26817-26822.
- Engering, A., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2002). Immune escape through C-type lectins on dendritic cells. *Trends in immunology* 23, 480-485.
- Engering, A.J., Cella, M., Fluitsma, D., Brockhaus, M., Hoefsmit, E.C., Lanzavecchia, A., and Pieters, J. (1997). The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *European journal of immunology* 27, 2417-2425.
- Ezekowitz, R.A., Sastry, K., Bailly, P., and Warner, A. (1990). Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *The Journal of experimental medicine* 172, 1785-1794.
- Fehling, H.J., Swat, W., Laplace, C., Kuhn, R., Rajewsky, K., Muller, U., and von Boehmer, H. (1994). MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* 265, 1234-1237.
-



Figdor, C.G., van Kooyk, Y., and Adema, G.J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature reviews Immunology* 2, 77-84.

Firat, E., Saveanu, L., Aichele, P., Staeheli, P., Huai, J., Gaedicke, S., Nil, A., Besin, G., Kanzler, B., van Endert, P., *et al.* (2007). The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *J Immunol* 178, 2241-2248.

Gaidarov, I., and Keen, J.H. (1999). Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *The Journal of cell biology* 146, 755-764.

Gatti, E., and Pierre, P. (2003). Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Current opinion in cell biology* 15, 468-473.

Gazi, U., and Martinez-Pomares, L. (2009). Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology* 214, 554-561.

Geijtenbeek, T.B., Krooshoop, D.J., Bleijs, D.A., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2000). DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 1, 353-357.

Geissmann, F., Launay, P., Pasquier, B., Lepelletier, Y., Leborgne, M., Lehuen, A., Brousse, N., and Monteiro, R.C. (2001). A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes. *J Immunol* 166, 346-352.

Gerdes, N., and Zirlik, A. (2011). Co-stimulatory molecules in and beyond co-stimulation - tipping the balance in atherosclerosis? *Thrombosis and haemostasis* 106, 804-813.

Giodini, A., and Cresswell, P. (2008). Hsp90-mediated cytosolic refolding of exogenous proteins internalized by dendritic cells. *The EMBO journal* 27, 201-211.

Giodini, A., Rahner, C., and Cresswell, P. (2009). Receptor-mediated phagocytosis elicits cross-presentation in nonprofessional antigen-presenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 3324-3329.

Glenney, J.R., Jr., Chen, W.S., Lazar, C.S., Walton, G.M., Zokas, L.M., Rosenfeld, M.G., and Gill, G.N. (1988). Ligand-induced endocytosis of the EGF receptor is blocked by mutational inactivation and by microinjection of anti-phosphotyrosine antibodies. *Cell* 52, 675-684.

Gonzalo, J.A., Delaney, T., Corcoran, J., Goodearl, A., Gutierrez-Ramos, J.C., and Coyle, A.J. (2001). Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol* 166, 1-5.

---

Groettrup, M., Kirk, C.J., and Basler, M. (2010). Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nature reviews Immunology* 10, 73-78.

Groger, M., Holnthoner, W., Maurer, D., Lechleitner, S., Wolff, K., Mayr, B.B., Lubitz, W., and Petzelbauer, P. (2000). Dermal microvascular endothelial cells express the 180-kDa macrophage mannose receptor in situ and in vitro. *J Immunol* 165, 5428-5434.

Guermonez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402.

Guermonez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology* 20, 621-667.

Hashimoto, M., Morimoto, M., Saimoto, H., Shigemasa, Y., Yanagie, H., Eriguchi, M., and Sato, T. (2006). Gene transfer by DNA/mannosylated chitosan complexes into mouse peritoneal macrophages. *Biotechnology letters* 28, 815-821.

Hattori, Y., Kawakami, S., Suzuki, S., Yamashita, F., and Hashida, M. (2004). Enhancement of immune responses by DNA vaccination through targeted gene delivery using mannosylated cationic liposome formulations following intravenous administration in mice. *Biochemical and biophysical research communications* 317, 992-999.

He, G., Gupta, S., Yi, M., Michaely, P., Hobbs, H.H., and Cohen, J.C. (2002). ARH is a modular adaptor protein that interacts with the LDL receptor, clathrin, and AP-2. *The Journal of biological chemistry* 277, 44044-44049.

He, L.Z., Crocker, A., Lee, J., Mendoza-Ramirez, J., Wang, X.T., Vitale, L.A., O'Neill, T., Petromilli, C., Zhang, H.F., Lopez, J., *et al.* (2007). Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. *J Immunol* 178, 6259-6267.

He, L.Z., Ramakrishna, V., Connolly, J.E., Wang, X.T., Smith, P.A., Jones, C.L., Valkova-Valchanova, M., Arunakumari, A., Trembl, J.F., Goldstein, J., *et al.* (2004). A novel human cancer vaccine elicits cellular responses to the tumor-associated antigen, human chorionic gonadotropin beta. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 1920-1927.

Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nature reviews Immunology* 1, 126-134.

Hofmann, M.W., Honing, S., Rodionov, D., Dobberstein, B., von Figura, K., and Bakke, O. (1999). The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *The Journal of biological chemistry* 274, 36153-36158.

Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.

---

- Honing, S., Ricotta, D., Krauss, M., Spate, K., Spolaore, B., Motley, A., Robinson, M., Robinson, C., Haucke, V., and Owen, D.J. (2005). Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Molecular cell* 18, 519-531.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., and Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.
- Ikeda, Y., Demartino, G.N., Brown, M.S., Lee, J.N., Goldstein, J.L., and Ye, J. (2009). Regulated endoplasmic reticulum-associated degradation of a polytopic protein: p97 recruits proteasomes to Insig-1 before extraction from membranes. *The Journal of biological chemistry* 284, 34889-34900.
- Imai, J., Hasegawa, H., Maruya, M., Koyasu, S., and Yahara, I. (2005). Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. *International immunology* 17, 45-53.
- Isakov, E., and Stanhill, A. (2011). Stalled proteasomes are directly relieved by P97 recruitment. *The Journal of biological chemistry* 286, 30274-30283.
- Jain, J., Loh, C., and Rao, A. (1995). Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 7, 333-342.
- Jain, S., Singh, P., Mishra, V., and Vyas, S.P. (2005). Mannosylated niosomes as adjuvant-carrier system for oral genetic immunization against hepatitis B. *Immunology letters* 101, 41-49.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2002). *Immunologie*, 5. Auflage edn (Spektrum akad. Verl. ).
- Janvier, K., Kato, Y., Boehm, M., Rose, J.R., Martina, J.A., Kim, B.Y., Venkatesan, S., and Bonifacino, J.S. (2003). Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes. *The Journal of cell biology* 163, 1281-1290.
- Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375, 151-155.
- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews Immunology* 12, 557-569.
- Karanikas, V., Thynne, G., Mitchell, P., Ong, C.S., Gunawardana, D., Blum, R., Pearson, J., Lodding, J., Pietersz, G., Broadbent, R., *et al.* (2001). Mannan mucin-1 peptide immunization: influence of cyclophosphamide and the route of injection. *J Immunother* 24, 172-183.
- Karttunen, J., Sanderson, S., and Shastri, N. (1992). Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning
-

strategy for T-cell antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6020-6024.

Kawakami, S., Sato, A., Nishikawa, M., Yamashita, F., and Hashida, M. (2000). Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes. *Gene therapy* 7, 292-299.

Keler, T., Ramakrishna, V., and Fanger, M.W. (2004). Mannose receptor-targeted vaccines. *Expert opinion on biological therapy* 4, 1953-1962.

Kelly, A., Powis, S.H., Glynne, R., Radley, E., Beck, S., and Trowsdale, J. (1991). Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* 353, 667-668.

Kenter, G.G., Welters, M.J., Valentijn, A.R., Lowik, M.J., Berends-van der Meer, D.M., Vloon, A.P., Drijfhout, J.W., Wafelman, A.R., Oostendorp, J., Fleuren, G.J., *et al.* (2008). Phase I immunotherapeutic trial with long peptides spanning the E6 and E7 sequences of high-risk human papillomavirus 16 in end-stage cervical cancer patients shows low toxicity and robust immunogenicity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 169-177.

Kenter, G.G., Welters, M.J., Valentijn, A.R., Lowik, M.J., Berends-van der Meer, D.M., Vloon, A.P., Essahsah, F., Fathors, L.M., Offringa, R., Drijfhout, J.W., *et al.* (2009). Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *The New England journal of medicine* 361, 1838-1847.

Khan, S., Bijker, M.S., Weterings, J.J., Tanke, H.J., Adema, G.J., van Hall, T., Drijfhout, J.W., Melief, C.J., Overkleeft, H.S., van der Marel, G.A., *et al.* (2007). Distinct uptake mechanisms but similar intracellular processing of two different toll-like receptor ligand-peptide conjugates in dendritic cells. *The Journal of biological chemistry* 282, 21145-21159.

Kibbey, R.G., Rizo, J., Gierasch, L.M., and Anderson, R.G. (1998). The LDL receptor clustering motif interacts with the clathrin terminal domain in a reverse turn conformation. *The Journal of cell biology* 142, 59-67.

Kim, T.H., Jin, H., Kim, H.W., Cho, M.H., and Cho, C.S. (2006). Mannosylated chitosan nanoparticle-based cytokine gene therapy suppressed cancer growth in BALB/c mice bearing CT-26 carcinoma cells. *Molecular cancer therapeutics* 5, 1723-1732.

Kincaid, E.Z., Che, J.W., York, I., Escobar, H., Reyes-Vargas, E., Delgado, J.C., Welsh, R.M., Karow, M.L., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., *et al.* (2012). Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nat Immunol* 13, 129-135.

Kloetzel, P.M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 179-187.

Kovacsovics-Bankowski, M., and Rock, K.L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267, 243-246.

---

Kreutz, M., Giquel, B., Hu, Q., Abuknesha, R., Uematsu, S., Akira, S., Nestle, F.O., and Diebold, S.S. (2012). Antibody-antigen-adjuvant conjugates enable co-delivery of antigen and adjuvant to dendritic cells in cis but only have partial targeting specificity. *PLoS One* 7, e40208.

Kruskal, B.A., Sastry, K., Warner, A.B., Mathieu, C.E., and Ezekowitz, R.A. (1992). Phagocytic chimeric receptors require both transmembrane and cytoplasmic domains from the mannose receptor. *The Journal of experimental medicine* 176, 1673-1680.

Kuckelkorn, U., Frentzel, S., Kraft, R., Kostka, S., Groettrup, M., and Kloetzel, P.M. (1995). Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma. *European journal of immunology* 25, 2605-2611.

Kurotaki, T., Tamura, Y., Ueda, G., Oura, J., Kutomi, G., Hirohashi, Y., Sahara, H., Torigoe, T., Hiratsuka, H., Sunakawa, H., *et al.* (2007). Efficient cross-presentation by heat shock protein 90-peptide complex-loaded dendritic cells via an endosomal pathway. *J Immunol* 179, 1803-1813.

Kurts, C., Robinson, B.W., and Knolle, P.A. (2010). Cross-priming in health and disease. *Nature reviews Immunology* 10, 403-414.

Lakadamyali, M., Rust, M.J., and Zhuang, X. (2006). Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* 124, 997-1009.

Lee, S.J., Evers, S., Roeder, D., Parlow, A.F., Risteli, J., Risteli, L., Lee, Y.C., Feizi, T., Langen, H., and Nussenzweig, M.C. (2002). Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science* 295, 1898-1901.

Lemmon, S.K. (2001). Clathrin uncoating: Auxilin comes to life. *Current biology* : CB 11, R49-52.

Leteux, C., Chai, W., Loveless, R.W., Yuen, C.T., Uhlin-Hansen, L., Combarnous, Y., Jankovic, M., Maric, S.C., Misulovin, Z., Nussenzweig, M.C., *et al.* (2000). The cysteine-rich domain of the macrophage mannose receptor is a multispecific lectin that recognizes chondroitin sulfates A and B and sulfated oligosaccharides of blood group Lewis(a) and Lewis(x) types in addition to the sulfated N-glycans of lutropin. *The Journal of experimental medicine* 191, 1117-1126.

Lilley, B.N., and Ploegh, H.L. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429, 834-840.

Linehan, S.A., Martinez-Pomares, L., Stahl, P.D., and Gordon, S. (1999). Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 189, 1961-1972.

---

Liu, Y., Chirino, A.J., Misulovin, Z., Leteux, C., Feizi, T., Nussenzweig, M.C., and Bjorkman, P.J. (2000). Crystal structure of the cysteine-rich domain of mannose receptor complexed with a sulfated carbohydrate ligand. *The Journal of experimental medicine* *191*, 1105-1116.

Macagno, A., Gilliet, M., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Nestle, F.O., and Groettrup, M. (1999). Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation. *European journal of immunology* *29*, 4037-4042.

Macagno, A., Kuehn, L., de Giuli, R., and Groettrup, M. (2001). Pronounced up-regulation of the PA28alpha/beta proteasome regulator but little increase in the steady-state content of immunoproteasome during dendritic cell maturation. *European journal of immunology* *31*, 3271-3280.

Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S.L., Nussenzweig, M., and Steinman, R.M. (2000). The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *The Journal of cell biology* *151*, 673-684.

Marodi, L., Forehand, J.R., and Johnston, R.B., Jr. (1991). Mechanisms of host defense against *Candida* species. II. Biochemical basis for the killing of *Candida* by mononuclear phagocytes. *J Immunol* *146*, 2790-2794.

Martinez-Pomares, L. (2012). The mannose receptor. *Journal of leukocyte biology* *92*, 1177-1186.

Martinez-Pomares, L., Reid, D.M., Brown, G.D., Taylor, P.R., Stillion, R.J., Linehan, S.A., Zamze, S., Gordon, S., and Wong, S.Y. (2003). Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *Journal of leukocyte biology* *73*, 604-613.

Martinez-Pomares, L., Wienke, D., Stillion, R., McKenzie, E.J., Arnold, J.N., Harris, J., McGreal, E., Sim, R.B., Isacke, C.M., and Gordon, S. (2006). Carbohydrate-independent recognition of collagens by the macrophage mannose receptor. *European journal of immunology* *36*, 1074-1082.

Maurer, M.E., and Cooper, J.A. (2006). The adaptor protein Dab2 sorts LDL receptors into coated pits independently of AP-2 and ARH. *Journal of cell science* *119*, 4235-4246.

Maxfield, F.R., and McGraw, T.E. (2004). Endocytic recycling. *Nature reviews Molecular cell biology* *5*, 121-132.

McKenzie, E.J., Taylor, P.R., Stillion, R.J., Lucas, A.D., Harris, J., Gordon, S., and Martinez-Pomares, L. (2007). Mannose receptor expression and function define a new population of murine dendritic cells. *J Immunol* *178*, 4975-4983.

Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000). Innate immunity. *The New England journal of medicine* *343*, 338-344.

---

- Melief, C.J., and van der Burg, S.H. (2008). Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nature reviews Cancer* 8, 351-360.
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annual review of cell and developmental biology* 12, 575-625.
- Mellman, I., and Steinman, R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-258.
- Mishra, S.K., Keyel, P.A., Hawryluk, M.J., Agostinelli, N.R., Watkins, S.C., and Traub, L.M. (2002a). Disabled-2 exhibits the properties of a cargo-selective endocytic clathrin adaptor. *The EMBO journal* 21, 4915-4926.
- Mishra, S.K., Watkins, S.C., and Traub, L.M. (2002b). The autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein interfaces directly with the clathrin-coat machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16099-16104.
- Mitsunari, T., Nakatsu, F., Shioda, N., Love, P.E., Grinberg, A., Bonifacino, J.S., and Ohno, H. (2005). Clathrin adaptor AP-2 is essential for early embryonal development. *Molecular and cellular biology* 25, 9318-9323.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869-877.
- Mommaas, A.M., Mulder, A.A., Jordens, R., Out, C., Tan, M.C., Cresswell, P., Kluin, P.M., and Koning, F. (1999). Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *European journal of immunology* 29, 571-580.
- Morel, S., Levy, F., Burlet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A.L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J.C., Boon, T., *et al.* (2000). Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12, 107-117.
- Morgan, J.R., Prasad, K., Jin, S., Augustine, G.J., and Lafer, E.M. (2001). Uncoating of clathrin-coated vesicles in presynaptic terminals: roles for Hsc70 and auxilin. *Neuron* 32, 289-300.
- Motley, A., Bright, N.A., Seaman, M.N., and Robinson, M.S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *The Journal of cell biology* 162, 909-918.
- Neefjes, J., Jongsma, M.L., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews Immunology* 11, 823-836.
-

- Newmyer, S.L., and Schmid, S.L. (2001). Dominant-interfering Hsc70 mutants disrupt multiple stages of the clathrin-coated vesicle cycle in vivo. *The Journal of cell biology* 152, 607-620.
- Nguyen, D.G., and Hildreth, J.E. (2003). Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *European journal of immunology* 33, 483-493.
- Nil, A., Firat, E., Sobek, V., Eichmann, K., and Niedermann, G. (2004). Expression of housekeeping and immunoproteasome subunit genes is differentially regulated in positively and negatively selecting thymic stroma subsets. *European journal of immunology* 34, 2681-2689.
- Norbury, C.C., Basta, S., Donohue, K.B., Tscharke, D.C., Princiotta, M.F., Berglund, P., Gibbs, J., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2004). CD8+ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates. *Science* 304, 1318-1321.
- O'Brien, C., Flower, D.R., and Feighery, C. (2008). Peptide length significantly influences in vitro affinity for MHC class II molecules. *Immunome research* 4, 6.
- O'Riordan, D.M., Standing, J.E., and Limper, A.H. (1995). Pneumocystis carinii glycoprotein A binds macrophage mannose receptors. *Infection and immunity* 63, 779-784.
- Odorizzi, C.G., Trowbridge, I.S., Xue, L., Hopkins, C.R., Davis, C.D., and Collawn, J.F. (1994). Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *The Journal of cell biology* 126, 317-330.
- Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M.C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., and Bonifacino, J.S. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 269, 1872-1875.
- Olive, C. (2012). Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants. *Expert review of vaccines* 11, 237-256.
- Olzmann, J.A., Kopito, R.R., and Christianson, J.C. (2013). The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.
- Ortiz-Navarrete, V., Seelig, A., Gernold, M., Frentzel, S., Kloetzel, P.M., and Hammerling, G.J. (1991). Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 353, 662-664.
- Owen, D.J., Collins, B.M., and Evans, P.R. (2004). Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 153-191.



- Palmowski, M.J., Gileadi, U., Salio, M., Gallimore, A., Millrain, M., James, E., Addey, C., Scott, D., Dyson, J., Simpson, E., *et al.* (2006). Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *J Immunol* *177*, 983-990.
- Pontow, S.E., Kery, V., and Stahl, P.D. (1992). Mannose receptor. *International review of cytology* *137B*, 221-244.
- Purcell, A.W., and Elliott, T. (2008). Molecular machinations of the MHC-I peptide loading complex. *Curr Opin Immunol* *20*, 75-81.
- Ramakrishna, V., Trembl, J.F., Vitale, L., Connolly, J.E., O'Neill, T., Smith, P.A., Jones, C.L., He, L.Z., Goldstein, J., Wallace, P.K., *et al.* (2004). Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules. *J Immunol* *172*, 2845-2852.
- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J.W., and Neefjes, J. (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* *18*, 97-108.
- Reits, E.A., Benham, A.M., Plougastel, B., Neefjes, J., and Trowsdale, J. (1997). Dynamics of proteasome distribution in living cells. *The EMBO journal* *16*, 6087-6094.
- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoege, C., and Jentsch, S. (2005). A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* *120*, 73-84.
- Robinson, M.S. (2004). Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends in cell biology* *14*, 167-174.
- Roche, P.A., Teletski, C.L., Stang, E., Bakke, O., and Long, E.O. (1993). Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 8581-8585.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* *78*, 761-771.
- Rock, K.L., and Shen, L. (2005). Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunological reviews* *207*, 166-183.
- Rosalia, R.A., Quakkelaar, E.D., Redeker, A., Khan, S., Camps, M., Drijfhout, J.W., Silva, A.L., Jiskoot, W., van Hall, T., van Veelen, P.A., *et al.* (2013). Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *European journal of immunology* *43*, 2554-2565.
- Sabbatini, P., Tsuji, T., Ferran, L., Ritter, E., Sedrak, C., Tuballes, K., Jungbluth, A.A., Ritter, G., Aghajanian, C., Bell-McGuinn, K., *et al.* (2012). Phase I trial of overlapping
-

long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 6497-6508.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine* 182, 389-400.

Sasaki, S., Fukushima, J., Arai, H., Kusakabe, K.I., Hamajima, K., Ishii, N., Hirahara, F., Okuda, K., Kawamoto, S., Ruysschaert, J.M., *et al.* (1997). Human immunodeficiency virus type-1-specific immune responses induced by DNA vaccination are greatly enhanced by mannan-coated diC14-amidine. *European journal of immunology* 27, 3121-3129.

Saveanu, L., Carroll, O., Weimershaus, M., Guermonprez, P., Firat, E., Lindo, V., Greer, F., Davoust, J., Kratzer, R., Keller, S.R., *et al.* (2009). IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science* 325, 213-217.

Schlessinger, J. (1988). The epidermal growth factor receptor as a multifunctional allosteric protein. *Biochemistry* 27, 3119-3123.

Schmid, E.M., and McMahon, H.T. (2007). Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature* 448, 883-888.

Schuetz, V., and Burgdorf, S. (2014). The ins-and-outs of endosomal antigens for cross-presentation. *Current Opinion in Immunology* 26, 63-68.

Schultz, E.S., Chapiro, J., Lurquin, C., Claverol, S., Burlet-Schiltz, O., Warnier, G., Russo, V., Morel, S., Levy, F., Boon, T., *et al.* (2002). The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *The Journal of experimental medicine* 195, 391-399.

Schwartz, A.L., and Ciechanover, A. (1999). The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annual review of medicine* 50, 57-74.

Schwarz, K., van Den Broek, M., Kostka, S., Kraft, R., Soza, A., Schmidtke, G., Kloetzel, P.M., and Groettrup, M. (2000). Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 alpha/beta, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope. *J Immunol* 165, 768-778.

Schweizer, A., Stahl, P.D., and Rohrer, J. (2000). A di-aromatic motif in the cytosolic tail of the mannose receptor mediates endosomal sorting. *The Journal of biological chemistry* 275, 29694-29700.

Shaw, A.C., Mitchell, R.N., Weaver, Y.K., Campos-Torres, J., Abbas, A.K., and Leder, P. (1990). Mutations of immunoglobulin transmembrane and cytoplasmic domains: effects on intracellular signaling and antigen presentation. *Cell* 63, 381-392.

---

- Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M., and Rock, K.L. (2004). Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21, 155-165.
- Shepherd, V.L., Tarnowski, B.I., and McLaughlin, B.J. (1991). Isolation and characterization of a mannose receptor from human pigment epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 32, 1779-1784.
- Sijts, A.J., Ruppert, T., Rehermann, B., Schmidt, M., Koszinowski, U., and Kloetzel, P.M. (2000a). Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *The Journal of experimental medicine* 191, 503-514.
- Sijts, A.J., Standera, S., Toes, R.E., Ruppert, T., Beekman, N.J., van Veelen, P.A., Ossendorp, F.A., Melief, C.J., and Kloetzel, P.M. (2000b). MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. *J Immunol* 164, 4500-4506.
- Silva, A.L., Rosalia, R.A., Sazak, A., Carstens, M.G., Ossendorp, F., Oostendorp, J., and Jiskoot, W. (2013). Optimization of encapsulation of a synthetic long peptide in PLGA nanoparticles: low-burst release is crucial for efficient CD8(+) T cell activation. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 83, 338-345.
- Singer-Kruger, B., Frank, R., Crausaz, F., and Riezman, H. (1993). Partial purification and characterization of early and late endosomes from yeast. Identification of four novel proteins. *The Journal of biological chemistry* 268, 14376-14386.
- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., and Jordan, M.S. (2009). T cell activation. *Annual review of immunology* 27, 591-619.
- Sorkin, A. (2004). Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort. *Current opinion in cell biology* 16, 392-399.
- Speetjens, F.M., Kuppen, P.J., Welters, M.J., Essahsah, F., Voet van den Brink, A.M., Lantrua, M.G., Valentijn, A.R., Oostendorp, J., Fathers, L.M., Nijman, H.W., *et al.* (2009). Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 1086-1095.
- Tacken, P.J., Ginter, W., Berod, L., Cruz, L.J., Joosten, B., Sparwasser, T., Figdor, C.G., and Cambi, A. (2011). Targeting DC-SIGN via its neck region leads to prolonged antigen residence in early endosomes, delayed lysosomal degradation, and cross-presentation. *Blood* 118, 4111-4119.
- Tan, M.C., Mommaas, A.M., Drijfhout, J.W., Jordens, R., Onderwater, J.J., Verwoerd, D., Mulder, A.A., van der Heiden, A.N., Scheidegger, D., Oomen, L.C., *et al.* (1997). Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-

restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *European journal of immunology* 27, 2426-2435.

Tanaka, K. (1994). Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing. *Journal of leukocyte biology* 56, 571-575.

Taylor, M.E., Bezouska, K., and Drickamer, K. (1992). Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. *The Journal of biological chemistry* 267, 1719-1726.

Taylor, P.R., Gordon, S., and Martinez-Pomares, L. (2005a). The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends in immunology* 26, 104-110.

Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2005b). Macrophage receptors and immune recognition. *Annual review of immunology* 23, 901-944.

They, C., and Amigorena, S. (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 13, 45-51.

Tietze, C., Schlesinger, P., and Stahl, P. (1980). Chloroquine and ammonium ion inhibit receptor-mediated endocytosis of mannose-glycoconjugates by macrophages: apparent inhibition of receptor recycling. *Biochemical and biophysical research communications* 93, 1-8.

Tietze, C., Schlesinger, P., and Stahl, P. (1982). Mannose-specific endocytosis receptor of alveolar macrophages: demonstration of two functionally distinct intracellular pools of receptor and their roles in receptor recycling. *The Journal of cell biology* 92, 417-424.

Toda, S., Ishii, N., Okada, E., Kusakabe, K.I., Arai, H., Hamajima, K., Gorai, I., Nishioka, K., and Okuda, K. (1997). HIV-1-specific cell-mediated immune responses induced by DNA vaccination were enhanced by mannan-coated liposomes and inhibited by anti-interferon-gamma antibody. *Immunology* 92, 111-117.

Toes, R.E., Blom, R.J., Offringa, R., Kast, W.M., and Melief, C.J. (1996a). Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. *J Immunol* 156, 3911-3918.

Toes, R.E., Nussbaum, A.K., Degermann, S., Schirle, M., Emmerich, N.P., Kraft, M., Laplace, C., Zwinderman, A., Dick, T.P., Muller, J., *et al.* (2001). Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *The Journal of experimental medicine* 194, 1-12.

Toes, R.E., Offringa, R., Blom, R.J., Melief, C.J., and Kast, W.M. (1996b). Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7855-7860.

---

- Traub, L.M. (2003). Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection. *The Journal of cell biology* 163, 203-208.
- Valenzuela, J., Schmidt, C., and Mescher, M. (2002). The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells. *J Immunol* 169, 6842-6849.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., *et al.* (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71-81.
- Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P.G., Eichelberger, M., Gaczynska, M., Nagashima, K., Rock, K.L., Goldberg, A.L., Doherty, P.C., and Tonegawa, S. (1994). Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity* 1, 533-541.
- van Kooyk, Y., Engering, A., Lekkerkerker, A.N., Ludwig, I.S., and Geijtenbeek, T.B. (2004). Pathogens use carbohydrates to escape immunity induced by dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 16, 488-493.
- van Poelgeest, M.I., Welters, M.J., van Esch, E.M., Stynenbosch, L.F., Kerpershoek, G., van Persijn van Meerten, E.L., van den Hende, M., Lowik, M.J., Berends-van der Meer, D.M., Fathors, L.M., *et al.* (2013). HPV16 synthetic long peptide (HPV16-SLP) vaccination therapy of patients with advanced or recurrent HPV16-induced gynecological carcinoma, a phase II trial. *Journal of translational medicine* 11, 88.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual review of biochemistry* 68, 1015-1068.
- Wainszelbaum, M.J., Proctor, B.M., Pontow, S.E., Stahl, P.D., and Barbieri, M.A. (2006). IL4/PGE2 induction of an enlarged early endosomal compartment in mouse macrophages is Rab5-dependent. *Experimental cell research* 312, 2238-2251.
- Watts, C. (2001). Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol* 13, 26-31.
- Weimershaus, M., Maschalidi, S., Sepulveda, F., Manoury, B., van Endert, P., and Saveanu, L. (2012). Conventional dendritic cells require IRAP-Rab14 endosomes for efficient cross-presentation. *J Immunol* 188, 1840-1846.
- Wilkinson, C.R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C., and Gordon, C. (2001). Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nature cell biology* 3, 939-943.
- Yamada, A., Sasada, T., Noguchi, M., and Itoh, K. (2013). Next-generation peptide vaccines for advanced cancer. *Cancer science* 104, 15-21.
- Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., and Rapoport, T.A. (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429, 841-847.

Zamze, S., Martinez-Pomares, L., Jones, H., Taylor, P.R., Stillion, R.J., Gordon, S., and Wong, S.Y. (2002). Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *The Journal of biological chemistry* 277, 41613-41623.

Zehner, M., Chasan, A.I., Schuette, V., Embgenbroich, M., Quast, T., Kolanus, W., and Burgdorf, S. (2011). Mannose receptor polyubiquitination regulates endosomal recruitment of p97 and cytosolic antigen translocation for cross-presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 9933-9938.

Zehner, M., Rauen, J., Chasan, A.I., Embgenbroich, M., Camps, M.G., Kaden, S., Haas, A., Kurts, C., Endl, E., Beyer, M., *et al.* (2012). Intraendosomal flow cytometry: a novel approach to analyze the protein composition of antigen-loaded endosomes. *European journal of immunology* 42, 2187-2190.

Zwaveling, S., Ferreira Mota, S.C., Nouta, J., Johnson, M., Lipford, G.B., Offringa, R., van der Burg, S.H., and Melief, C.J. (2002). Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* 169, 350-358.

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AP2	Adapterprotein 2
APC	<i>Professional antigen-presenting cell</i> , Antigenpräsentierende Zelle; Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ARH Protein	<i>Autosomal recessive hypercholesterolemia protein</i>
AS	Aminosäure
ATPase	Adenosintriphosphatase
BMDC	<i>Bone marrow-derived dendritic cell</i> , Knochenmark dendritische Zelle
CCP	<i>Clathrin-coated pits</i> , Clathrin-umhüllte Einbuchtung
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDM6PR	<i>(Cation-dependent)</i> Mannose-6- Phosphatrezeptor
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CIM6PR	<i>(Cation-independent)</i> Mannose-6- Phosphatrezeptor
CLIP	<i>Class II-associated invariant chain peptide</i>
CRD	<i>Carbohydrate recognition domain</i> , Kohlehydraterkennungsdomäne
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyt-Antigen 4
CTLD	C-Typ Lektindomäne
Dab2	<i>Disabled-2</i>
DC	Dendritische Zelle
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i> , auch CD209

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid,</i> Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal-growth-factor</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein,</i> grün fluoreszierendes Protein
EGFR	<i>Epidermal-growth-factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>Endoplasmic reticulum-associated protein</i> <i>degradation,</i> ER-assoziiertes Proteinabbau
ERAP	ER-assoziierte Aminopeptidase
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum,</i> fetales Kälberserum
FcγRI	Fc Rezeptor
FITC	Fluorescein
FNII	Fibronektin Typ II
FSC	<i>Forward scatter,</i> Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating</i> <i>factor</i>
h	Stunde
Hek	Humane embryonale Nierenzellen
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	<i>Horseradish peroxidase,</i> Meerrettichperoxidase
HSP 70	<i>Heat shock protein 70</i>
i.d.	Intradermal
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
IP	Immunopräzipitation
IRAP	<i>Insulin-responsive aminopeptidase</i>
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>

---



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LDLR	<i>Low-density lipoprotein</i> Rezeptor
LMP2/7	<i>Low molecular mass protein 2/7</i>
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
M6PR/CIMPR	Mannose-6-Phosphatrezeptor/ <i>cation-independent mannose phosphate receptor</i>
mAb	Monoklonaler Antikörper
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MECL-1	<i>Multicatalytic endopeptidase complex like 1</i>
MES	2-(N-Morpholino) Ethansulfonsäure
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> Haupthistokompatibilitätskomplex
MHCI	MHC Klasse I Molekül
MHCII	MHC Klasse II Molekül
min	Minute
MR	Mannoserezeptor
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NOX2	NADPH Oxidase 2
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> , Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> , mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PLA <sub>2</sub> R	Phospholipase A <sub>2</sub> Rezeptor
PLGA	<i>Poly lactic-co-glycolic acid</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
Ptd-Ins(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

Rag1	<i>Recombinase activating gene 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RRE	<i>Rev response element</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subcutan
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
SLP	Synthetisches langes Peptid
SSC	<i>Side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
TAP1	<i>Transporter associated with antigen processing 1</i>
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2	T-Helferzelle Typ1/2
TLR	Toll-like Rezeptor
TLRL	Toll-like Rezeptor Ligand
TM-Domäne	Transmembran-Domäne
TNF	Tumornekrosefaktor
UE	Untereinheit
VSV-G	<i>Vesicular stomatitis virus glykoprotein</i>
WT	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Die Aktivierung von T-Zellen erfordert drei Signale.....	7
Abbildung 2-2: Die Struktur des Mannoserezeptors.....	9
Abbildung 2-3: Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne des MR. ....	11
Abbildung 2-4: Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln.....	12
Abbildung 2-5: Das Adapterprotein AP2. ....	13
Abbildung 2-6: Mechanismus der klassischen Antigenpräsentation auf MHCI- Molekülen. ....	15
Abbildung 2-7: Die molekularen Mechanismen der Antigenpräsentation auf MHCII- Molekülen. ....	16
Abbildung 2-8: Molekulare Mechanismen der Antigenkreuzpräsentation. ....	19
Abbildung 2-9: Das 26S Proteasom.....	22
Abbildung 2-10: Die Untereinheitszusammensetzung des (Immuno-) Proteasoms.....	23
Abbildung 6-1: Übersicht über die verwendeten OVA-spezifischen SLPs.....	53
Abbildung 6-2: Aufnahme von OVA und Peptiden in BMDCs. ....	54
Abbildung 6-3: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der MR-abhängigen Antigenaufnahme. ....	55
Abbildung 6-4: Konzentrationsreihe für die Peptidaufnahme in WT und MR <sup>-/-</sup> BMDCs.....	56
Abbildung 6-5: OVA und das mannosylierte Peptid befinden sich in den gleichen intrazellulären Kompartimenten.....	57
Abbildung 6-6: OVA und das mannosylierte Peptid werden über den MR in stabile frühe Endosomen geleitet. ....	61
Abbildung 6-7: IL-2-Antwort von spezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach Aktivierung durch OVA- oder Peptid-beladene BMDCs. ....	62
Abbildung 6-8: Proliferation von aktivierten CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	64
Abbildung 6-9: Präsentation von OVA und den OVA-Peptiden auf MHCII-Molekülen zur Aktivierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen erfolgt unabhängig vom MR.....	66
Abbildung 6-10: <i>In vivo</i> T-Zellproliferation als Antwort auf die Vakzinierung mit OVA-spezifischen Peptiden.....	68
Abbildung 6-11: <i>In vivo</i> CD8 <sup>+</sup> T-Zellantwort auf HPV-spezifische Peptide.....	69
Abbildung 6-12: Untersuchte Mannoserezeptormutanten und chimäre Rezeptoren. .....	71
Abbildung 6-13: OVA-Aufnahme in Hek Zellen durch verschiedene MR-Mutanten. .....	72
Abbildung 6-14: Zeitreihe für siRNA-Knockdown von AP2 $\mu$ 2. ....	74
Abbildung 6-15: Der Einfluss von AP2 auf die MR-vermittelte OVA-Aufnahme. ....	74
Abbildung 6-16: Intra- und extrazelluläre Verteilung des MR nach AP2 $\mu$ 2- Knockdown. ....	75
Abbildung 6-17: Bedeutung von AP2 für die OVA-Kreuzpräsentation. ....	76
Abbildung 6-18: Präsentation von OVA auf MHCII-Molekülen von BMDCs mit verminderter AP2 $\mu$ 2-Expression. ....	77
Abbildung 6-19: Oberflächenexpression von MHC-Molekülen und Aktivierungsmarkern nach Herunterregulation der AP2 $\mu$ 2-Expression. ....	78
Abbildung 6-20: Die Rolle des Proteasoms bei der OVA-Kreuzpräsentation.....	80
Abbildung 6-21: Die Bedeutung des Immunoproteasoms bei der Antigenkreuzpräsentation. ....	81

Abbildung 6-22: Intrazelluläre Lokalisation von OVA in BMDCs nach Herunterregulation von LMP2 und LMP7.....	85
Abbildung 6-23: Das Immunoproteasom ist an OVA <sup>+</sup> Endosomen vorhanden.....	86
Abbildung 6-24: Endosomen aus WT und MR <sup>-/-</sup> BMDCs.....	88
Abbildung 6-25: Spezifische Färbung von Proteinen auf der Oberfläche von Endosomen.....	89
Abbildung 6-26: Färbung von LMP2 und LMP7 an OVA-haltigen Endosomen.....	90
Abbildung 6-27: Die Färbung von LMP2 und LMP7 an Endosomen ist unspezifisch. .....	91