

Université de Montréal

Régulation de la présentation antigénique par la chaîne invariante Iip35
et la molécule non-classique HLA-DO

Par
Hayssam Khalil

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en microbiologie et immunologie.

Janvier, 2004

©Hayssam Khalil, 2004



W
4
U58
2004
V.047

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
« Régulation de la présentation antigénique par la chaîne invariante Iip35
et la molécule non-classique HLA-DO »

Présenté par
Hayssam Khalil

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr. Hugo Soudeyns _____
Directeur de recherche : Dr Jacques Thibodeau _____
Membre du jury : Dr. Éric Cohen _____
Examineur externe : Dr. Philippe Benaroch _____
Représentante du doyen de la FES : Dr. Nathalie Labrecque _____

Thèse accepté le : _____

RÉSUMÉ

La fonction principale des molécules du CMH de classe II est de présenter des peptides issus des protéines dégradées dans les compartiments endosomaux. Une multitude d'étapes sont requises entre le moment où les molécules de classe II sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et leur présence à la surface cellulaire. C'est étapes sont cruciales pour une réponse immunitaire efficace. Un défaut dans la voie de présentation antigénique peut conduire à des immunodéficiences sévères, tandis qu'une dérégulation peut causer des maladies autoimmunes. En plus des molécules de classe II et des peptides, plusieurs autres protéines sont impliquées dans la voie de présentation antigénique. Au cours de ce travail nous nous sommes intéressé à deux de ces protéines, la forme p35 de la chaîne invariante humaine et la molécule HLA-DO.

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse étaient par conséquent divisés en deux volets gravitant autour de la régulation de la présentation antigénique. Le premier avait pour but de comprendre le mécanisme de masquage du motif de rétention de la chaîne invariante Iip35 par les molécules du CMH de classe II. Le second volet consistait à confirmer ou infirmer l'expression de molécules HLA-DO fonctionnelles en réponse au transactivateur CIITA.

L'isoforme p35 de la chaîne invariante humaine possède un motif de rétention dans le réticulum endoplasmique de type R-X-R qui est inactivé lors de la fixation de HLA-DR. Dans le premier volet de cette étude, nous avons tenté d'élucider les différents paramètres en jeu lors du masquage du motif de rétention de Iip35. Nos résultats ont permis de déterminer que la queue cytoplasmique de la chaîne β des classe II est essentielle au masquage du motif de rétention de la chaîne invariante p35. Nous avons également démontré pour la première fois que les isotypes DP et DQ sont capables de surmonter le motif de rétention de Iip35 par un mécanisme mettant en jeux les queues cytoplasmiques polymorphiques et distinctes de leur chaîne β . Dans le but de caractériser plus précisément les déterminants moléculaires requis pour un masquage efficace, nous avons criblé par mutagenèse dirigée le domaine cytoplasmique de la chaîne β et de la chaîne invariante. Nos résultats suggèrent que le masquage de Iip35 requiert à la fois une queue cytoplasmique d'au moins deux acides aminés, mais également que l'un de ces deux acides aminés porte une charge positive.

Tout comme la chaîne invariante, la molécule HLA-DO est également un chaperon capable de réguler la présentation antigénique et modifier le profil peptidique d'une cellule présentatrice d'antigène. Cependant, une controverse existe autour de la régulation de l'expression des molécules HLA-DO. À l'aide d'un peptide correspondant à la queue cytoplasmique de HLA-DO β , nous

avons développé un anticorps monoclonal de souris, HKC5. Dans le cadre du second volet de ce travail, nous avons utilisé cet anticorps dans le but d'évaluer la présence de la chaîne HLA-DO β au niveau de cellules HeLa exprimant la protéine CIITA (Class II transactivator). Nos résultats de cytométrie en flux et de microscopie confocale ont permis de démontrer une expression considérable de DO β suggérant que HLA-DO peut s'accumuler dans ces cellules autres que les lymphocytes B sous l'influence de CIITA.

LISTE DES MOTS CLÉS

Présentation antigénique

Complexe majeur d'histocompatibilité

Chaîne invariante

Iip35

HLA-DO

Rétention

Motif R-X-R

Motifs di-arginine

Anticorps monoclonaux

SUMMARY

The primary function of the MHC class II molecules is to present peptides derived from antigens processed within the endocytic pathway. The events that lie between a class II molecules's synthesis within the ER and its deposition at the cell surface are numerous and represent major control point in an immune response. Defects in antigen processing pathways can result in severe immunodeficiencies, while loss of regulation may be a cause of autoimmune disorders. In addition to the class II molecule and peptide, several additional protein cofactors are involved in the class II-restricted antigen presentation pathway. With these studies, we have further elucidated the function of the p35 isoform of the invariant chain (Ii) and shed some light on the regulation of HLA-DO.

The human-specific p35 isoform of the invariant chain includes an R-X-R endoplasmic reticulum retention motif that is inactivated upon HLA-DR binding. In the first series of studies, we investigated the mechanism underlying this function. Our results clearly identified the β -chain cytoplasmic tail as the critical class II determinant allowing egress of Iip35. We also demonstrated for the first time that DP and DQ isotypes can as well overcome the retention motif of Iip35 through a mechanism also involving their very distinctive polymorphic β chain cytoplasmic tails. To shed some light on the molecular determinants required for this masking, we performed site-directed

mutagenesis in the β chain and Ii cytoplasmic domains. Our results indicate that a cytoplasmic domain with a length of at least two amino acids is required to overcome the Iip35 ERM, and this tail should contain a positive charge.

Given the potential of HLA-DO to inhibit antigen presentation and modify the peptide repertoire, we investigated the ability of CIITA to increase the expression of DO β in non-professional APCs. We developed of a new mouse monoclonal antibody to assess by flow cytometry and confocal microscopy the expression of DO β in CIITA-transfected HeLa cells. Our results showed a marked expression of DO β suggesting that HLA-DO can accumulate under the influence of CIITA in non-B cells.

KEY WORDS LISTING

Antigen presentation

Major histocompatibility complex

Invariant chain

Iip35

HLA-DO

Retention

R-X-R motif

di-arginine motif

Monoclonal antibodies

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-------------|
| RÉSUMÉ | iii |
| LISTE DES MOTS CLÉS | vi |
| SUMMARY | vii |
| KEY WORDS LISTING | ix |
| LISTE DES TABLEAUX | xv |
| LISTE DES FIGURES | xvi |
| LISTE DES ABBRÉVIATIONS | xx |
| DÉDICACE | xxi |
| REMERCIEMENTS | xxii |
| | |
| CHAPITRE 1- Revue de la littérature | 1 |
| | |
| 1.1 Introduction | 1 |
| 1.2 Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) | 7 |
| 1.2.1 Les molécules du CMH de classe I | 9 |
| 1.2.2 Les molécules du CMH de classe II | 11 |
| 1.2.2.1 Distribution cellulaire | 11 |
| 1.2.2.2 Caractéristiques biochimiques..... | 12 |
| 1.2.2.3 La Structure des molécules de classe II..... | 12 |
| 1.3 La présentation antigénique | 15 |
| 1.3.1 La voie de présentation des molécules du CMH de classe II | 15 |
| 1.3.3 Les compartiments endosomaux de la voie des CMH-II | 19 |

| | |
|---|-----------|
| 1.3.4 Les modèles de chargement des molécules du CMH de classe II.. | 20 |
| 1.3.5 Différences cellulaires dans la capacité de présentation antigénique | 22 |
| 1.4 La chaîne invariante..... | 23 |
| 1.4.1 Structure de la chaîne invariante | 23 |
| 1.4.2 Structure du complexe CMH-II / chaîne invariante | 28 |
| 1.4.3 Rôle de chaperon | 31 |
| 1.4.4 Importance des sites de glycosylation de la chaîne invariante | 32 |
| 1.4.5 Ciblage intracellulaire des complexes CMH classe II / Ii | 32 |
| 1.4.6 La souris transgénique Ii « Knock-out » | 34 |
| 1.4.7 Rôle de Ii dans la maturation des lymphocytes B | 35 |
| 1.5 L'isoforme p35 de la chaîne invariante | 36 |
| 1.5.1 La rétention au niveau du RE de Iip35 | 36 |
| 1.5.2 Les différents mécanismes de rétention au niveau du RE | 37 |
| 1.5.2.1 Les motifs de type di-lysine (KKXX) | 38 |
| 1.5.2.2 Les motifs de type di-arginine (R-X-R) | 39 |
| 1.5.3 L'association de β -cop et 14-3-3 à la chaîne invariante p35 | 42 |
| 1.5.3.1 Les manteaux COP | 43 |
| 1.5.3.2 Les protéines 14-3-3 | 45 |
| 1.5.4 L'expression de Iip35 au niveau de certaines pathologies | 46 |
| 1.6 La Molécule HLA-DM | 47 |
| 1.7 La Molécule HLA-DO | 50 |
| 1.7.1 Modulation de HLA-DM par HLA-DO | 52 |

| | |
|---|------------|
| 1.7.2 Régulation de l'expression de HLA-DO | 54 |
| 1.8 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL..... | 56 |
| CHAPITRE 2 - ARTICLE..... | 59 |
| The MHC class II β chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal | 60 |
| 2.1 SUMMARY..... | 61 |
| 2.2 RÉSUMÉ..... | 63 |
| 2.3 INTRODUCTION | 65 |
| 2.4 EXPERIMENTAL PROCEDURES..... | 69 |
| 2.5. RESULTS..... | 75 |
| 2.6 DISCUSSION..... | 88 |
| 2.7 ACKNOWLEDGEMENTS..... | 91 |
| 2.8 ABBREVIATIONS | 92 |
| 2.9 REFERENCES | 93 |
| 2.10 FIGURES..... | 102 |
| CHAPITRE 3 - ARTICLE..... | 120 |
| Sequence-Dependent and -Independent Masking by MHC Class II β Chain Cytoplasmic Tail is Required to Overcome the Invariant Chain p35-Encoded Endoplasmic Reticulum Retention Signal | 121 |

| | |
|--|------------|
| 3.1 SUMMARY..... | 122 |
| 3.2 RÉSUMÉ..... | 124 |
| 3.3 INTRODUCTION..... | 126 |
| 3.3 INTRODUCTION..... | 126 |
| 3.4 EXPERIMENTAL PROCEDURES..... | 130 |
| 3.5 RESULTS..... | 132 |
| 3.6 DISCUSSION..... | 138 |
| 3.7 ACKNOWLEDGEMENTS..... | 141 |
| 3.8 ABBREVIATIONS..... | 142 |
| 3.10 FIGURES..... | 149 |
| | |
| CHAPITRE 4 - ARTICLE..... | 161 |
| | |
| Class II transactivator-Induced Expression of HLA-DOβ in HeLa Cells | 162 |
| 4.1 SUMMARY..... | 163 |
| 4.2 RÉSUMÉ..... | 164 |
| 4.3 INTRODUCTION..... | 165 |
| 4.3 MATERIAL AND METHODS..... | 169 |
| 4.4 RESULTS..... | 173 |
| 4.5 DISCUSSION..... | 178 |
| 4.6 ACKNOWLEDGMENT..... | 181 |
| 4.7 REFERENCES..... | 182 |
| 4.8 FIGURES..... | 187 |

| | |
|--|------------|
| CHAPITRE 5- DISCUSSION | 199 |
| 5.1 La régulation de la présentation antigénique par Iip35..... | 201 |
| 5.1.1 Rôle des molécules de classe II dans le masquage du motif R-X-R | 201 |
| 5.1.2 Modèle du mécanisme de rétention et de masquage | 204 |
| 5.1.3 La dérégulation de l'expression de Iip35 et les pathologies..... | 209 |
| 5.1.4 Perspectives sur le rôle de Iip35 en association avec CD1d..... | 212 |
| 5.1.5 Iip35 et la maturation des lymphocytes B | 214 |
| 5.2 La régulation de la présentation antigénique par HLA-DO..... | 215 |
| 5.2.1 Un nouvel outil pour la détection de HLA-DO β | 216 |
| 5.2.2 La régulation de HLA-DO β | 217 |
| | |
| CHAPITRE 6-CONCLUSION..... | 221 |
| | |
| CHAPITRE 7-BIBLIOGRAPHIE | 223 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Table I. Exemples de motifs de rétention di-lysine | 38 |
| Table II. Exemples de motifs de rétention di-arginine | 42 |

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 :

| | |
|--|----|
| Figure 1.1. La présentation antigénique par les molécules du CMH II..... | 2 |
| Figure 1.2. Les voies de présentation des molécules de classe I et II | 4 |
| Figure 1.3. Sélection positive et négative au niveau du thymus..... | 6 |
| Figure 1.4. Locus du complexe majeur d'histocompatibilité humain | 9 |
| Figure 1.5. Comparaison de la structure générale des molécules de CMH de classe I et II..... | 10 |
| Figure 1.6. Structure tridimensionnelle d'un CMH II présentant un peptide.. | 14 |
| Figure 1.7. Modèle du trimère de Ii et du complexe CMH-II / Ii..... | 16 |
| Figure 1.8. Dégradation de la chaîne invariante. | 19 |
| Figure 1.9. Les quatre isoformes de la chaîne invariante humaine. | 24 |
| Figure 1.10. Alignement de séquences de la chaîne invariante p33..... | 25 |
| Figure 1.11. Structure de la région de trimérisation de Ii..... | 26 |
| Figure 1.12. Structure trimérique de la région transmembranaine de Ii..... | 27 |
| Figure 1.13. Structure trimérique de la région cytoplasmique de Ii..... | 28 |
| Figure 1.14. Structure de la région de trimérisation de la chaîne invariante... | 30 |
| Figure 1.15. Rôles des motifs di-basiques au niveau cellulaire..... | 41 |
| Figure 1.16. Structure dimérique de 14-3-3 epsilon interagissant avec deux peptides phosphorylés..... | 45 |
| Figure 1.17. HLA-DM est un chaperon des molécules de classe II au niveau des compartiments endosomaux / lysosomaux..... | 48 |

| | |
|--|----|
| Figure 1.18. Comparaison entre la niche peptidique de HLA-DM et HLA-DR1..... | 50 |
|--|----|

CHAPITRE 2 :

| | |
|--|-----|
| Figure 2.1. Antigen presentation-related molecules used in this study. | 102 |
| Figure 2.2. Iip35 prevents the surface expression of class II molecules devoid of their cytoplasmic tails..... | 104 |
| Figure 2.3. Intracellular localization of class II molecules in the presence of Iip35..... | 106 |
| Figure 2.4. Maturation of class II molecules and Ii in HeLa cells. | 108 |
| Figure 2.5. Iip35 LI/ML is not expressed at the cell surface in the presence of DR α TM/ β TM..... | 110 |
| Figure 2.6. The DR β chain cytoplasmic tail is required to overcome Iip35 ER retention motif. | 112 |
| Figure 2.7. Iip35 LI/ML is not expressed at the cell surface in the presence of DR α / β TM..... | 114 |
| Figure 2.8. HLA-DP and -DQ mask the Iip35 R-X-R motif..... | 116 |
| Figure 2.9. The DP β and DQ β chain cytoplasmic tails are sufficient to overcome Iip35 ER retention motif..... | 118 |

CHAPITRE 3 :

| | |
|---|-----|
| Figure 3.1. The DM β and DO β chain cytoplasmic tails are sufficient to overcome Iip35 ER retention motif. | 149 |
| Figure 3.2. Alanine scan of DR β cytoplasmic tail..... | 151 |
| Figure 3.3. Truncation of DR β cytoplasmic tail after arginine 232 hinders Iip35 ERM masking..... | 153 |
| Figure 3.4. Position of the arginine in DR β cytoplasmic tail is critical for an efficient masking of Iip35 ERM. | 155 |
| Figure 3.5. Proline residues in Iip35 cytoplasmic tail are not required for its retention and masking by HLA-DR..... | 157 |
| Figure 3.6. Removing the p33 portion of Iip35 cytoplasmic tail inactivates the ERM..... | 159 |

CHAPITRE 4 :

| | |
|---|-----|
| Figure 4.1. Monoclonal antibody HKC5 is specific for HLA-DO β | 187 |
| Figure 4.2. HKC5 reacts with HLA-DO in the ER and in the endocytic pathway..... | 189 |
| Figure 4.3. HKC5 reacts with the di-leucine motif of HLA-DO β cytoplasmic tail. | 191 |
| Figure 4.4. Expression of HLA-DO β in B cell lines correlates with high levels of surface CLIP/class II complexes. | 193 |
| Figure 4.5. CIITA activates DO β gene expression in HeLa cells. | 195 |
| Figure 4.6. Transfection of HLA-DO β in HeLa CIITA cells increases surface expression of CLIP. | 197 |

CHAPITRE 5 :

| | |
|--|-----|
| Figure 5.1. Alignement des séquences des trois isotypes de classe II humain. | 202 |
| Figure 5.2. Modèle du masquage du motif R-X-R de Iip35..... | 206 |
| Figure 5.3. Représentation schématique des zones R-X-R et KKXX | 208 |
| Figure 5.4. Séquence de Kozak des deux codons ATG de Iip35 et Iip33. | 210 |
| Figure 5.5. Représentation schématique du promoteur des CMH de classe II et du « transcriptosome »..... | 218 |

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADNc : ADN complémentaire
- BCR : Récepteur des lymphocytes B
- CPA : Cellule présentatrice d'antigènes
- CIITA : Class II Transactivator
- CLIP : "*Class II associated invariant Chain peptide*"
- CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
- CMH-I : CMH de classe I
- CMH-II : CMH de classe II
- EMS : "*Ethyl methane sulfonate*"
- ERGIC : "*ER-Golgi intermediate compartment*"
- FcR : Récepteur du fragment Fc
- HLA : "*Human leukocyte antigen*"
- Ii : Chaîne invariante
- IFN- γ : Interferon gamma
- kDa : Kilodaltons
- MIIC : "*Major histocompatibility-complex class II compartments*"
- MHC : "*Major histocompatibility complex*"
- PCR : "*Polymerase Chain Reaction*"
- RE : Réticulum endoplasmique
- TCR : "*T cell receptor*"
- TM : Transmembrane
- TNF α : "Tumor Necrosis Factor α "

DÉDICACE

À la mémoire de mes grands-parents.

REMERCIEMENTS

Je désire témoigner ici de ma reconnaissance envers tous ceux qui ont suivi, soutenu et guidé ce travail de recherche. Qu'ils en soient très chaleureusement remerciés.

Je désire adresser une marque tout particulière de ma gratitude au Dr. Jacques Thibodeau, mon directeur de recherche. C'est sans conteste l'une des personnes qui m'a le plus inspiré par ses qualités intellectuelles, sa vivacité d'esprit, son ingéniosité, sa connaissance et sa rigueur scientifiques, mais également son ouverture d'esprit et son amitié. Il m'a permis d'élaborer et de poursuivre mes propres idées tout en me guidant et en me ramenant sur le juste chemin au cours de mes travaux. Ses commentaires et ses suggestions sont et seront toujours appréciés. Toute ma reconnaissance lui est adressée ici non seulement pour son enseignement et sa disponibilité, mais également pour la confiance qu'il m'a témoignée, pour son soutien et sa compréhension. Merci pour tout, Jacques.

Merci également à tous mes collègues devenus des amis, qui ont partagé chaque jour mes joies et mes déceptions inhérentes au travail de recherche. Merci Alexandre, Francis, Georges, Jessy, Nathalie, Angélique, Catherine, Julie et Marie-Hélène.

Pas seulement pour m'avoir entouré et soutenu pendant la durée de la thèse, mais également pour tout ce qu'ils ont fait pour moi auparavant, je tiens à dire un grand merci à mes parents et à mes petits frères. Merci aussi à Renée, d'avoir embelli mon quotidien et de m'avoir si bien épaulé pendant la rédaction de cette thèse. Qu'ils sachent tous que ma gratitude va bien au-delà des mots et que je leur dédie ce travail.

J'adresse également mes remerciements aux membres du jury pour la lecture et la critique de ce manuscrit.

Enfin à toutes celles et ceux que j'aurais pu oublier, merci mille fois !

CHAPITRE 1- Revue de la littérature

1.1 Introduction

La fonction principale du système immunitaire est de concourir au maintien de l'homéostasie de l'individu. Il s'oppose à la pénétration d'agents extérieurs en particulier d'agents infectieux, comme aux dérèglements internes. Il tient également une place majeure dans la surveillance antitumorale, éliminant les cellules malignes. Les lymphocytes B et T sont les principaux intervenants lors de cette surveillance, chacun exprimant des récepteurs à leur surface cellulaire ayant la capacité de reconnaître spécifiquement un seul et unique déterminant antigénique. La génération d'une réponse immunitaire envers un pathogène donné requiert une multitude d'interactions cellulaires et moléculaires. La plus importante de ces interactions s'effectue entre le récepteur des lymphocytes T (TCR) et les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les protéines du CMH sont exprimées à la surface cellulaire en association avec un peptide; le TCR reconnaît à la fois le CMH et la surface peptidique générant ainsi une interaction tri-moléculaire TCR : CMH : peptide. Cette interaction permet d'initier la réponse immunitaire par l'intermédiaire d'une cascade de signaux aboutissant à une expansion clonale de la population de lymphocytes T spécifiques pour l'antigène (Figure 1.1). L'activation de lymphocytes T exprimant la molécule CD4 conduit à la sécrétion de cytokines nécessaires pour

la différenciation des lymphocytes B et la régulation de la réponse immunitaire. Par contre, l'activation de la famille des lymphocytes T exprimant la molécule CD8 leur confère un caractère cytotoxique qui conduira à la destruction de l'activateur. Cependant les TCR ne peuvent pas reconnaître un antigène directement dans sa forme native. Un processus, dénommé présentation antigénique est requis pour générer des fragments peptidiques.

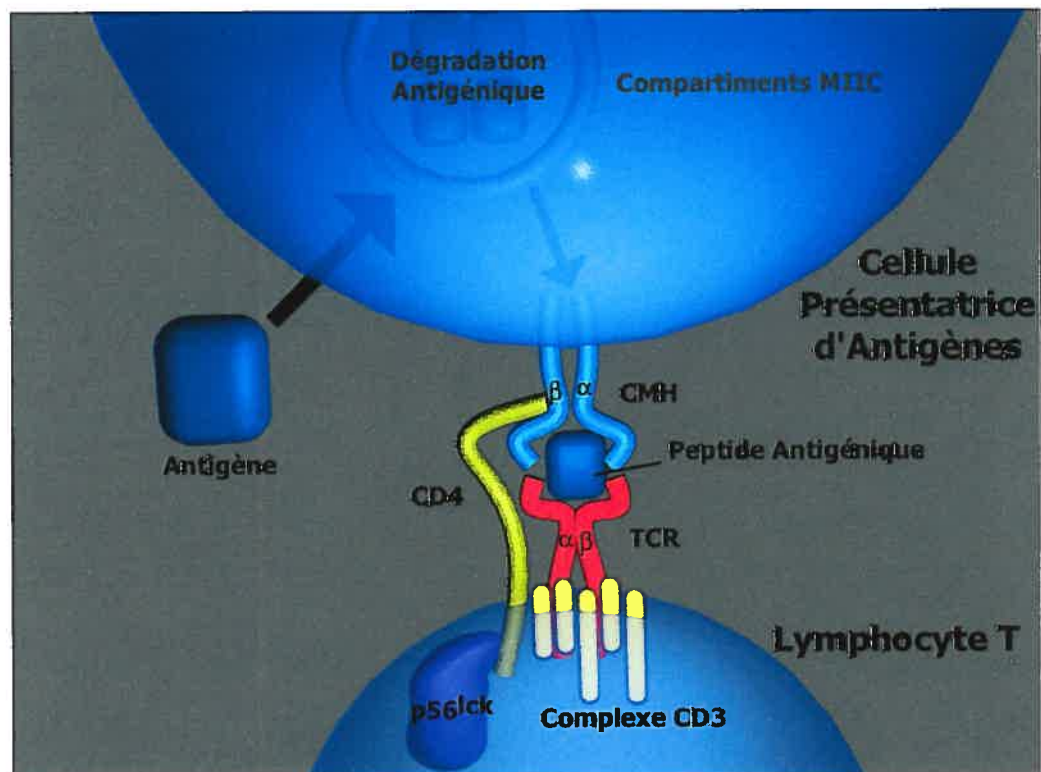


Figure 1.1. La présentation antigénique par les molécules du CMH II.

Une cellule présentatrice d'antigène présente un peptide issu de la dégradation d'un antigène par l'intermédiaire des molécules du CMH de classe II. Ce complexe CMH II / peptide est reconnu par un récepteur à la surface des lymphocytes T CD4+.

Les molécules du CMH peuvent alors lier ces peptides et les exposer à la surface de cellules présentatrices d'antigènes pour la reconnaissance par les lymphocytes T. La reconnaissance par les lymphocytes T est ainsi dite « restreinte par le CMH » étant donné que le TCR peut seulement reconnaître un antigène sous forme de fragment associé à une molécule du CMH. En général, les molécules du CMH de classe II présentent des antigènes extracellulaires aux lymphocytes T CD4, tandis que les fragments de protéines endogènes sont présentés par les molécules du CMH de classe I aux lymphocytes T CD8 cytotoxiques (Figure 1.2). Le développement de ces deux classes de protéines du CMH permet de protéger l'hôte contre les pathogènes extracellulaires et intracellulaires. Ainsi, les pathogènes exogènes tels que les bactéries sont phagocytés par les macrophages. À l'intérieur du phagosome, les protéines bactériennes sont dégradées en fragments peptidiques capables de s'associer aux molécules du CMH de classe II qui seront ensuite exprimées à la surface cellulaire. L'activation des lymphocytes T CD4⁺ stimule alors la production et sécrétion d'une panoplie de cytokines qui engendrent la maturation des lymphocytes B en cellules productrices d'anticorps, les plasmocytes, ou en cellules B mémoires. Ce mécanisme permet ainsi de générer une réponse humorale contre l'agent pathogène sans conséquence pour les macrophages ou cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Par contre, l'infection d'une cellule par un virus conduit à la production de protéines virales par la machinerie cellulaire. Les molécules du CMH de classe I

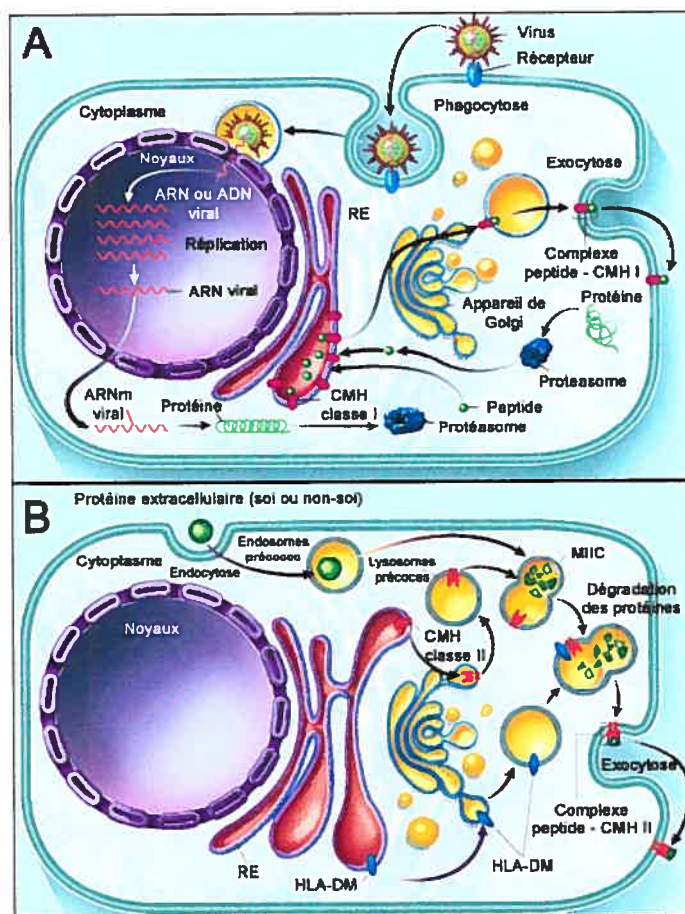


Figure 1.2. Les voies de présentation des molécules de classe I et II

(A) Voie de présentation principale pour générer des peptides destinés aux molécules de classe I. Les protéines endogènes sont dégradées par le protéasome en peptides qui seront transportés dans le RE. Au niveau du RE ces peptides se fixeront à la niche peptidique des molécules de classe I. Ces complexes CMH I / peptide seront alors présentés à la surface aux lymphocytes T CD8⁺. (B) Voie de présentation principale pour générer des peptides destinés aux molécules de classe II. Des protéines extracellulaires du soi ou étrangères sont internalisées par endocytose (ou phagocytose) et séquestrer dans les endosomes. Au niveau des MIIC, le fragment CLIP sur les classe II sera échangé pour un peptide issu de la dégradation de l'antigène internalisé. Cet échange est catalysé par la molécule HLA-DM. Les complexes CMH II / peptides seront alors présentés à la surface aux lymphocytes T CD4⁺.
 (Traduit de Klein, J. et Saton, A. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343:702-9) (1).

présentent alors les peptides de ces protéines virales endogènes aux lymphocytes T CD8+. L'activation de ces lymphocytes T cytotoxiques conduit à la mort de la cellule infectée par le virus.

En plus de leurs rôles dans l'activation des lymphocytes T matures en cellules effectrices, les molécules du CMH jouent un rôle critique dans le développement des lymphocytes T immatures en lymphocytes T CD4+ ou CD8+. Les cellules souches de la moelle épinière migrent vers le thymus où elles sont « éduquées » pour devenir des lymphocytes T matures qui pourront entrer dans la circulation périphérique pour la surveillance immunitaire. Contrairement aux lymphocytes B, les lymphocytes T ne reconnaissent pas l'antigène à l'état natif, l'antigène doit être présenté par le CMH. C'est pourquoi des interactions répétées du TCR présent sur le thymocyte avec le CMH sont nécessaires à son développement. En effet les lymphocytes ayant un TCR incapables d'interagir avec le CMH du soi sont inutiles puisqu'ils ne pourront jamais reconnaître les antigènes. Seuls les thymocytes possédant un TCR capable de reconnaître le CMH du soi seront autorisés à poursuivre leur développement : c'est la sélection positive (Figure 1.3). Parmi les thymocytes survivants, ceux ayant un TCR capable de reconnaître un peptide du soi associé au CMH du soi et donc dangereux seront éliminés : c'est la sélection négative. Comme pour les lymphocytes B, cette élimination ne concernera que les thymocytes ayant un TCR spécifique de peptides du soi rencontrés dans le thymus. Ce processus quantitativement important (10% des thymocytes en

réchappent) pourra se continuer après que les lymphocytes T matures aient quitté le thymus dans le cas de peptides du soi non présents dans le thymus.

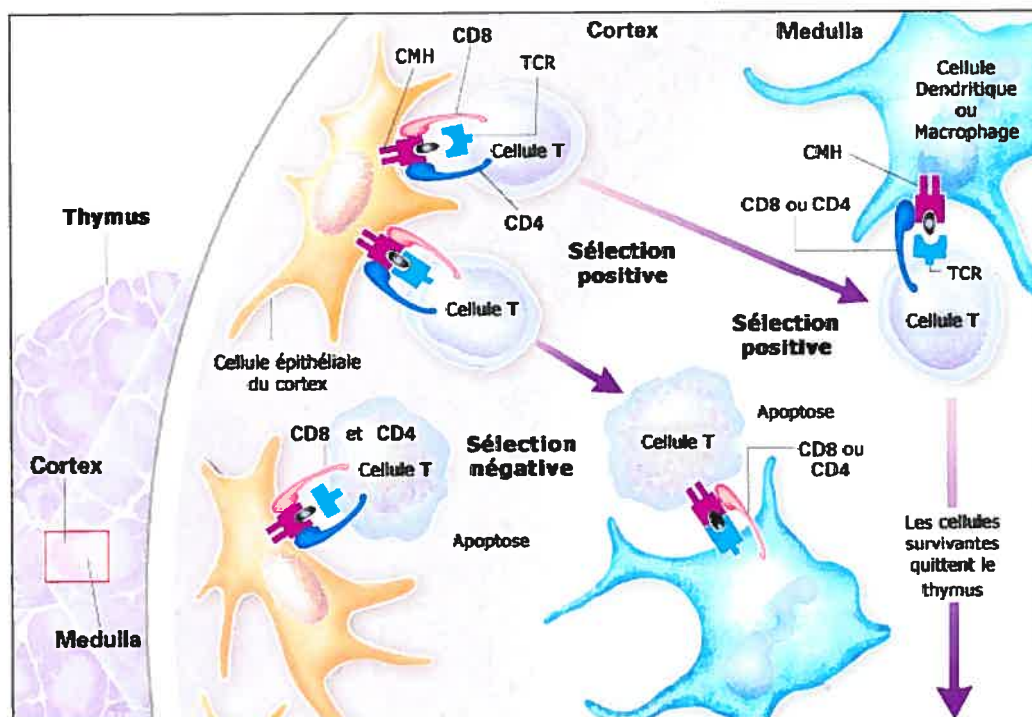


Figure 1.3. Sélection positive et négative au niveau du thymus

(Tiré de Delves, P.J. et Roitt, I.M. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343:37-49) (2).

On voit donc qu'à toutes les étapes de leur développement, les thymocytes doivent, par l'intermédiaire de leur TCR, interagir avec des complexes peptide-CMH. Cette « éducation » nécessite la présence de molécules du CMH de classe I et de classe II afin de générer les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ respectivement. Les thymocytes qui expriment un TCR ainsi que les molécules CD8 et CD4 nécessitent une interaction continue avec les molécules du CMH pour prévenir leur mort cellulaire. L'interaction avec les molécules du CMH-I

conduit au développement de lymphocytes T CD8⁺, tandis que l'interaction avec les molécules du CMH-II permet la survie des lymphocytes T CD4⁺. Ce processus de « sélection positive » des thymocytes est absent chez les souris déficientes en CMH-I (3) ou CMH-II (4-6) et se reflète par une diminution drastique de lymphocytes T CD8⁺ ou CD4⁺ en périphérie.

1.2 Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Historiquement, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) fut identifié comme un des principaux facteurs responsables des rejets de greffe. Sa découverte fut saluée par le Prix Nobel de Médecine 1980 décerné à Dausset, Snell et Benacerraf. Cet ensemble de gènes étroitement liés intervient en effet dans le rejet rapide et violent des greffons par le système immunitaire. Cette propriété est à l'origine de la dénomination de "CMH". Ainsi, les termes "complexe" et "majeur" évoquent, d'une part, le nombre important de gènes impliqués dans la réaction, et d'autre part, la violence et la rapidité du rejet. Enfin, le terme "histocompatibilité" souligne le fait que c'est la reconnaissance des produits du CMH par les cellules immunitaires qui détermine la compatibilité ou l'incompatibilité entre tissus. Chez l'homme et la souris, le CMH prend respectivement le nom de HLA (pour *Human Leucocyte Antigen*) et H-2 (pour *Histocompatibility-2*). Cependant, la fonction naturelle du CMH n'est pas de rejeter les greffons placés artificiellement dans l'organisme au cours des transplantations. En effet, sa fonction biologique est la présentation

de fragments d'antigènes, sous forme de peptides, aux lymphocytes T (phénomène de restriction). Cette fonction ne commence à être entrevue qu'au début des années 1970 ((7); Prix Nobel de médecine 1996) et admise au milieu des années 1980.

La définition stricte du CMH est génétique. Il est défini comme la région chromosomique où se situent les gènes contrôlant la structure et l'expression des molécules présentatrices de l'antigène. Cependant, l'usage définit plutôt le CMH de façon fonctionnelle comme l'ensemble des molécules impliquées dans la présentation de peptides aux lymphocytes T. Ces molécules peuvent soit présenter directement l'antigène soit simplement contribuer à la fonction de présentation de l'antigène. Ces deux définitions sont cependant à nuancer. En effet, certaines molécules participant à la présentation de l'antigène (β 2-microglobuline, chaîne invariante) sont codées en dehors du locus CMH alors que certains produits ne semblent avoir aucune relation avec la fonction de présentation.

Les gènes du CMH et leur produits sont répartis en trois classes (I, II et III) selon leurs propriétés biochimiques, leur expression et leur fonction (Figure 1.4). Les trois classes sont impliqués dans la fonction de présentation de l'antigène aux lymphocytes T, et constituent pour le système immunitaire un moyen de surveillance des milieux intracellulaires et extracellulaires.

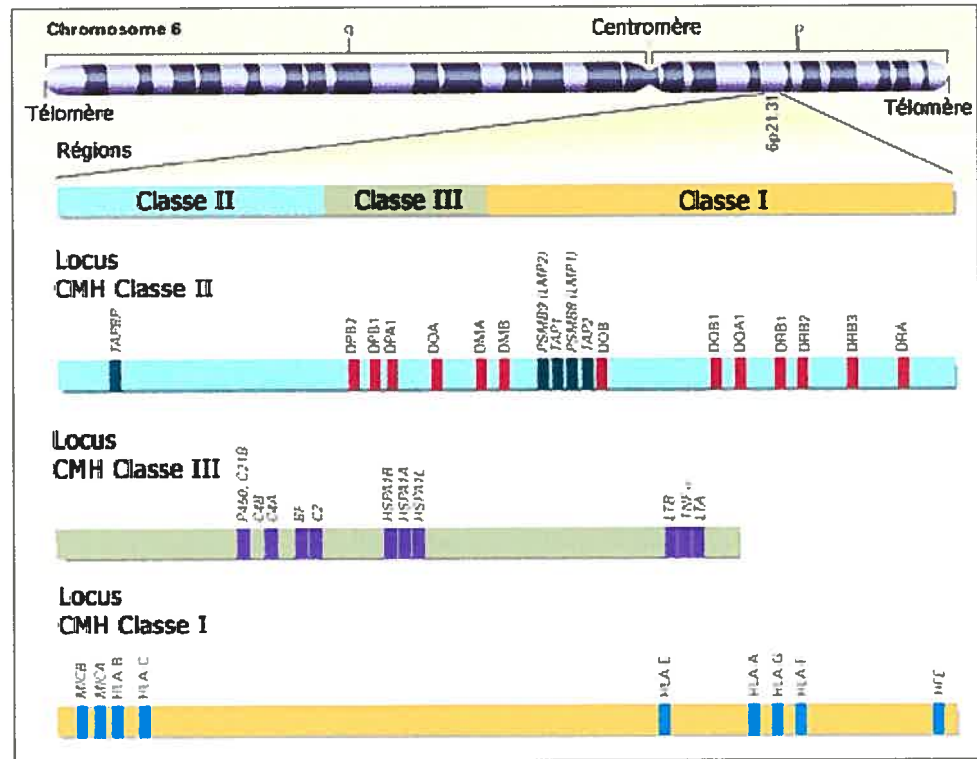


Figure 1.4. Locus du complexe majeur d'histocompatibilité humain

Le locus du CMH est positionné sur le bras court du chromosome 6, entre le gène de la glyoxalase 1 (Glop) et celui du pepsinogène urinaire 5 (PG5). Le complexe génétique représente environ le millième du génome humain, soit $3,5 \times 10^3$ kB. (Tiré de Klein, J. et Saton, A. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343:702-9) (1).

1.2.1 Les molécules du CMH de classe I

Les molécules CMH I sont des glycoprotéines hétérodimériques composées d'une chaîne polypeptidique lourde (chaîne H ou α) et d'une chaîne polypeptidique légère (β 2-microglobuline ou β 2-m) (Figure 1.5).

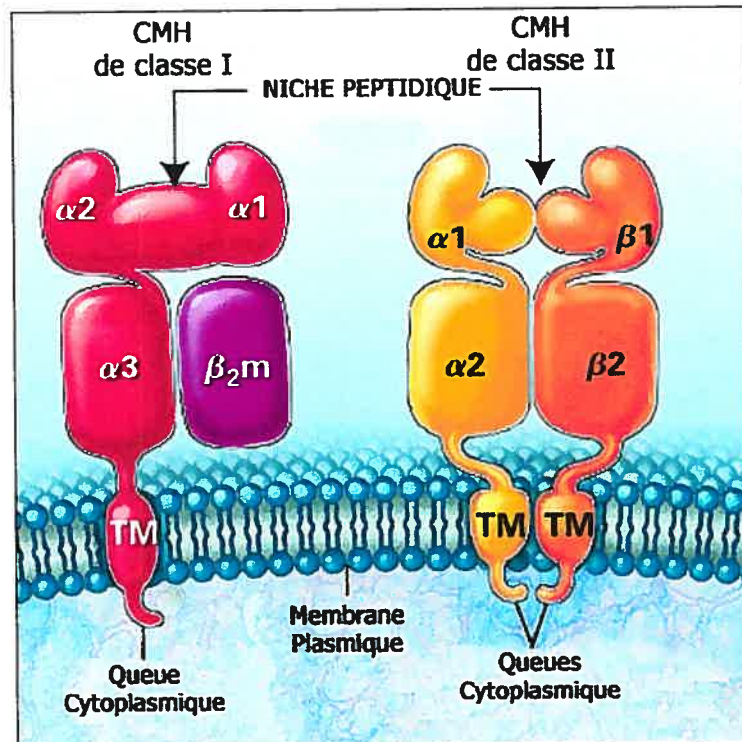


Figure 1.5. Comparaison de la structure générale des molécules de CMH de classe I et II

(Tiré de Klein, J. et Saton, A. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343:702-9) (1).

La chaîne lourde, protéine glycosylée de 44 kDa (environ 350 résidus), possède trois domaines: un extracellulaire, un transmembranaire (une trentaine de résidus) et un cytosolique (une trentaine de résidus). Le domaine extracellulaire est formé de trois sous-domaines: $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Chacun comporte environ 90 acides aminés et correspond à un exon distinct. Une chaîne oligosaccharidique de type complexe est liée à l'asparagine 86 (domaine $\alpha 1$).

La $\beta 2$ -microglobuline (11,5 kDa, 99 résidus) est une protéine glycosylée soluble. Elle est associée à la chaîne lourde de façon non-covalente. Cette

molécule est très conservée entre les espèces (70% d'homologie entre les différentes β 2-microglobulines connues). La β 2-microglobuline est codée en dehors du complexe HLA sur le chromosome 15.

1.2.2 Les molécules du CMH de classe II

1.2.2.1 Distribution cellulaire

Les molécules du CMH de classe II sont exprimées principalement à la membrane de cellules immunitaires présentatrices de l'antigène (APC) comme les lymphocytes B et les cellules professionnelles présentatrices telles que les macrophages, les cellules dendritiques interstitielles, les cellules de Langerhans de la peau et les mastocytes. Elles sont également présentes à la surface des lymphocytes T activés humains et des précurseurs érythrocytaires, granulocytaires et monocytaires. Pour les lymphocytes B et T, l'expression des CMH II dépend respectivement de leur état de différenciation et de leur état d'activation. En effet, seules les cellules B matures expriment les molécules de CMH II à la différence des cellules immatures et des plasmocytes, alors que les lymphocytes T doivent être activés pour exprimer ces molécules à leur surface. Dans le thymus, les molécules CMH II sont exprimées sur les cellules épithéliales du cortex et de la médulla ainsi que sur les cellules dendritiques d'origine hématopoïétique. Enfin, certains tissus non lymphoïdes, comme les endothéliums capillaires, de nombreux épithéliums (langue, duodénum, épididyme, sein, trachée...), les glomérules rénaux et la dure-mère, expriment

également les produits de classe II. Il semblerait que cette expression soit constitutive.

1.2.2.2 Caractéristiques biochimiques

Les molécules de CMH II sont des glycoprotéines transmembranaires de 55-60 kDa, composées de deux chaînes associées de façon non-covalente: une chaîne lourde α (31-34 kDa) et une chaîne légère β (26-29 kDa). Chaque chaîne comporte deux domaines extracellulaires N-terminaux (notés $\alpha 1/\alpha 2$ et $\beta 1/\beta 2$) d'environ 90 résidus chacun, un domaine transmembranaire hydrophobe et un domaine C-terminal intra-cytoplasmique (Figure 1.5). Chaque domaine correspond approximativement à un exon du gène. Enfin, la molécule DR est glycosylée sur les asparagines $\alpha 78$ (glycosylation riche en mannose), $\alpha 117$ et $\beta 19$ (glycosylations complexes avec notamment du mannose, du fucose, de l'acide sialique et de l'acétylglucosamine).

1.2.2.3 La Structure des molécules de classe II

La première structure tridimensionnelle d'une molécule de CMH II à avoir été résolue est celle de HLA-DR1 (DRA*0101/DRB1*0101) associé au peptide HA 306-318 issu de l'hémagglutinine du virus de la grippe (8;9). Depuis, les structures tridimensionnelles de plusieurs autres molécules de CMH II ont été résolues: trois molécules humaines - DRB1*0301 ((10), DRB1*0401 (11) et DRB1*1501 (12) -, et quatre molécules murines - I-E^k (13), I-A^k (14), I-A^d

(15) et I-A^{g7}. Toutes ces molécules présentent une structure globale identique (Figure 1.6). Chaque domaine $\alpha 2$ et $\beta 2$ se replie en deux feuillets β antiparallèles plissés à quatre et trois brins qui sont associés en une structure en sandwich β par un pont disulfure ($\alpha 2$: C107-C163, $\beta 2$: C117-C173). Ces deux domaines interagissent par leurs feuillets β .

Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$, structurellement très proches et symétriques, se replient en un feuillet β antiparallèle plissé à quatre brins, surmonté d'une longue région en hélice α d'une trentaine de résidus. Les feuillets β de ces deux domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ s'associent par liaisons hydrogène pour former un unique feuillet β à huit brins, surmonté par les deux domaines hélicoïdaux. Cette dimérisation crée un profond sillon (longueur $\sim 2,5$ nm; largeur ~ 1 nm) entre les hélices α des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$. Les bords de ce sillon sont formés par les chaînes latérales des hélices alors que son plancher est constitué par les chaînes latérales des brins centraux du feuillet β $\alpha 1$ - $\beta 1$. Il présente de plus cinq poches de tailles et de caractéristiques physico-chimiques différentes. L'une d'elles, située à une extrémité du sillon, présente une profonde cavité hydrophobe. Ce sillon est le site fonctionnel de la molécule de CMH II où se fait la liaison des peptides. Les deux domaines terminaux $\alpha 1$ et $\beta 1$ ne présentent pas d'homologie de séquences avec les immunoglobulines, alors que $\alpha 2$ et $\beta 2$ ont des caractéristiques d'un domaine d'anticorps (notamment proche de C $\gamma 3$ et C $\mu 4$).

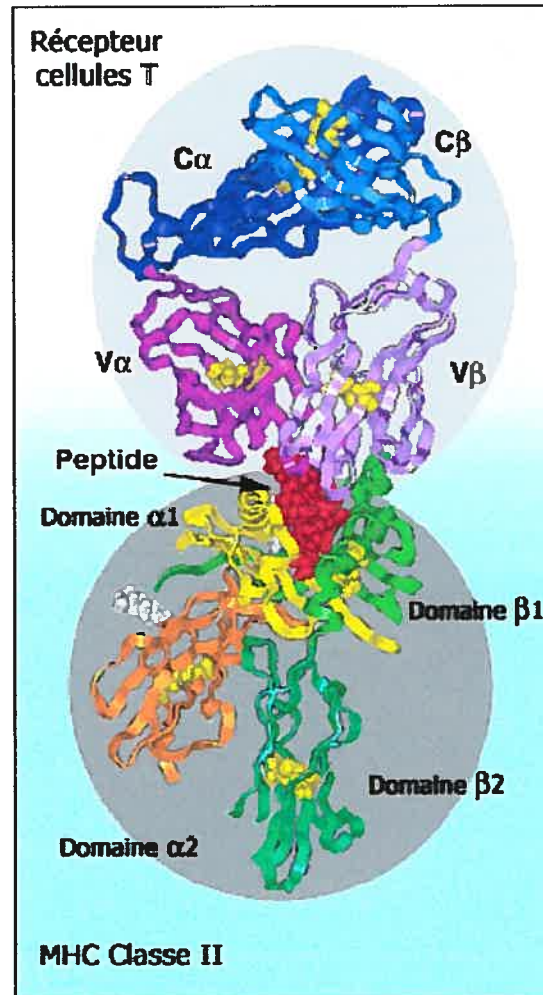


Figure 1.6. Structure tridimensionnelle d'un CMH II présentant un peptide.

(Tiré de Klein, J. et Saton, A. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343:702-9) (1).

1.3 La présentation antigénique

1.3.1 La voie de présentation des molécules du CMH de classe II

Les molécules de CMH II sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) où elles s'associent en proportion stœchiométrique avec des trimères de la chaîne invariante (Ii) (un dimère $\alpha\beta$ pour une molécule Ii), formant ainsi des nonamères qui sont exportés vers l'appareil de Golgi (Figure 1.7) (16-18). La chaîne Ii est une glycoprotéine membranaire de type II comportant 216 résidus. Elle joue un rôle important dans la présentation de l'antigène par les molécules de CMH II. En effet, elle permet le bon repliement de ces molécules dans le RE en les stabilisant puisqu'en son absence la majorité des molécules de classe II s'agrègent dans le RE et ne se rendent pas à l'appareil de Golgi (19-21). De plus, grâce à des signaux d'adressage localisés au niveau de la région cytoplasmique, la chaîne invariante facilite le transport du complexe du RE vers le Golgi puis vers les endosomes (19-23). Enfin, la chaîne invariante empêche le chargement de peptides endogènes sur les molécules de CMH II au niveau du RE et de l'appareil de Golgi (24) et permet donc la séparation des voies de présentation CMH I et CMH II (25). Cette dernière fonction est due au segment CLIP (*class II associated Ii chain peptide*) de Ii (résidus 81-104) qui occupe le sillon des molécules de classe II (10;26) et qui inhibe donc la liaison d'autres peptides. En particulier, le peptide CLIP empêche la liaison *in vitro* de peptides synthétiques marqués (27).

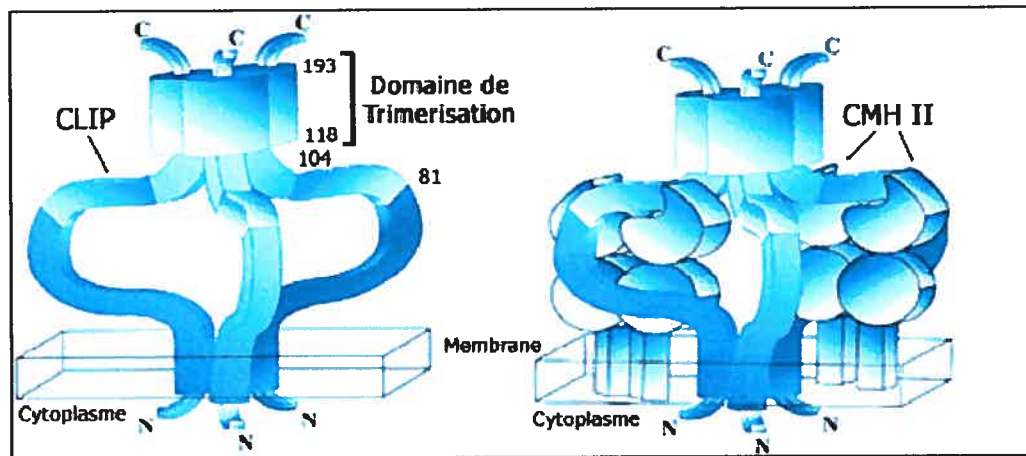


Figure 1.7. Modèle du trimère de Ii et du complexe CMH-II / Ii

Le panneau de gauche montre un trimère de chaînes invariantes, tandis que celui de droite représente un modèle du complexe classe II / Ii (Une des molécules de classe II est absente du modèle afin d'alléger la figure). La région responsable de la trimérisation de la chaîne invariante est indiquée ainsi que le CLIP (Adapté de Cresswell, P. *Cell* Vol.84, 505-507, 1996) (17).

Les endosomes sont des compartiments cellulaires importants pour le chargement des peptides sur les molécules de CMH II. En effet, c'est dans cet environnement protéolytique et acide que les antigènes internalisés par endocytose, pinocytose ou internalisation membranaire (vésicules de clatrides) sont dénaturés et dégradés. D'autre part, c'est également dans les endosomes que la chaîne Ii est progressivement dégradée à partir de son extrémité C-terminale luminale (28;29). Différentes cathepsines sont impliquées dans la dégradation de l'antigène et de la chaîne Ii. Il s'agit en particulier de la cathepsine L dans les cellules épithéliales du cortex thymique (30), et de la

cathepsine S dans les APC dérivées de la moelle osseuse (lymphocytes, monocytes...) (31) ainsi que dans les splénocytes et les cellules dendritiques (32). Ces cystéine protéases sont indispensables pour la dégradation de la chaîne invariante. En effet, l'inhibition (31) ou l'absence (32) de la cathepsine S empêchent la protéolyse de Ii et conduisent à l'accumulation, à la membrane plasmique, de complexes formés de molécules de CMH II et de fragments de Ii d'environ 10 kDa (p10) (Figure 1.8). Il en résulte une diminution de la présentation de l'antigène par interférence avec la liaison des peptides antigéniques sur les molécules de CMH II (33). Ainsi, la cathepsine S est essentielle aux APC pour réaliser la protéolyse efficace de la chaîne Ii, permettant de rendre les molécules de CMH II compétentes pour lier des peptides.

La dégradation progressive de la chaîne Ii se traduit par des fragments de chaîne Ii qui restent transitoirement associés aux dimères $\alpha\beta$. Le segment CLIP est le dernier fragment de Ii à être éliminé de la molécule de CMH II par un mécanisme d'auto-relargage (34) et/ou avec l'aide de la molécule HLA-DM (35) qui est modulée par HLA-DO (36). Les molécules HLA-DM ont une structure très proche de celle des molécules de CMH II classiques (14;37). Elles sont absentes de la surface des cellules présentatrices mais s'accumulent dans des compartiments intracellulaires endosomaux (38). La nécessité de HLA-DM pour le relargage du peptide CLIP n'est pas absolue et dépend des allèles des molécules de CMH II néosynthétisées. Ainsi, des cellules DM⁻ sont capables de

présenter efficacement des antigènes exogènes dans le contexte de I-A^k ou de I-A^d (39;40). Des données indiquent que HLA-DM agirait comme un chaperon pour les molécules de CMH II en les protégeant de la dénaturation dans les compartiments acides (41). Après l'élimination du peptide CLIP, le sillon de liaison des molécules de CMH II est en effet supposé être temporairement vide. Au pH des endosomes, les molécules de CMH II non chargées sont particulièrement instables et se comportent comme des protéines non repliées, ce qui les rend non fonctionnelles et susceptibles à la dégradation. Enfin, la molécule HLA-DM/H-2M contrôle le chargement des peptides antigéniques en induisant la dissociation des complexes CMH-peptide de faible affinité (42). Ainsi, seuls les complexes CMH-peptide d'affinité élevée peuvent être présentés à la surface des cellules présentatrices.

Le mécanisme de dégradation progressif de la chaîne Ii contrôle en même temps le transport intracellulaire des molécules du CMH II et leur association avec les peptides antigéniques. En effet, tant que la région luminale de la chaîne Ii permet le maintien de l'association aux dimères $\alpha\beta$, les complexes sont retenus dans la voie endosomale grâce aux signaux présents dans la région cytoplasmique de Ii. Lorsque la région CLIP est éliminée, le site de liaison des peptides est démasqué et devient accessible aux fragments antigéniques. De plus, les dimères $\alpha\beta$ sont également libérés du signal de rétention endosomale. Après leur association aux peptides antigéniques, les complexes CMH-peptide peuvent alors être transportés vers la membrane plasmique.

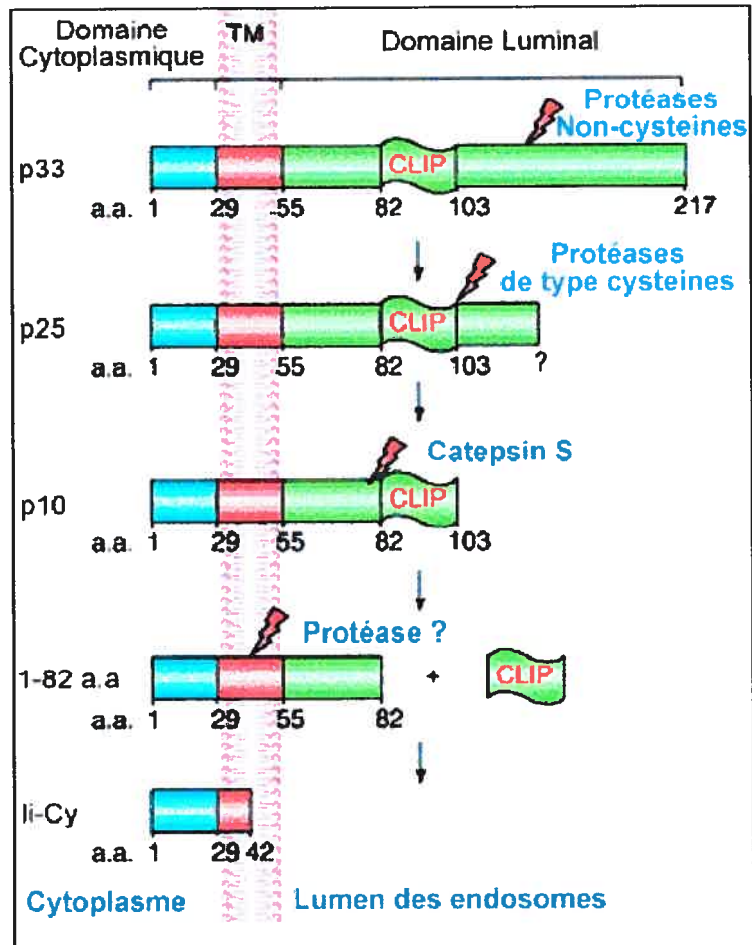


Figure 1.8. Dégradation de la chaîne invariante.

La dégradation de la chaîne invariante s'effectue en plusieurs étapes successives au niveau des compartiments endosomaux (Adapté de Matza *et al. Trends in Immunology*, Vol. 24, No.5, 264-268, 2003) (43).

1.3.3 Les compartiments endosomaux de la voie des CMH-II

Malgré de nombreuses études, il n'existe pas de consensus sur la distribution des complexes CMH II / Ii dans les différents sous-compartiments endosomaux, sur leur circulation entre ces organelles, sur le fait de savoir si le chargement

des peptides antigéniques se fait dans un ou plusieurs sous-compartiments endosomaux et si ceux-ci sont classiques (endosomes précoces, tardifs ou lysosomes) (44). Certains auteurs proposent que les molécules de CMH II soient directement dirigées dans un compartiment prélysosomal non classique (MIIC) où elles s'accumuleraient et où s'effectuerait le chargement des peptides antigéniques (45). Ce modèle très largement accepté est soutenu par des données de fractionnement cellulaire, de marquage métabolique et d'immunoprécipitation. Cependant, la définition du compartiment MIIC n'est pas évidente (46) et a conduit à la description de nombreux compartiments de types MIIC (47;48). Cependant, d'autres données ne sont pas compatibles avec ce modèle. En particulier, la présence de complexes CMH - Ii ainsi que des preuves de dégradation de la chaîne invariante et de chargement de peptides antigéniques ont été observées dans de multiples sous-compartiments endosomaux classiques (49;50). De plus, la molécule HLA-DM qui participe au relargage du fragment CLIP est trouvée aussi bien dans des vésicules de type MIIC que tout au long de la voie endosomale dans des organelles indistinguables des endosomes conventionnels (38).

1.3.4 Les modèles de chargement des molécules du CMH de classe II

Il n'existe certainement pas une seule et unique modalité de chargement de peptides sur les molécules de CMH II. En particulier, il est probable que la dégradation de l'antigène et sa capture par les molécules du CMH II ne soient

pas des phénomènes indépendants. En effet, des protéines partiellement dénaturées ou dégradées peuvent interagir avec les molécules de CMH II (51) en raison de l'ouverture des extrémités du sillon de liaison des peptides. In vivo, l'antigène en cours de dégradation pourrait donc être capturé sous forme de longs fragments peptidiques. Sa dégradation se poursuivrait par digestion autour de la région protégée par le CMH (52). De fait, des complexes de 120 kDa composés de deux molécules de CMH II liées à un même long fragment antigénique ont été identifiés (53).

De plus, il semble que deux types de molécules de CMH II soient engagées dans la présentation (54). Ce sont soit des molécules néosynthétisées encore associées avec la chaîne invariante qui semblent s'accumuler dans des compartiments de type MIIC, soit des molécules matures, c'est-à-dire ayant atteint la membrane plasmique puis recyclées par internalisation dans les endosomes précoces. Un épitope porté par un brin flexible à la surface de l'antigène pourra être pris en charge très précocement, dans les endosomes précoces montrant peu d'activité protéolytique, et ce par les molécules de CMH II recyclées. Cet épitope pourra alors être Ii-indépendant. Il a en effet été montré que certains déterminants présentés aux lymphocytes T ne requièrent pas l'expression de la chaîne invariante (55). En revanche, les déterminants enfouis, dont l'accessibilité nécessite une dénaturation et une dégradation importante de l'antigène, seraient pris en charge, dans des compartiments

tardifs prélysosomaux de type MIIC, par des molécules de classe II néosynthétisées.

1.3.5 Différences cellulaires dans la capacité de présentation antigénique

La complexité de la voie de présentation par les molécules du CMH de classe II se prête à plusieurs possibilités de variations. Par conséquent, il n'est pas étonnant que différents types de CPA diffèrent dans leur capacité de traiter et présenter des antigènes. Un des mécanismes qui diffère selon le type cellulaire est la route par laquelle les antigènes accèdent à la voie endosomale. Les macrophages, par exemple, internalisent les antigènes par phagocytose, les lymphocytes B internalisent les antigènes par l'intermédiaire d'un récepteur et finalement les cellules dendritiques acquièrent leurs antigènes par pinocytose (56). Ces différents types cellulaires possèdent également des distinctions au niveau des protéines présentes dans leurs voies endosomales, notamment les cofacteurs HLA-DM, HLA-DO et la chaîne invariante. Finalement, la présence ou l'absence de compartiments spécialisés tels les CIIV et les MIIC affectera la capacité de ces types cellulaires à traiter et présenter les différentes molécules antigéniques.

1.4 La chaîne invariante

1.4.1 Structure de la chaîne invariante

La chaîne invariante est une protéine non-polymorphe de type II dont la forme prédominante possède 216 acides aminés. Au niveau de la région luminale, deux résidus hautement conservés, les asparagines 114 et 120, sont glycosylées (57-59). Cette forme de la chaîne invariante migre à environ 33 kda sur un gel de polyacrylamide, d'où son nom de p33. Chez l'humain, une deuxième forme de la chaîne invariante est produite par l'initiation de la traduction au niveau d'un second codon AUG plus en aval (60;61). Cette seconde forme possède 16 acides aminés supplémentaires au niveau N-terminal et porte le nom de p35 (Figure 1.9).

Une autre forme de la chaîne invariante, p41, est produite par l'épissage alternatif du transcrit d'ARN (60;61). Ceci conduit à l'ajout de 64 acides aminés supplémentaires au niveau de la région luminale entre les deux asparagines glycosylées et l'extrémité C-terminale. Cette séquence possède 5 cystéines et deux sites de glycosylations. Elle montre également une homologie aux domaines répétés que l'on retrouve chez la thyroglobuline (60;61). Chez l'humain, les formes p41 et p43 sont issues du même transcrit d'ARN par une initiation alternative de la traduction comme dans le cas de p33 et p35. Par conséquent, les formes p43 et p35 possèdent les mêmes 16 acides aminés

supplémentaires au niveau de la région N-terminale (Figure 1.9). Les formes p43 et p35 n'existent pas chez la souris et le rat.

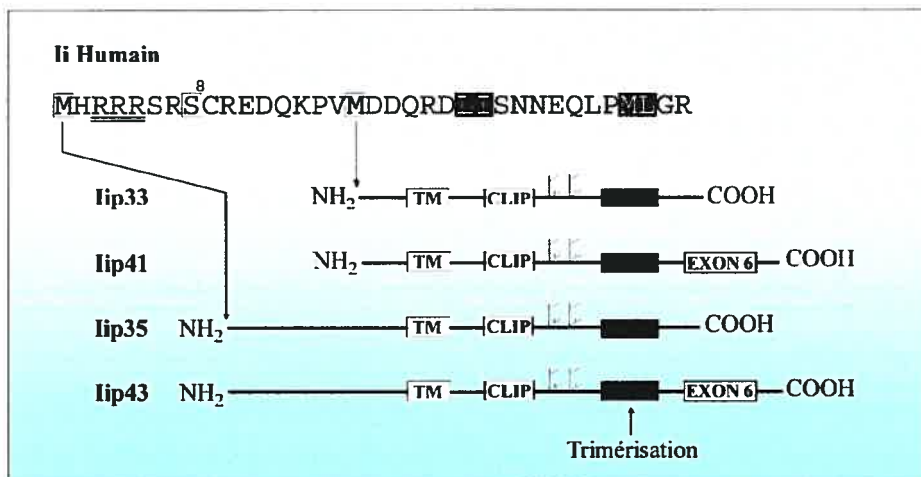


Figure 1.9. Les quatre isoformes de la chaîne invariante humaine.

Les deux méthionines permettant une initiation alternative de la traduction sont indiquées par des boîtes grises. Les arginines soulignées au niveau de la séquence en acides aminés sont responsables de la rétention au niveau du RE des isoformes p35 et p43. La sérine en position 8, impliquer dans le mécanisme de rétention est également indiquée. Les deux motifs de ciblage de types leucine sont indiqués par des boîtes noires au niveau de la séquence. Les sites de glycosylation de la chaîne invariante sont indiqués près de la région du CLIP. Finalement, la région de trimérisation ainsi que l'exon des formes p41 et p43 sont représentés.

À la suite de la synthèse au niveau du réticulum endoplasmique, les molécules de chaîne invariante s'assemblent immédiatement en homotrimères (18;62;63). Le rayon moléculaire ou « Stoke radius » du trimère (67 Angstrom) indique une conformation hautement allongée. Chacune des quatre isoformes de la chaîne invariante peut se retrouver au niveau d'un trimère donné, cependant la prévalence des formes p33 et p35 favorise la formation d'homotrimères de p33

ou de trimères contenant à la fois des formes p33 et p35 (62;64). À l'aide de mutants de délétions, il a été démontré que les résidus 163-183 de Ii sont impliqués dans la trimérisation (65;66). L'analyse par RMN des fragments protéolytiques de Ii a permis de confirmer qu'une structure luminale hautement ordonnée (aa 118-192) résistante aux protéases est responsable de la trimérisation (Figures 1.10 et 1.11) (67-69).

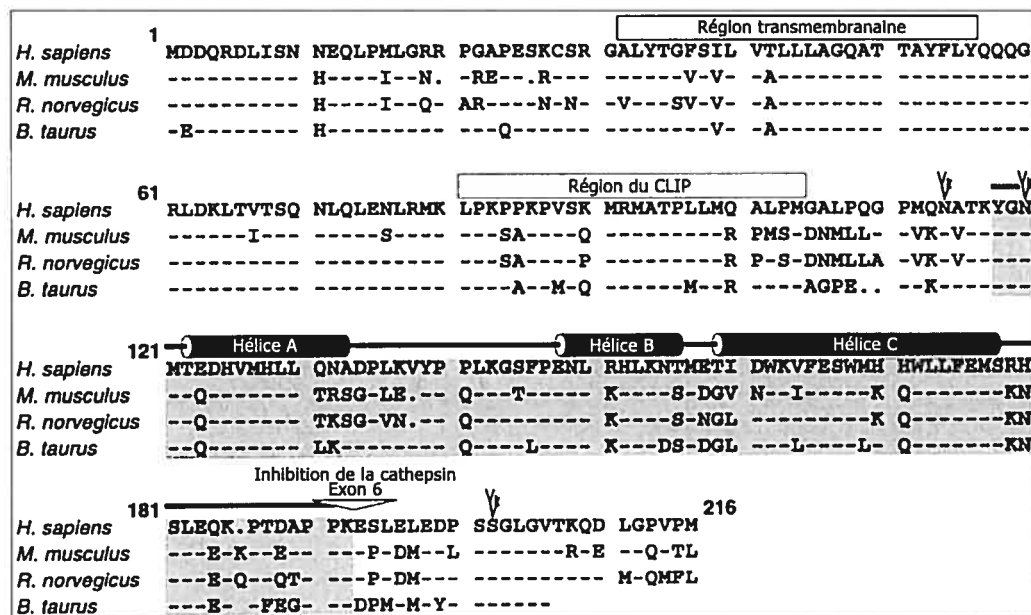


Figure 1.10. Alignement de séquences de la chaîne invariante p33.

Comparaison des séquences de la chaîne invariante humaine, de souris, de rat et de boeuf. Les résidus 118-192 responsables de la trimérisation sont en gris et les hélices A, B et C sont représentés par des cylindres noirs. Le transmembrane, la région du CLIP, les sites de glycosylation N114, N120 et S202 sont indiqués. L'isoforme p41 de Ii possède une insertion de 64 acides aminés après le résidu K192.

(Tiré de Jasanoff *et al.* *EMBO Journal* Vol. 17, pp. 6812-6818, 1998) (68).

Cette région de Ii possède une structure de type α -hélice « coiled-coil » formant un échafaudage permettant l'interaction simultanée de trois hétérodimères $\alpha\beta$ de CMH de classe II (68). Des évidences indirectes permettent également d'envisager la possibilité que la région transmembranaire de Ii contribue à la formation d'un homotrimère stable (Figure 1.12) (70;71). De plus, il a été démontré que la région cytoplasmique de la chaîne invariante forme une structure trimérique co-planaire (Figure 1.13) (72).

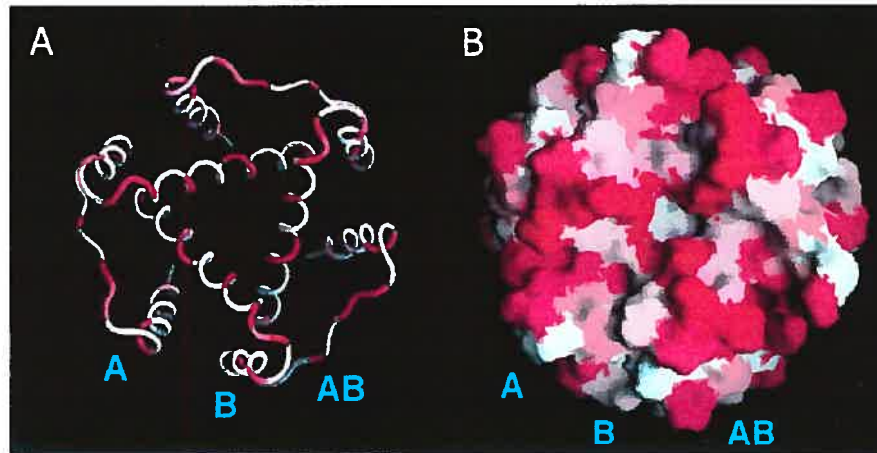


Figure 1.11. Structure de la région de trimérisation de Ii.

La région de trimérisation (résidus 118-192) est représentée sous forme squelettique (A) ou de surface (B). L'échelle de couleur blanc vers rouge correspond aux résidus plus ou moins conservés. Les hélices A et B sont indiquées ainsi que le segment entre les deux hélices (AB).

(Tiré de Jasanoff *et al.* *EMBO Journal* Vol. 17, pp. 6812-6818, 1998) (68).

Une fraction des chaînes invariantes acquiert parfois un groupement chondroïtine sulfate au niveau de la sérine 201 (73;74). Ces molécules de Ii

peuvent alors servir de ligand pour le récepteur CD44 agissant potentiellement comme molécule costimulatrice des lymphocytes T (75).

Finalement, il a également été démontré qu'un résidu cystéine au niveau de la queue cytoplasmique de Ii est palmitoylé (76). Cependant l'importance de cette modification n'est toujours pas démontrée.

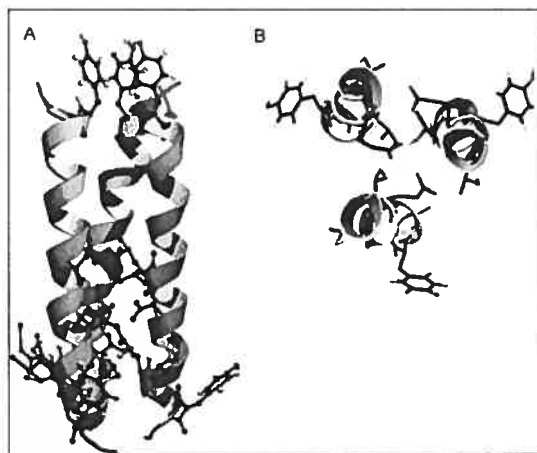


Figure 1.12. Structure trimérique de la région transmembranaire de Ii.

(A) La structure complète de la région transmembranaire. Les chaînes latérales des résidus Tyr33, Gln47, Thr49, Thr50 et Tyr52 sont représentées. (B) Vue de haut du segment de résidus hydrophiles impliqués dans la trimérisation des hélices. Les chaînes latérales des résidus Gln47, Thr49, Thr50 et Tyr52 sont représentées.

(Tiré de Kukol, A. *et al. Journal of molecular Biology*, V.320, n.5, July 2002, pp.1109-1117) (77).

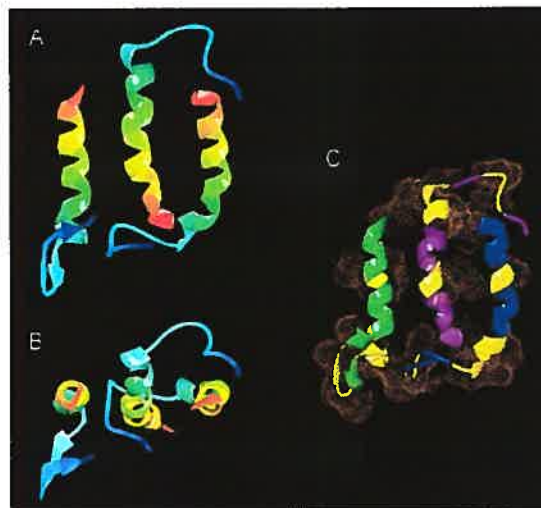


Figure 1.13. Structure trimérique de la région cytoplasmique de Ii.

Différentes vues du trimère de la région cytoplasmique de la chaîne invariante. Vue perpendiculaire (A) et parallèle (B) au plan des hélices. La région N-terminale de chaque monomère est représentée en rouge. (C) Représentation de l'environnement hydrophobe (points oranges) formé au sein du trimère. (Tiré de Motta, A. *et al.* Vol. 5, 1453-1464, Novembre 1997) (72).

1.4.2 Structure du complexe CMH-II / chaîne invariante

Le seul complexe CMH-II / chaîne invariante étudié en détail est celui de la molécule HLA-DR (78). Dans ce contexte, les molécules DR α , DR β et Ii ($\alpha\beta$ Ii) ont été isolées par chromatographie d'affinité à l'aide d'un anticorps dirigé contre HLA-DR puis purifiées par exclusion de taille. L'analyse des complexes par SDS-PAGE suite à un « crosslink » suggère que le complexe $\alpha\beta$ Ii est un nonamère composé de trois chaînes α , trois chaînes β et trois chaînes invariantes. De plus, il a été démontré que le complexe est formé au préalable d'un trimère de Ii auquel s'associent successivement trois dimères $\alpha\beta$. Jusqu'à présent, tous les isotypes de classe II et leurs différents allèles étudiés se lient à

la chaîne invariante et ce même entre espèces différentes (79;80). Ainsi donc, des éléments conservés dans la structure des molécules du CMH de classe II doivent être impliqués dans l'interaction. Au niveau de la chaîne invariante, le fragment luminal de 18 kDa obtenu par digestion à la protéinase K conserve sa capacité de liaison aux classe II (81). De plus, un fragment de 21 kDa de la chaîne invariante obtenu en traitant une lignée cellulaire B avec un inhibiteur de protéinase, la leupeptine, reste associé aux molécules de classe II. Ce fragment (LIP, pour « leupeptine-induced protein ») est formé de la région cytoplasmique et transmembranaire de la chaîne invariante, ce qui correspond aux deux tiers de la molécule en N-terminal. Par conséquent, en combinant les données issues de ces deux fragments, si une seule région est responsable de l'association entre les molécules du CMH et la chaîne invariante, elle se retrouve probablement au niveau du deuxième tiers de la molécule.

Deux domaines au niveau de la chaîne invariante, de part et d'autre de la région de trimérisation, possèdent une structure hautement flexible (aa 72-110 et aa 187-216) (Figure 1.14). Le premier de ces deux domaines (aa 72-110) adopte une structure beaucoup plus ordonnée lors de l'association avec la molécule HLA-DR1 (82). Ce domaine contient la région du CLIP (pour « Class II associated Invariant Chain derived Peptides »), qui a été identifié par mutagenèse et délétion comme nécessaire et suffisante pour l'interaction avec les molécules du CMH de classe II (83;84).

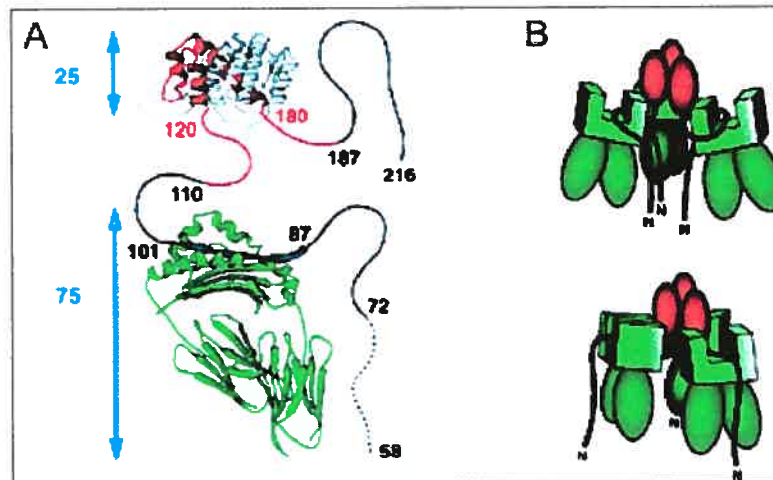


Figure 1.14. Structure de la région de trimérisation de la chaîne invariante.

(A) Représentation tridimensionnelle de la chaîne invariante (Noir et rouge) liée à une molécule de CMH II (Vert). La région de trimérisation est représentée en rouge. Les régions 72-87 et 187-216 sont hautement flexibles tout comme la région 87-101 en absence de classe II. (B) Représentation schématique d'un complexe nonamérique CMH II / Ii. Le domaine N-terminal de Ii (Noir) étant flexible pourrait se retrouver entre les molécules de CMH II (figure du haut) ou en dehors du nonamères (figure du bas). (Tiré de Jasanoff, A. *et al.* *Immunity*, Vol 10, 761-768, 1 June 1999) (82).

La détermination par diffraction des rayons X de la structure du complexe HLA-DR3-CLIP a permis de montrer que le CLIP se lie à la niche peptidique du CMH de classe II de façon très similaire à la liaison d'antigènes peptidiques. Les résidus 87-101 occupent ainsi la niche tandis que les deux extrémités la dépassent (10). Comme nous le verrons dans les sections suivantes, l'association entre le CLIP et la niche peptidique permet de prévenir la liaison de polypeptides ou de protéines au niveau du RE (85-87). De plus, la liaison du CLIP est essentielle pour le repliement efficace et la sortie subséquente des molécules de classe II du RE (88-90).

1.4.3 Rôle de chaperon

La chaîne invariante joue un rôle important dans l'assemblage des molécules de classe II au niveau du réticulum endoplasmique. Les complexes classe II / Ii partiellement assemblés restent associés avec la calnexine et les molécules de ce complexe, sont sensibles à la digestion par l'Endo H et ne possèdent pas d'acide sialique au niveau de leurs oligosaccharides (91). Il semble donc que les complexes partiellement assemblés ne sont pas transportés en dehors du RE. Une fois que le complexe est complètement assemblé sous sa forme nonamérique, il se décroche de la calnexine et les molécules acquièrent alors une maturation de leurs sucres au niveau du Golgi (91). Par conséquent, l'assemblage des classe II au trimère de chaîne invariante favorise la sortie du complexe.

La transfection des chaînes α et β du CMH-II en absence de chaîne invariante conduit à une agrégation des molécules (92). Cependant, lorsque la chaîne invariante est co-transfectée, le niveau d'agrégation des classe II est significativement réduit (92;93). De plus, la présence de Ii favorise la sortie des molécules de classe II du RE et leur passage au travers du Golgi (88;94). L'étude des souris KO pour la chaîne invariante confirme ces résultats, en démontrant une diminution du niveau de classe II passant au travers du Golgi ainsi qu'une diminution du niveau de classe II à la surface cellulaire (19-21).

Cependant il est à noter que cette dépendance pour Ii semble être dépendante de l'allèle du CMH de classe II et du type cellulaire étudié (95).

1.4.4 Importance des sites de glycosylation de la chaîne invariante

Les isoformes p33 et p35 de la chaîne invariante possèdent deux sites de glycosylation entre le CLIP et le domaine de trimérisation (Figure 1.10). Les fragments p41 et p43 possèdent deux sites de glycosylation supplémentaires au niveau de l'extrémité C-Terminale. Par la mutagenèse des sites de glycosylation de Ii, le groupe de Neumann a démontré que cette modification n'est pas nécessaire à la formation du trimère et l'assemblage aux molécules du CMH-II (96). Cependant cette absence de glycosylation augmente la sensibilité à la dégradation par les protéases des voies endosomales et lysosomales. Ces résultats suggèrent que la glycosylation de Ii la protège d'une dégradation prématurée au niveau des compartiments endosomaux. Cette fonction protectrice n'est pas unique aux oligosaccharides de Ii. En effet, l'extrême glycosylation des protéines résidentes des endosomes tardifs et lysosomes, tels que Lamp-1 et Lamp-2, est essentielle pour leur stabilité dans cet environnement riche en protéases (97).

1.4.5 Ciblage intracellulaire des complexes CMH classe II / Ii

Une fois que le nonamère classe II / Ii est formé, il sort rapidement du RE et se dirige vers l'appareil de Golgi. Au niveau du Golgi, le complexe est détourné de la voie de transport qui mène vers la membrane plasmique. Il sera plutôt dirigé vers la voie endosomale, ce qui retardera son apparition à la surface cellulaire de une à trois heures (98). Les complexes de classe II / Ii présents à la surface cellulaire peuvent également atteindre la voie endosomale par internalisation (99;100). Cependant, la majorité des nonamères sont transportés vers les endosomes avant leur apparition au niveau de la membrane plasmique (101). La queue cytoplasmique de Iip33 et Iip35 contient deux courts motifs de type di-leucine, responsables du ciblage du complexe vers les endosomes et de l'internalisation au niveau de la surface cellulaire (22;23;99;102). Ces deux motifs acides sont conservés chez la souris, le rat, le cochon, la vache et l'humain. Chez l'humain, la séquence d'acides aminés du premier motif est **DDQRDLI** et le second est **EQLPML** (Figure 1.9). Les éléments clés de ce motif sont les résidus acides (acide aspartique ou glutamique en gras), suivis de 3 acides aminés, puis deux résidus hydrophobes de Leucine ou Isoleucine (soulignés) (102). L'un des deux résidus hydrophobes peut être substitué pour une méthionine, ce qui est le cas par exemple au niveau du deuxième motif de ciblage chez l'humain. Lorsque ces deux motifs de ciblage sont mutés, la chaîne invariante se retrouve alors principalement en surface et sa demi-vie augmente considérablement (100;103-106). Par l'intermédiaire de chimères Ii-TfR où la queue cytoplasmique du récepteur de la transferrine est remplacée par celle de la chaîne invariante, Kang *et al.* ont déterminé que les deux signaux di-

leucine sont importants pour la localisation lysosomale. Cependant, le second signal semble être moins efficace pour l'internalisation par endocytose (107).

Plusieurs études ont également proposé que la région transmembranaire de la chaîne invariante est également nécessaire pour assurer la localisation endosomale du complexe (22;23). Deux régions au niveau du transmembrane ont été identifiées par mutagenèse comme suffisantes pour une localisation endosomale sans affecter le degré d'internalisation d'une molécule rapporteuse (107). Il est également intéressant de noter que la trimérisation de la chaîne invariante semble jouer un rôle clef dans le ciblage du complexe (108;109). Arneson *et al.* ont ainsi démontré que la présence d'une seule queue cytoplasmique au niveau d'un hétérotrimère était suffisante pour conférer un signal d'internalisation, mais qu'un homotrimère possédant ses trois queues cytoplasmiques était requis pour un ciblage efficace vers les endosomes (108).

1.4.6 La souris transgénique Ii « Knock-out »

L'importance de la chaîne invariante au cours de la présentation antigénique a été confirmée en 1993 par l'intermédiaire de souris transgéniques n'exprimant plus la chaîne invariante (21). Ces souris possèdent un défaut dans le transport des molécules du CMH de classe II, ce qui conduit à l'expression de très peu de molécules à la surface cellulaire. Par conséquent, la voie de présentation antigénique ainsi que la sélection du répertoire des lymphocyte T sont défectueuses. Les molécules du CMH-II issues des splénocytes de souris Ii KO

s'assemblent mal en dimères et semblent être retenues au niveau du RE du à un mauvais repliement et une agrégation (19-21). Ceci diffère des résultats obtenus à partir des cellules transfectées *in-vitro* qui démontrent que le classe II est exprimé à la surface cellulaire en l'absence de chaîne invariante (110;111).

1.4.7 Rôle de Ii dans la maturation des lymphocytes B

Jusqu'à très récemment, le seul rôle connu de la chaîne invariante était celui de chaperon des molécules de classe II prévenant l'association de peptides au niveau du RE et facilitant leur sortie de ce compartiment, ciblant également le complexe vers les endosomes. Cependant, des études récentes ont permis de démontrer que la chaîne invariante joue également un rôle dans la maturation des lymphocytes B (43;112-114). La queue cytoplasmique de la chaîne invariante murine est la portion responsable de la maturation des lymphocytes B et permet de conduire à leurs différenciations (114). Elle est capable d'initier une cascade de signalisation transmise au noyau. Elle entraîne l'activation de protéines kinases résultant dans la modulation du domaine d'activation de p65, un membre de la famille des NF- κ B, ou de ses coactivateurs (112). De plus, il a été démontré que la portion cytoplasmique de Ii est relâchée au niveau du cytoplasme dans des lymphocytes B primaires et des cellules 293 transfectées (Figure 1.8). Ce clivage au niveau du transmembrane de Ii est essentiel pour l'activation de NF- κ B et la différenciation des lymphocytes B (113). Ce clivage de Ii avait déjà été observé au niveau de la forme humaine de Ii par Lippé et

Dobberstein, mais son rôle restait alors inconnu (115). Aucune étude n'a encore évalué la capacité des différentes isoformes humaines à induire une activation et différenciation des lymphocytes B.

1.5 L'isoforme p35 de la chaîne invariante

1.5.1 La rétention au niveau du RE de Iip35

Chez l'humain, les isoformes p35 et p43 de la chaîne invariante possèdent dans la région cytoplasmique un motif de rétention au niveau du RE de type di-arginine (R-X-R) (105;116). Ce motif entraîne la rétention des trimères de Iip35 au niveau du RE en absence de classe II (62). De plus, la présence d'une seule molécule Iip35 au sein d'un trimère entraîne la rétention des formes p33 associées (62). Ce n'est que lorsque les molécules de classe II s'associent au trimère que le motif de rétention est inactivé. La sortie du complexe serait dû à un masquage du R-X-R de Iip35 par les molécules de classe II (18;117). La fonction exacte du motif de rétention de Iip35 et Iip43 reste encore inconnue. Au niveau de la plupart des cellules présentatrices d'antigènes, les molécules de chaîne invariante sont en vaste excès par rapport au chaînes α et β des classe II vraisemblablement dans le but d'empêcher efficacement la liaison de peptide au niveau du RE. Dans la majorité des cellules exprimant du classe II, la forme p35 de Ii correspond à 20% du niveau total de Ii et statistiquement 48% des molécules de Ii font partie d'un trimère contenant au moins une molécule de

Iip35 (63;118). Ceci permettrait de favoriser la rencontre entre les molécules de classe II et les trimères de Ii et/ou préviendrait le ciblage vers les endosomes d'une trop grande quantité de Ii qui possède notamment la capacité de fusionner les compartiments endosomaux (66;119-122). Bien que le mécanisme de rétention reste encore controversé, il mettrait en jeu le transport retrograde de Iip35 du Golgi au RE (116;123).

1.5.2 Les différents mécanismes de rétention au niveau du RE

La rétention d'une protéine au niveau du RE peut être obtenue par deux mécanismes : (a) l'empêcher de se retrouver au niveau des vésicules de transport quittant le RE et/ou (b) ramener vers le RE les protéines qui ont réussi à sortir. Ce second mécanisme est attribuable à trois types de signaux de récupération. Les protéines solubles ciblées vers le RE possèdent entre autres une séquence de type H/DEL au niveau de leurs régions C-terminales. Dans le cas des protéines membranaires, c'est plutôt un motif di-basique de type di-lysine ou di-arginine que l'on retrouve près de l'extrémité de leurs domaines cytoplasmiques. Ces motifs de rétention de type di-basique possèdent plusieurs rôles (Figure 1.15). On peut les regrouper en quatre grandes catégories : (1) maintenir les protéines résidentes du RE au niveau de ce compartiment, (2) contrôler l'assemblage des complexes multi-protéiques membranaires en retenant les différentes sous-unités au niveau du RE tant que le complexe n'est pas formé, (3) cibler les protéines vers les compartiments intermédiaires/cis-

Golgi, et (4) servir d'ancrage pour les protéines du coatomer et par conséquent jouer un rôle central dans le transport rétrograde et la machinerie de ciblage du Golgi.

1.5.2.1 Les motifs de type di-lysine (KKXX)

Les six résidus DEKKMP du domaine cytoplasmique de la protéine E19, une protéine de l'adénovirus de type 3, ont été les premiers identifiés comme suffisant pour la rétention d'une protéine au niveau du RE (124). Lorsque cette séquence est greffée aux molécules CD4 ou CD8, elle entraîne leur rétention au niveau du RE. Il a ensuite été démontré que ce motif doit être présent à l'extrémité C-terminale de E19 pour être fonctionnel et que, dans l'ensemble, les lysines ne pouvaient pas être remplacées par des arginines ou histidines (124;125). Ce motif a ensuite été identifié au niveau d'une multitude de protéines résidentes du RE (Table 1).

| Protéine | Séquence | Type | Références |
|--|------------|------|------------|
| 53-kDa Sarcoplasmic protein | ETPKNRYKKH | I | (125) |
| ERGIC-53 | QQEAAAKKFF | I | (126) |
| High affinity Ig eceptor α -subunit | QKTGKGKKG | I | (127) |
| Oligosaccharyl transferase b-subunit | KKLETFKKTN | I | (128) |
| UDP-glucuronosyltransferase 1A | VKKAHKSKTH | I | (125) |
| Vma21 | HKVDGNKKED | I | (129) |
| E3 de l'adénovirus humain type 2 | RSFIDEKKMP | I | (125) |

Table I. Exemples de motifs de rétention di-lysine

Le motif di-lysine est conservé chez les eucaryotes et des expériences de mutagenèse ont montré une forte conservation entre la levure et l'humain (128;130). Les acides aminés entourant le motif sont également importants. La rétention au niveau du RE est abolie si les résidus environnants sont des prolines ou des glycines. L'importance de cet environnement pour l'exposition des lysines ou la formation d'une structure tridimensionnelle reste encore inconnue. De plus, la localisation de ce motif par rapport à la membrane plasmique est importante. Au moins cinq acides aminés doivent séparer le premier résidu cytoplasmique du motif KKXX. Finalement, ces motifs di-lysines sont retrouvés au sein de plusieurs protéines faisant partie de complexes multi-protéiques empêchant la sortie prématurée des différentes sous-unités. C'est le cas par exemple du récepteur de l'IgE dont la chaîne α possède un motif di-lysine. Ce dernier est masqué stériquement par la chaîne γ du récepteur lors de l'assemblage des 2 sous-unités permettant la sortie du complexe (127).

1.5.2.2 Les motifs de type di-arginine (R-X-R)

Comme le montre la table 1, les motifs di-lysine sont retrouvés principalement au niveau des protéines de type I. Les quelques protéines de type II identifiées comme résidentes du RE ne possèdent pas de motif di-lysine mais plutôt un motif de type di-arginine ou R-X-R. Les principaux éléments de ce motif sont deux résidus arginine près de l'extrémité cytoplasmique N-terminale en positions 2 et 3, 3 et 4, 4 et 5 ou séparés par un résidu en position 2 et 4, ou 3 et

5 (116). Ces caractéristiques ont été déterminées par mutagenèse de la région cytoplasmique de Iip35.

Plusieurs protéines qui possèdent également un motif de rétention de type R-X-R ont été caractérisées (Table 2). Les sous-unités Kir6.1, Kir6.2 et SUR1 du canal de potassium sensible à l'ATP (K_{ATP}) possèdent un motif R-X-R qui est masqué de manière séquentielle lors de l'assemblage des sous-unités. Ceci permet d'assurer que seuls les canaux correctement assemblés soient présents au niveau de la membrane plasmique (131). Un motif R-X-R semblable se retrouve au niveau des sous-unités GB1 du récepteur GABA_B. Celui-ci est masqué lors de l'association aux sous-unités GB2, permettant l'expression à la surface cellulaire d'hétérodimères correctement assemblés (132). Finalement, un motif R-X-R est également retrouvé au niveau de la sous-unité NR1 du récepteur NMDA permettant de réguler le niveau d'expression de surface (133).

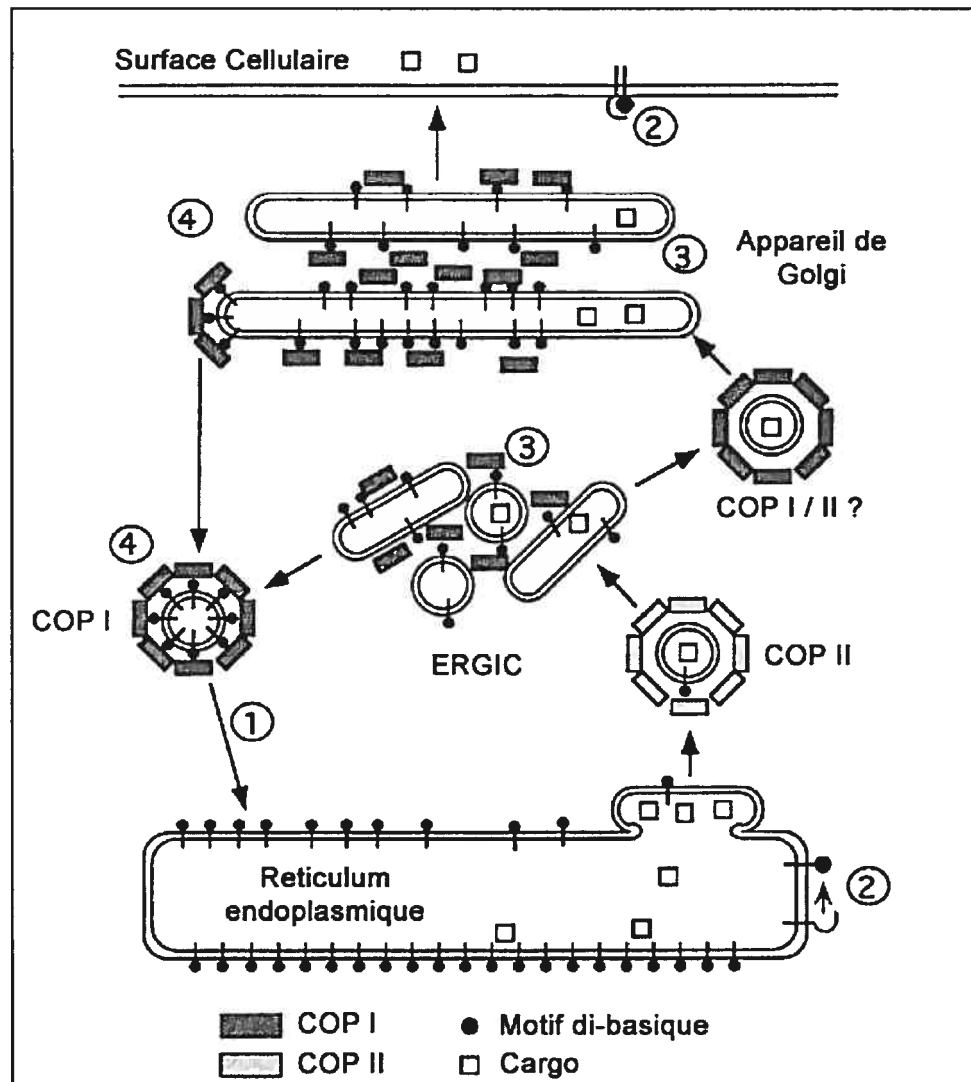


Figure 1.15. Rôles des motifs di-basiques au niveau cellulaire.

(Adapté de Teasdale et al., Annul review of cell and develop. Biol. 1996, Vol. 12, pp 27-54)

En examinant les autres molécules de type II possédant un motif R-X-R, on se rend compte que contrairement aux signaux di-lysine qui doivent être positionnés précisément au niveau C-terminal, les signaux di-arginines peuvent

être retrouvés au niveau de plusieurs régions (N-terminale cytoplasmique, boucles intracellulaire, C-terminale cytoplasmique) (116;131).

1.5.3 L'association de β -cop et 14-3-3 à la chaîne invariante p35

Plusieurs études ont permis de démontrer le rôle des vésicules COP-I dans le transport rétrograde vers le RE des protéines possédant un motif di-lysine (124;128;130;134;135). Très récemment, deux études ont permis de démontrer une association entre les sous-unités du coatomer de COP-I et le motif de rétention de type di-arginine (123;136). De plus, l'association de ces signaux de rétention à une séquence de « relâche » a été proposée pour expliquer le masquage et la sortie du RE des molécules possédant un motif de type R-X-R (123). Ce motif de « relâche » mettrait en jeu la protéine adaptatrice 14-3-3 β .

| Protéine | Séquence | Type | Références |
|---|-------------|--------------------------|------------|
| 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase | MDVRRRSEKP | II | (137) |
| Chaîne invariante humaine (p35) | MHRRRSRSCR | II | (116) |
| GPI-anchor biosynthesis protein (PIG-A) | MANRRGGGQG | II | (137) |
| Sous-unité Kir6.1 des canaux potassium | QNSLRKRNSM | Multiplés transmembranes | (131) |
| Sous-unité Kir6.2 des canaux potassium | RGPLRKRSVA | Multiplés transmembranes | (131) |
| Sous-unité Sur1 des canaux potassium | RVVNRKRPAR | Multiplés transmembranes | (131) |
| Sous-unité GB1 du récepteur GABA β | RQQLRSRRHPP | Multiplés transmembranes | (132) |
| Sous-unité NR1 du récepteur NMDA | SSFKRRRSSK | Multiplés transmembranes | (138) |

Table II. Exemples de motifs de rétention di-arginine

1.5.3.1 Les manteaux COP

Les vésicules formées par les manteaux COP sont chargées du transport des molécules dans les compartiments précoces des voies de sécrétion, soit entre le RE et le Golgi, soit entre les citernes golgiennes (139;140). Deux types de manteaux ont pu être identifiés, COP-I et II. Le premier est associé aux vésicules assurant les échanges intra-golgiens ou le transport rétrograde du Golgi vers le RE tandis que le second est impliqué dans le transport antérograde des protéines du RE vers l'ERGIC (141). Dans le cadre de notre étude, nous nous intéresserons particulièrement aux manteaux de type COP-I qui seraient impliqués dans le transport rétrograde de la chaîne invariante p35 (123). Ces complexes protéiques imposent à la membrane une forte courbure et donnent ainsi naissance à un bourgeon d'un diamètre de moins de 100 nm, précurseur d'une vésicule de transport individualisée ou d'intermédiaires de transport encore mal connus tels que les tubules. Les manteaux COP-I sont composés d'un coatomer (un complexe stable de 700-800 kDa) et de la GTPase ARF. Le coatomer est formé de sept sous-unités α , β , β' , γ , δ et ϵ (142).

La sous-unité ϵ est un élément structural essentiel pour le coatomer permettant la stabilisation des sous-unités α . La formation des complexes COP est contrôlée par l'activité de la protéine ARF. L'ARF est une GTPase avec une longue queue faite d'un acide gras. L'échangeur qui va activer l'ARF se trouve dans la membrane bourgeonnante. Quand l'ARF est activée, sa queue d'acide gras devient exposée et l'ARF s'insère dans la membrane. L'ARF dans la

membrane permet aux coatomers de s'assembler autour de la membrane et ceci créera une vésicule sphérique. La drogue brefeldin A (BFA) inhibe l'échange de GDP pour GTP, et bloque le transport vésiculaire à cette étape. La présence d'un activateur de l'hydrolyse du GTP dans la membrane cible inactive l'ARF. On pense que ceci change la conformation de l'ARF de manière à ce qu'il ne se lie plus à la membrane. Le coatomer se dissocie, permettant la fusion de la vésicule.

Il semble que les coatomers concentrent également des protéines destinées à être transportées. Pour des protéines membranaires, cette sélection peut s'effectuer par contact direct avec le manteau. C'est le cas notamment des protéines possédant un motif de rétention di-basique qui sont retenues au niveau du RE par les protéines COP-I (134;143). Pour des protéines situées à l'intérieur de la vésicule, la sélection doit faire intervenir des protéines transmembranaires assurant le lien entre le contenant (le manteau) et le contenu. C'est le cas par exemple de la protéine BiP qui possède dans sa région C-terminal une séquence de type Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) reconnue par le récepteur KDEL au niveau du Golgi (144;145). Cette fixation permet de ramener les protéines vers le RE, par l'intermédiaire des vésicules COPI (146), où un changement de pH entraînera la libération du ligand (147). Un transport rétrograde indépendant de COPI a également été suggéré récemment, mais son mécanisme d'action reste nébuleux (148;149).

1.5.3.2 Les protéines 14-3-3

Les protéines de la famille des 14-3-3 sont sous formes dimériques et se lient à des sérines phosphorylées qui font parties d'une séquence consensus de type RSXpSXP (Figure 1.16) (116;150-153).

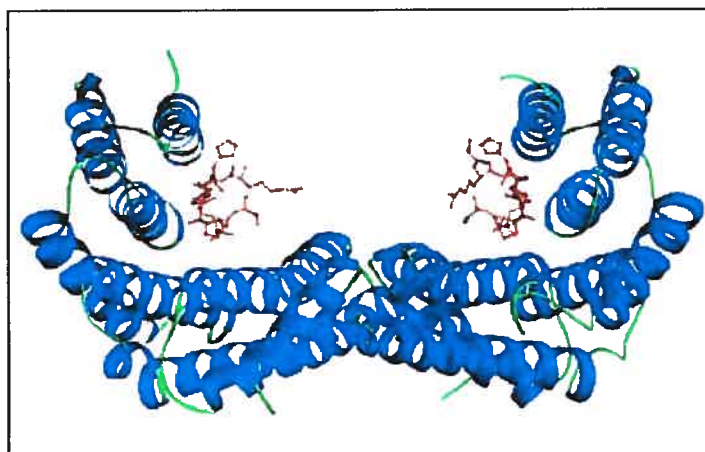


Figure 1.16. Structure dimérique de 14-3-3 epsilon interagissant avec deux peptides phosphorylés.

Structure cristalline de la forme dimérique de 14-3-3 epsilon humain montrant que chaque unité est composée d'hélices anti-parallèles. La dimérisation conduit à la formation d'une niche chargée négativement entre les deux monomères. Cette niche est composée de résidus non polymorphiques qui interagissent avec les séquences peptidiques phosphorylées. La figure représente un dimère de 14-3-3 epsilon couplé à deux peptides phosphorylés possédant le motif de reconnaissance de 14-3-3.

Plus de sept isoformes de 14-3-3 ont été identifiées chez les mammifères (β , γ , ϵ , Z , σ , τ and ζ). Il est intéressant de noter que la protéine 14-3-3 exerce une panoplie de fonctions dépendamment de la protéine à laquelle elle s'associe

parmi la centaine de candidats identifiés. Jusqu'à présent, les différents rôles de 14-3-3 sont (1) d'agir comme molécule adaptatrice et favoriser les interactions protéines-protéines, (2) contrôler la localisation des protéines au niveau des compartiments cellulaires et (3) activer ou inactiver des enzymes.

1.5.4 L'expression de Iip35 au niveau de certaines pathologies

L'importance de la forme p35 de la chaîne invariante est encore inconnue, d'autant plus que chez la souris cette forme n'existe pas. Cependant, il est intéressant de noter qu'une dérégulation du niveau d'expression de Iip35 est souvent associée à une pathologie. Ainsi, les lymphocytes du sang périphérique de patients atteints de leucémie lymphocytaire chronique ou de leucémie à tricholeucocytes expriment un niveau anormalement élevé de Iip35 par rapport à la forme p33 (154-156). L'impact de cette surexpression sur les capacités de présentation de ces cellules lymphocytaires reste encore à être déterminé. Cette surexpression pourrait notamment favoriser la présence de chaînes Iip35 non-phosphorylées et par conséquent la rétention des molécules de classe II au niveau du RE limitant ainsi leurs capacités de présenter des antigènes tumoraux.

Récemment, une dérégulation du niveau de Iip35, mais cette fois-ci à la baisse, a été observée au niveau des lymphocytes B de patients atteints de diabète de type 1 (157). La transfection de Iip35 au niveau de ces cellules a permis de rétablir les défauts de maturation des classe II et la présentation de peptides.

1.6 La Molécule HLA-DM

L'échange du fragment CLIP sur les molécules de classe II par un antigène peptidique est facilité par le faible pH des compartiments lysosomaux ou MIIC (158). Ce processus est cependant beaucoup trop lent et n'est pas suffisant en soit pour assurer un échange peptidique adéquat dans le court délai (0.5-1.5 h) qui précède l'expression de surface des classe II (98). De plus, une relâche spontanée du CLIP générerait des molécules de classe II « vides » instables qui auraient tendance à s'agréger (159;160).

Les molécules de classe II ont par conséquent besoin de l'aide d'un chaperon lors de la relâche du CLIP et du chargement de peptides (Figure 1.17). Ce chaperon porte le nom de HLA-DM chez l'humain et H2-M chez la souris. HLA-DM est une protéine hétérodimérique codée par les gènes *DMA* et *DMB* au niveau du locus du CMH (161). Le gène *DMA* code pour la protéine $DM\alpha$ d'environ 26 kDa qui sera ensuite modifiée par l'ajout de deux groupements d'oligosaccharides lui conférant un poids moléculaire de 33-35 kDa. Dans le cas de $DM\beta$, le gène *DMB* code pour une protéine de 27 kDa à laquelle sera ajouté un groupement d'oligosaccharide attribuant un poids moléculaire de 30-31 kDa à la protéine mature (162;163). Les chaînes α et β nouvellement synthétisées s'assemblent au niveau du RE en hétérodimères. Contrairement aux molécules de classe II classiques, HLA-DM ne semble pas s'associer à la chaîne invariante, du moins cette association semble difficile à démontrer (162). Des complexes H2-M et Ii ont été co-immunoprécipités après une lyse à la

digitonine ou suite à un « cross-link », cependant l'existence et l'importance de cette interaction restent encore incertaines (164). Ce qui semble clair, c'est que l'interaction entre HLA-DM et Ii n'est pas requise pour un assemblage efficace de DM et la sortie du complexe $\alpha\beta$ du RE (163-166).

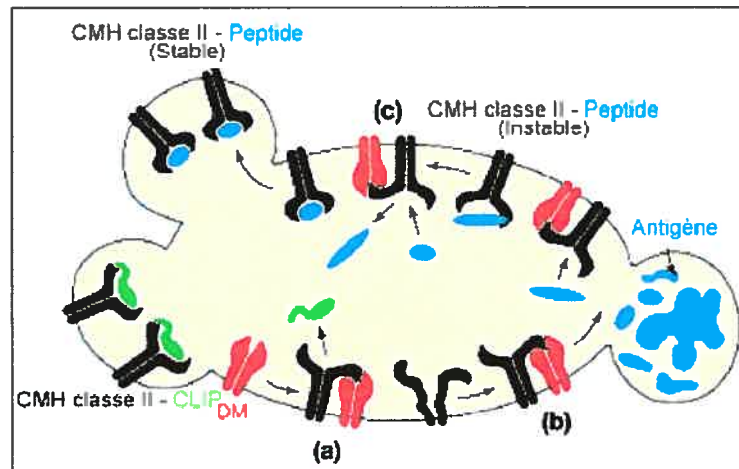


Figure 1.17. HLA-DM est un chaperon des molécules de classe II au niveau des compartiments endosomaux / lysosomaux.

HLA-DM interagit avec les complexes de classe II / CLIP et catalyse la relâche du CLIP. (b) HLA-DM stabilise les molécules de classe II vides. (c) HLA-DM se décroche des molécules de classe II dès qu'un peptide stable est présent au niveau de la niche peptidique. Lorsqu'un peptide instable se lie au CM de classe II, il n'entraîne pas la dissociation de HLA-DM et par conséquent l'activité catalytique de HLA-DM entraîne la relâche du peptide. (Tiré de Vogt *et al.* TIBS, vol.24, n.4, pp 150-154, 1999).

Au niveau structural, la différence majeure entre HLA-DM et une molécule du CMH de type classique (DR, DP et DQ) réside au niveau de la niche peptidique. Cette région est refermée sur elle-même dans le cas de HLA-DM rendant quasi impossible la présentation de peptides antigéniques (Figure 1.18) (14;37). De plus, à l'inverse des molécules classiques, HLA-DM est très peu

polymorphique (167) et la majorité des molécules résident au niveau des MIIC plutôt qu'à la surface cellulaire (168). Un faible niveau de HLA-DM a été détecté à la surface cellulaire et serait dû à la fusion entre les MIIC et la membrane plasmique (169). Cette accumulation à la surface réduirait considérablement sa présence au niveau des MIIC. Par conséquent, l'exocytose de HLA-DM est rapidement suivie d'une internalisation et un re-ciblage vers les MIIC. Cette internalisation est due à la présence d'un motif de ciblage de type tyrosine (YTPL) présent au niveau de la queue cytoplasmique de DM β (166). La mutation de ce motif conduit à une accumulation de HLA-DM à la surface cellulaire.

La fonction de HLA-DM a originalement été déterminée à partir d'études sur des lymphocytes B mutants (35;170;171). Ces mutants avaient été générés par irradiation ou mutagenèse à l'EMS, entraînant la perte de larges segments du CMH sur un ou deux des chromosomes. Les mutants ayant perdu l'expression de HLA-DM mais pas celle de HLA-DR présentaient plusieurs changements phénotypiques : 1) Perte d'épitopes conformationnels de plusieurs anticorps monoclonaux, 2) Incapacité à former des dimères de HLA-DR stables en SDS, 3) Accumulation de complexes classe II / CLIP, et finalement 4) Perte de la capacité de présentation antigénique. Le phénotype sauvage de ces cellules pouvait être rétabli par l'expression de HLA-DM (162;171). Ces études ont ainsi permis de déterminer que HLA-DM est responsable de la relâche du CLIP des molécules de classe II. Des expériences *in vitro* ont ensuite démontré le rôle

catalytique de HLA-DM dans la dissociation des complexes classe II / CLIP (172-174). Cette activité ne se limite pas au CLIP, mais également aux peptides possédant une constante de dissociation élevée et par conséquent une faible affinité pour les molécules de classe II (42;172-176).

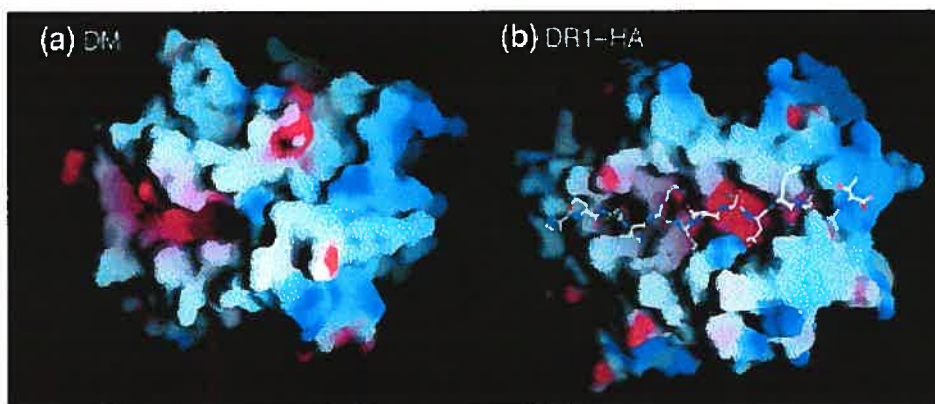


Figure 1.18. Comparaison entre la niche peptidique de HLA-DM et HLA-DR1.

(a) La niche peptidique de HLA-DM est refermé sur elle-même et par conséquent ne permet pas l'association de peptides. (b) Par contre au niveau des molécules de classe II, la niche peptidique est dotée de plusieurs poches permettant la liaison peptidique.

(Tiré de Vogt *et al.* TIBS, vol.24, n.4, pp 150-154, 1999).

1.7 La Molécule HLA-DO

Les molécules HLA-DO chez l'humain et H2-O chez la souris sont des hétérodimères de classe II codés par les gènes du CMH (177;178). Tout comme HLA-DM, elles sont dites non-classiques dû à leur faible polymorphisme et leur incapacité de lier des peptides (179). De plus, les gènes codant pour les molécules α et β de HLA-DO sont séparés par environ 200 kb, contrairement

aux gènes codant pour les molécules α et β des CMH de classe II classique qui se retrouvent en paires. Les chaînes α et β de HLA-DO ont un poids moléculaire de 25 kDa et 28 kDa respectivement. Deux chaînes d'oligosaccharides sont rajoutées à la chaîne α et une seule à la chaîne β , augmentant leurs tailles à environ 32-34 kDa et 33-34 kDa respectivement (177;178). Le poids moléculaire de la chaîne β est relativement plus élevé que les autres chaînes β du CMH du à la longue queue cytoplasmique de cette protéine chez l'humain et la souris. L'évidence d'une association entre les protéines DO α et DO β n'a été démontrée qu'à la suite de la découverte de l'équivalent murin, H2-O (177). La chaîne β de H2-O, initialement appelée A β 2, a été découverte grâce à son homologie aux autres chaînes β du CMH (180). La chaîne α a ensuite été clonée et identifiée grâce à son association à la chaîne β au niveau protéique (181). À la suite de leur synthèse dans le RE, les chaînes α et β s'associent en hétérodimères. Cependant cette association n'est pas suffisante pour permettre la sortie du complexe lorsque les 2 chaînes sont exprimées dans des cellules HeLa (178). Contrairement aux molécules du CMH de classe II classique dont la sortie est favorisée par la chaîne invariante, la sortie des molécules HLA-DO du RE est très peu améliorée par Ii. Une sortie efficace du complexe nécessite la co-transfection des chaînes α et β de HLA-DM au niveau de ces cellules entraînant la formation de complexes DM/DO capables de sortir efficacement du RE (178).

1.7.1 Modulation de HLA-DM par HLA-DO

Tout comme HLA-DM, le complexe DM/DO se retrouve principalement au niveau des MIIC. Ces complexes DM/DO ne sont pas uniques aux cellules transfectées, ils sont également présents au niveau des cellules exprimant constitutivement ces molécules (36;178;182;183). On observe aussi une association entre les molécules H2-O et H2-M au niveau des lymphocytes B murins (178;184). Le rôle exact de HLA-DO est encore très controversé. Lorsque surexprimé dans des cellules transfectées, HLA-DO affecte l'activité catalytique de HLA-DM, entraînant une accumulation de CLIP à la surface cellulaire (36;183). Ceci conduit à une diminution, par exemple, d'antigènes mycobactériens spécifiques (185). Par conséquent, HLA-DO semble être un inhibiteur de HLA-DM. Cependant, quelle serait la pertinence, au point de vue biologique, d'avoir besoin d'une molécule (HLA-DO) pour inhiber l'activité d'une autre (HLA-DM) alors que le même effet pourrait être accompli plus facilement en diminuant l'expression de la deuxième? Des expériences supplémentaires ont permis de déterminer que HLA-DO n'agit pas comme un simple inhibiteur de HLA-DM, mais plutôt module l'activité de celle-ci en fonction du pH (182;184;185). L'activité de HLA-DM est optimale à pH 5.0, cependant elle est encore présente à pH 6.0. L'association de HLA-DO avec HLA-DM permet de maintenir l'activité de cette dernière au pH lysosomal (pH 5.0) mais l'inhibe complètement au pH des endosomes précoces (pH 6.0).

Ainsi, l'échange peptidique se ferait principalement au niveau des lysosomes ou des endosomes tardifs dans les cellules exprimant HLA-DO.

Dans le cas des lymphocytes B, l'internalisation des antigènes fait suite à la fixation aux immunoglobulines présentes à la surface cellulaire (186;187). Étant donné que cette interaction permet de stabiliser certains domaines des antigènes, le profil de dégradation des antigènes libres versus ceux liés à un anticorps est souvent différent (188). Le pH des vésicules de la voie endosomale n'est pas assez bas pour conduire à la dissociation des antigènes des complexes antigènes-anticorps de haute affinité. Cette dissociation nécessite un pH très acide, comme celui retrouvé au niveau des lysosomes. Par conséquent, l'association de HLA-DO à HLA-DM défavoriserait l'échange du CLIP pour des antigènes de faible affinité ou ceux internalisés par pinocytose. Ce n'est qu'une fois rendu aux lysosomes ou endosomes tardifs que HLA-DM pourra permettre l'échange peptidique avec des antigènes ayant une haute affinité pour les immunoglobulines de surface. Cette hypothèse se base sur les résultats observés chez les souris ayant une délétion des gènes H2-O α . Au niveau des lymphocytes B de ces souris, les études démontrent une augmentation significative du niveau de présentation des antigènes internalisés par pinocytose (184). Le profil des peptides présentés par les classe II est donc modifié par l'absence de H2-O α . Lorsque les peptides associés aux molécules du CMH de classe II sont élués des cellules DO-negative et DO-positive, 20% des peptides sont dépendant de la présence ou non de DO (185). De plus, ce n'est qu'au niveau des cellules n'exprimant pas HLA-DO que l'on peut éluer de

longs peptides des classe II, probablement dû à une association au niveau des endosomes précoces. Par conséquent, la présence de HLA-DO permettrait de moduler le profil peptidique afin d'augmenter la spécificité des interactions entre les lymphocytes B et T en favorisant la présentation de peptides de haute affinité.

Une étude récente (par le même groupe qui avait proposé l'hypothèse de la modulation en fonction du pH) suggère un autre rôle pour la molécule HLA-DO (189). Tout d'abord, HLA-DO n'aurait qu'un faible effet sur la présentation de molécules internalisées par pinocytose, contrairement aux observations des études précédentes. De plus, il semblerait que l'expression de HLA-DO favorise la présentation de plusieurs épitopes internalisés par des récepteurs de faible ou moyenne affinité. La présence de récepteurs de forte affinité abolit cette dépendance pour HLA-DO et conférerait ainsi un avantage aux lymphocytes B de haute affinité notamment ceux présent au niveau des centres germinatifs qui n'expriment pas HLA-DO (189;190). La controverse autour du rôle exacte de HLA-DO persiste encore et d'autres études seront encore nécessaires pour comprendre les fonctions de cette molécule.

1.7.2 Régulation de l'expression de HLA-DO

HLA-DO est exprimée principalement au niveau des lymphocytes B, de certaines cellules épithéliales du thymus et très faiblement au niveau des cellules dendritiques (177;184;191). Cette distribution cellulaire restreinte suggère une régulation différente de celle des molécules du CMH de classe II,

de HLA-DM ou Ii. Contrairement aux autres molécules du CMH, l'ARNm de HLA-DO α est faiblement exprimé et ceci est probablement dû à un défaut de polyadénylation (192). Malgré cette faible expression, la régulation du gène codant pour HLA-DO α est similaire à celle des autres molécules du CMH (192) et est inductible par l'IFN- γ (193). Par conséquent, il semble que ce soit le gène de HLA-DO β qui soit assujéti à une régulation distincte. Les premières évidences en ce sens ont été rapporté par le group de Eric Long qui démontra qu'au niveau de lymphocytes B mutants (RJ2.2.5), l'ARNm de HLA-DO β est détectable bien que le gène de HLA-DR β ne soit pas activé. De plus, l'expression de DO β et H2-O β n'est pas augmentée par un traitement à l'IFN- γ (193;194). Les cellules RJ2.2.5 ont par la suite été caractérisées comme étant déficientes en CIITA, cette molécules étant responsable de l'induction des gènes du CMH de classe II suite à une stimulation par l'INF- γ . Il a donc été considéré que l'expression du gène de HLA-DO β est indépendante de CIITA et que d'autres facteurs nucléaires sont impliqués. Cette notion a ensuite été renforcée par une étude comparant les transcrits de cDNA issus de l'ARNm des cellules CIITA $^-$ et CIITA $^+$ et qui arriva à la conclusion que les gènes codant pour HLA-DO α et HLA-DO β sont régulés différemment (195).

Cependant, d'autres études semblent conférer à CIITA un rôle dans l'expression de HLA-DO β . Ponzoni *et al.* ont démontré une augmentation du niveau d'expression d'ARNm de HLA-DO β à la suite d'un traitement à l'IFN- γ de cellules de neuroblastomes (196). Ces ARNm sont cependant hautement instables. De plus, il a été postulé récemment que l'expression de HLA-DO β est

sous le contrôle de CIITA, mais uniquement au niveau des lymphocytes B (197). Chez la souris, l'expression des gènes codant pour CIITA, Ii, H2-M et les CMH de classe II serait différente de celle des gènes H2-Oa et H2-Ob à la suite d'une stimulation par l'IL-4, l'IL-10 ou l'interféron gamma. Au niveau des cellules présentatrices d'antigène professionnelles et non-professionnelles, ce mécanisme pourrait servir à éviter l'activité modulatrice de H2-O (198).

1.8 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse étaient divisés en deux volets gravitant autour de la régulation de la présentation antigénique. Le premier avait pour but de comprendre le mécanisme de masquage du motif de rétention de la chaîne invariante Iip35 par les molécules du CMH de classe II. Le second volet consistait à confirmer ou infirmer l'expression de molécules HLA-DO fonctionnelles en réponse au transactivateur CIITA.

À l'aide de techniques de biologie moléculaire, de cytométrie en flux, de microscopie confocale et de biochimie, nous avons tenté de répondre au premier volet de l'étude. Nous avons ainsi pu déterminer que la queue cytoplasmique de la chaîne β des classe II est essentielle au masquage du motif de rétention de la chaîne invariante p35. Les résultats de cette étude sont présentés au chapitre 2.

Nous avons ensuite tenté d'élucider les différents paramètres en jeu lors du masquage du motif de rétention de Iip35. À l'aide de plusieurs mutants des molécules de classe II ou de la chaîne invariante, nous avons mis en évidence que le masquage par la queue cytoplasmique de la chaîne β est à la fois stérique et dépendant d'un motif. Une arginine en position 232 au niveau de la queue de DR β est requise pour le masquage, toutefois celle-ci doit être présente au niveau d'une queue cytoplasmique d'au moins trois acides aminés. Les résultats de cette étude sont présentés au chapitre 3.

Comme il a été mentionné précédemment, tout comme la chaîne invariante, la molécule HLA-DO est également un chaperon capable de réguler la présentation antigénique et modifier le profil peptidique d'une cellule présentatrice d'antigène. Cependant, une controverse existe autour de la régulation de l'expression des molécules HLA-DO. Nous avons donc tenté de déterminer si la transfection de cellules épithéliales par le transactivateur CIITA entraîne l'expression de HLA-DO dans des cellules autres que les lymphocytes B. Le problème réside au niveau des moyens de détection de la protéine HLA-DO. Très peu d'anticorps existent pour détecter l'expression de la chaîne β de cet hétérodimère. Nous avons donc produit un anticorps monoclonal contre la queue cytoplasmique de HLA-DO β nous permettant de déterminer avec une très grande sensibilité l'expression de cette molécules. Cet anticorps nous a permis de mettre en évidence que la chaîne β de la molécule HLA-DO est exprimée suite à la transfection de cellules HeLa avec le transactivateur CIITA.

La caractérisation de l'anticorps HKC5 ainsi que les résultats de cette étude sont présentés au chapitre 4.

CHAPITRE 2 - ARTICLE

**The MHC class II β chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain
p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal**

Hayssam Khalil*, Alexandre Brunet*, Ingrid Saba*, Rafik Terra*,
Rafick Pierre Sékaly^{†,‡,§} and Jacques Thibodeau^{*,¶}

Publié dans *International Immunology* ©

Vol.15, No 10, pp. 1249-1263

* Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Canada.

† Laboratoire d'Immunologie, Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Canada.

‡ Department of Experimental Medicine, McGill School of Medicine, Montréal, Canada .

§ Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Hôtel-Dieu, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Canada.

Running title: Masking of lip35 di-arginine motif

Keywords: HLA, lip35, R-X-R, di-arginine, antigen presentation

¶ Corresponding author: Jacques Thibodeau, Laboratoire d'Immunologie Moléculaire,
Département de Microbiologie et Immunologie,
Université de Montréal, CP 6128,
Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec
Canada, H3C 3J7
Tel: (514) 343-6279; **Fax:** (514) 343-5701



2.1 SUMMARY

The human-specific p35 isoform of the invariant chain includes an R-X-R endoplasmic reticulum retention motif that is inactivated upon HLA-DR binding. Although the masking is assumed to involve the cytoplasmic tails of class II molecules, the mechanism underlying this function remains to be investigated. Moreover, in light of the polymorphic nature of the class II cytosolic tails, little is known on the capacity of various isotypes or alleles to overcome the retention signal of Iip35. To gain further insights into these issues, we first addressed the proposed role of the HLA-DR cytoplasmic tails. As shown by flow cytometry, the presence of Iip35 in transfected HeLa cells prevented surface expression of HLA-DR molecules lacking their cytoplasmic tails (DR α TM/ β TM). These truncated class II molecules and Iip35 accumulated in the endoplasmic reticulum and co-localized with calnexin, as determined by confocal microscopy. Sensitivity of DR α TM/ β TM to endoglycosidase H treatment confirmed that these molecules do not reach the trans-Golgi network when associated with Iip35. Further characterization revealed that the β chain cytosolic tail is critical for efficient endoplasmic reticulum egress of class II/Iip35 complexes. Interestingly, our results clearly demonstrate for the first time that DP and DQ isotypes can as well overcome the retention motif of Iip35 through a mechanism also involving their very distinctive polymorphic β chain cytoplasmic tails. Altogether, these results further dissect the masking of di-

basic retention signals and emphasize the interplay between class II molecules and Ii for the transport of the complex to the endocytic pathway.

2.2 RÉSUMÉ

L'isoforme p35 de la chaîne invariante humaine possède au niveau cytoplasmique un motif de rétention dans le réticulum endoplasmique de type di-arginine. Bien qu'il semble évident que le masquage de ce motif implique la queue cytoplasmique des molécules de classe II, le mécanisme exact de cet événement reste inconnu. De plus, étant donné la nature polymorphique des queues cytoplasmiques des molécules de classe II, très peu de renseignements existent sur la capacité des multiples isotypes ou allèles à vaincre le signal de rétention de Iip35. Dans l'espoir de fournir des réponses à ces questions, nous avons tout d'abord évalué le rôle de la queue cytoplasmique de HLA-DR. Tel que démontré par nos résultats de cytométrie en flux, la présence de Iip35 dans des cellules HeLa transfectées abolit l'expression de surface de molécules HLA-DR ne possédant pas de queues cytoplasmiques ($DR\alpha^{TM}/\beta^{TM}$). Ces molécules de classe II tronquées s'accumulent au niveau du réticulum endoplasmique et co-localisent avec la calnexine par microscopie confocale. La sensibilité de $DR\alpha^{TM}/\beta^{TM}$ au traitement à l'endoglycosidase H a confirmé que ces molécules n'atteignent plus le trans-golgi lorsqu'elles s'associent à Iip35. De plus, des études supplémentaires ont permis de mettre en évidence le rôle critique de la queue cytoplasmique de la chaîne β pour une sortie efficace du réticulum endoplasmique dans le contexte d'un complexe classe II/Iip35. Finalement, nos résultats démontrent clairement que les isotypes DP et DQ sont capables de surmonter le motif de rétention de Iip35 par un mécanisme mettant

en jeux les queues cytoplasmiques polymorphiques et distinctes de leur chaîne β . Dans l'ensemble, ces résultats permettent de mieux décortiquer le masquage d'un motif de rétention di-basique et mettent de l'emphase sur les interactions entre les molécules de classe II et la chaîne invariante lors du transport vers la voie endosomale.

2.3 INTRODUCTION

Major histocompatibility complex (MHC) class II molecules are cell surface heterodimeric glycoproteins which present antigenic peptides to CD4⁺ T cells. HLA-DR, -DP and -DQ represent co-dominantly expressed isotypes each composed of polymorphic α (~35 kDa) and β (~27 kDa) transmembrane polypeptides (1). Following their synthesis, the α and β subunits associate in the endoplasmic reticulum (ER) together with pre-formed trimers of Ii to produce $(\alpha\beta Ii)_3$ nonamers (2-4). Ii is a non-polymorphic type II protein that folds in part through the groove of the class II molecule, stabilizing the $\alpha\beta$ heterodimer and preventing the undesirable binding of ER polypeptides (5-8). Another function of Ii is to direct MHC class II molecules to the endocytic antigen-loading compartments. Two short leucine-based signals located in the cytoplasmic tail of Ii are responsible for sorting the complex to the endocytic pathway: the membrane-distal sorting signal (Leu-Ile residues at positions 7 and 8) and the membrane-proximal signal (Met-Leu residues at positions 16 and 17). Either signal is sufficient for endosomal localization of Ii (9,10). Such leucine-based signals were first identified in the CD3 γ -chain and the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor (11,12). When these endosomal localization signals are obliterated, Ii is found mostly at the cell surface and has a much longer half-life (13-17).

Once within the acidic compartments, the Ii luminal domain is progressively degraded by various proteinases and a residual class II-associated Ii peptide (CLIP) must be removed from the groove to allow the binding of an antigen and the export of the MHC molecule to the cell surface (18-20). Removal of CLIP is catalyzed by the non-classical HLA-DM heterodimer (21-23).

Ii is a membrane glycoprotein with two highly conserved N-linked glycosylation motifs (24-26). However, Arunachalam et al. have shown that inhibition of Ii glycosylation with tunicamycin did not prevent calnexin association (27). The role of this post-transcriptional modification is not completely understood. Recently, a sequence C-terminal to those modified asparagines was shown to interact with the ribosome-associated membrane protein 4 which controls Ii glycosylation and may contribute to the efficiency of antigen processing (28).

Four isoforms, p33, p35, p43 and p45, of human Ii have been described (29-31). Iip43 and p45 originate from translation of an alternatively spliced exon encoding a C-terminal domain responsible for the inhibition of cathepsins in endosomes (32). Iip35 and p45 differ from Iip33 and p43, respectively, due to the use of a minor 5' in-phase start codon on the mRNA. As a consequence, Iip35 and p45 isoforms bear an N-terminal cytosolic extension of 16 amino acids containing a strong di-arginine ER retention motif (ERM) (14,33). Although the mechanism of retention is controversial, it would involve the

retrograde transport of Iip35 from the Golgi to the ER (33,34). Several proteins encoding an R-X-R motif have been characterized. For example, the ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) subunits Kir6.1, Kir6.2, and SUR1 contain R-X-R-like motifs that are sequentially masked during subunit oligomerization. This assures that only correctly assembled channels reach the plasma membrane (35). A similar R-X-R motif present in the GABA_B receptor GB1 subunit is masked by assembly with GB2, ensuring expression of functional heterodimers (36). Also, surface expression of calcium channels is facilitated by β subunits which mask ER retention domains in α subunits (37). Finally an R-X-R-type motif is found in the C-terminal tail of the NMDA receptor subunit NR1 that regulates surface expression in heterologous cells and in neurons (38).

For nonameric Ii-class II complexes, efficient sorting to the endocytic pathway or the cell surface is dependent on the phosphorylation of p35-specific cytoplasmic serines as well as on the DR-induced "inactivation" of the Iip35 ERM (3,39-41). However, the efficacy of other class II isotypes in masking the di-arginine motif remains to be determined. As opposed to Iip35, the p33 isoform rapidly reaches the endocytic pathway and has a short half-life, even in the absence of class II molecules (4,13,42). Interestingly, mixed trimers consisting of p33 and at least one p35 molecule accumulate in the ER (2,4). Thus, Iip35 plays an important role in coordinating the assembly of newly synthesized Ii with class II molecules and in the transport of the complex to endosomal compartments. In this report, we have used wild-type, truncated and

chimeric versions of MHC class II molecules to demonstrate that the strong di-arginine ER retention signal of Iip35 is inactivated by the cytosolic tail of MHC class II β chains.

2.4 EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.4.1 cDNAs and mutagenesis

cDNAs encoding both the p33 and p35 isoforms of the human invariant chain (43), HLA-DR α (43), HLA-DR β 0101 (DR β 008) (44) as well as DPw2 α and β cDNAs cloned from 45.1 cells were a kind gift from Dr. Eric O. Long (NIH). DP α (43) was cloned in the RSV.5 vector (45) and DP β (44) in the RSV.7 vector, a fusion between RSV.3 (45) and pHEBO (46). DQ α 1 (0102) and DQ β 1 (0602) cDNAs cloned into the pLNCX retroviral vector have been obtained from Dr. William W. Kwok. All mutations were introduced by the PCR overlap extension method (47) and the sequence of the mutagenic oligonucleotides is available upon request. A mutation was introduced in the Ii cDNA in order to eliminate the second start codon (Met17 to Ala) and translate exclusively the long p35 isoform. The mutated cDNA was cloned into the BamHI site of pBluescript KS⁺ vector (Stratagene, Texas) and sequenced. The BamHI insert was subcloned into SR α (48) eukaryotic expression vector bearing the puromycin resistance gene (a kind gift from Dr. F. Denis). Iip35 was also subcloned as a KpnI-NotI fragment into pREP4 (Invitrogen, San Diego, CA). Serines 6 and 8 on Ii were changed to lysine and histidine, respectively (pRep4 Iip35 S6K,S8H). The HLA-DR β chain cDNA coding for a truncated protein (see figure 2.1A) was obtained after introducing a stop codon instead of the phenylalanine-coding triplet at position 221. This DR β TM cDNA was cloned into the RSV.3 vector. The cDNA coding for the truncated DR α chain (Fig.

2.1A) was described previously (49). The two leucine-based sorting signals of the p35 invariant chain were mutated to alanines and cloned into the SR α vector (SR α puro Iip35 LI/ML). The p33 isoform of Ii was generated by mutating the first start ATG triplet of Ii cDNA cloned into pREP4 (pREP Iip33).

The cytoplasmic tail of HLA-DR β was replaced by that of either HLA-DP β or HLA-DQ β . An intermediate DR β molecule (DR β RN:RS) had to be constructed to facilitate cloning. This mutation creates a *Xba* I restriction site near the junction between the transmembrane and the cytosolic region. A first fragment was amplified from pBS KS 3'DR β 008.14 using a DR β 3' BamHI:Clal.D primer which harbors *Bam*HI and *Clal*I restriction sites for latter cloning steps, and a mutagenic primer encoding the RN:RS mutation (DR β RN:RS.BglI.c). A second reaction was made on pBS KS 3'DR β 008.14 using a complementary fusion primer (DR β RN:RS.BglI.b). Following the overlap reaction, the PCR product was subcloned into *Sty*I and *Clal*I sites of pBS KS 3'DR β 008.14 (pBS DR β RN:RS). The DNA sequence was confirmed by sequencing.

Prior to cloning the cytoplasmic tails of DP β and DQ β , pBS DR β RN:RS was digested with *Bam*HI and cloned in the opposite orientation. Overlapping oligos corresponding to the sequence of DP or DQ cytosolic tails were cloned in pBS DR β RN:RS.1 vector digested with *Bgl*II and *Xba*I. The oligos used were: DR β /DP β b (5'-CT AGA CTA TGC AGA TCC TCG TTG AAC TTT CTT A-3'), DR β /DP β c (5'-GA TCT AAG AAA GTT CAA CGA GGA TCT

GCA TAG T- 3'), DR β /DQ β Cyto-B401.b (5'-CT AGA CTA AT GCA GTA GAC CTT TCT GA-3') and DR β /DQ β Cyto-B401.c (5'-GA TCT CAG AAA GGT CTA CTG CAT TAG T-3'). The correct sequence was confirmed by sequencing. The chimeric cDNA was cloned as a *XbaI/HincII* fragment into the *XbaI/SmaI* site of SR α puro.

2.4.2 Cell lines and transfections

MHC class II negative epithelial HeLa (ATCC CCL-2) cells were cultured in DMEM (Wisent, St.-Bruno, Quebec, Canada) containing 10% FBS (Wisent) and appropriate selective agents (see below). HeLa cells expressing the wild-type HLA-DR molecule (DR α + DR β 0101) (HeLa DR) or the wild-type DR β chain together with a truncated DR α chain devoid of most of its cytoplasmic tail (see fig. 2.1) (HeLa DR α TM/DR β) have been described elsewhere (49). Stable transfection of the mutated class II molecules was done by the calcium phosphate co-precipitation technique as described (50). Cells resistant to G-418 (Life Technologies, Inc.) and expressing class II $\alpha\beta$ heterodimers were sorted by flow cytometry using the L243 monoclonal antibody. The li cDNAs were transfected using Fugene6 (Roche Molecular Biochemicals, Mississauga, Canada) and selected in 400 μ g/mL puromycin (Sigma, Oakville, Canada) or 50 units/ml hygromycin (Cederlane Laboratories, Ontario, Canada). HEK 293T cells were kindly provided by Dr. Eric Cohen. For transient expression, cells were co-transfected by the calcium phosphate precipitation

method using 2 μ g of each DNA (50). Cells were analyzed 2-3 days post-transfection.

2.4.3 Antibodies

L243 (IgG2a) is an anti-DR mAb which recognizes a conformational epitope on the DR α chain (51). XD5.117 (IgG1) recognizes a linear epitope in the β 1 domain of all class II molecules (52). ISCR3, a kind gift from Dr. Robert Busch, recognizes the $\alpha\beta$ heterodimer through an epitope on the DR α chain (53). R.Ip35N, a kind gift from Dr. Peter Cresswell, is a rabbit antisera specific for a synthetic peptide corresponding to amino acids 1-16 of the amino-terminal extension present on the p35 isoform of Ii (4). BU45 (IgG1) is a mouse mAb specific for a C-terminal epitope of human Ii (The Binding Site, Birmingham, England). Pin.1 mAb (3) recognizes the N-terminal cytoplasmic domain of Iip33 and p35. mAb CerCLIP.1 (IgG₁) is directed against the N-terminal segment of CLIP (PharMingen International). The polyclonal rabbit antibody against calnexin recognizes the carboxy terminal part of the protein (Stressgen, BC). Goat anti-mouse and goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor® or phycoerythrin were obtained from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR).

2.4.5 Flow cytometry and fluorescence microscopy

Intracellular staining for class II molecules or Ii was done on saponin-permeabilized cells as previously described (50). For double stainings, cells were first stained at the surface using biotinylated L243 and avidin-PE or in some cases with ISCR3 and an IgG2b-specific antibody coupled to PE (Molecular Probes). Then, cells were washed, fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with saponin (50) and stained for Ii using BU45 and an IgG₁-specific secondary antibody (PharMingen) coupled to FITC. Cells were analyzed on a FACSCalibur® flow cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, Canada). For confocal microscopy analyses, HeLa cells were grown on coverslips, fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with saponin (50) before staining. HEK 293T cells were first fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with saponin (50) before staining with Pin.1 mAb followed by a goat anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor®488. HEK 293T cells were centrifuged onto microscope slides and examined with a Leica TCS-SP1 confocal microscope using a 100x planapochromat objective.

2.4.6 Western blotting and immunoprecipitations

Cells were trypsinized, washed with cold PBS and sonicated in 400 µl lysis buffer (20 mM Tris pH 7.5/150 mM NaCl) containing protease inhibitors (Roche Diagnostics, Mississauga, Canada). Following sonication, 100 µl of 5% Triton X-100 was added to the supernatant and incubated at 4°C for 30 min. After centrifugation, supernatants were harvested and incubated for two hours

with goat anti-mouse IgG-coated magnetic beads (BioMag®, Polysciences, Inc. Warrington, Pa.) coupled to the appropriate antibody. Following washes in lysis buffer, samples were resuspended in reducing buffer, boiled and subjected to SDS-PAGE. After transfer to nylon membranes (Amersham Biosciences, Canada), proteins were blotted with the appropriate antibody. Secondary antibody (peroxidase-coupled goat anti-mouse; BIO/CAN Scientific, Canada) was used at a 1:1000 dilution for 2 h, and the signal was detected using ECL (Amersham Biosciences). For Endoglycosidase H (EndoH; New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) and Acetyl-neuraminyl hydrolase (neuraminidase; New England Biolabs, Inc.) treatment, immunoprecipitated material or whole cell lysates were digested according to the manufacturer's protocols.

2.5. RESULTS

2.5.1 Iip35 prevents surface expression of truncated HLA-DR molecules

Previous reports have suggested that the association of class II molecules with Iip35 is needed to conceal the ER retention motif on Ii (4,54). To gain insights into the mechanism and molecular determinants involved in this phenomenon, we used transfected HeLa cells expressing HLA-DR molecules devoid of their $\alpha\beta$ cytoplasmic domains (Fig.2.1A). HeLa cells do not normally express Ii or class II molecules and have been extensively used to study their trafficking upon transfection (9,10,14,39). First, a stop codon was introduced at the interface between the transmembrane helix and the cytoplasmic tail coding regions. In general, aromatic amino acids are preferentially located next to transmembrane regions, with tyrosine being restricted to the carboxyl boundary (55). Tyrosine and tryptophan residues may serve to position the TM helix with respect to the lipid bilayer. These residues have been proposed to behave as “floats” with their polar atoms facing water. On the other hand, positively charged residues such as arginine and lysine play a major role in determining the orientation of the TM region as predicted by the “positive-inside rule” (56,57). Based on these studies, we inserted a stop codon after the Y220 residue in HLA-DR β . As for the DR α chain, which lacks a similar aromatic residue, the positively charged lysine residue 215 was kept to ensure the stabilization of the TM helix. In the absence of Ii, truncation of the α and/or β cytosolic tails

did not hinder cell surface expression of class II molecules. Figure 2.1B shows the expression of various α/β combinations at the surface of stably transfected HeLa cells sorted with L243.

Cells stably expressing high levels of control wild type DR α /DR β molecules (DR) were super-transfected with the Iip35 cDNA (Fig. 2.1C) and placed under selection for 2 to 3 weeks. According to previous reports, transfection of Iip35 in these cells should not preclude class II surface expression due to the efficient masking of the ERM (4). This was confirmed by flow cytometry on cells first stained at the surface for HLA-DR, then permeabilized and stained for Ii. Intracellular staining is required to identify Iip35⁺ cells since this isoform does not accumulate at the cell surface (58). As expected, control wild-type DR molecules efficiently overcome the ERM of Iip35 (3,40) and no decrease in cell surface expression of class II molecules was observed in Ii⁺ cells when compared to the negative cell population (Fig.2.2A). Similar results were obtained using the control Iip33 isoform devoid of the strong ERM. It is important to note that these flow cytometry analyses are internally controlled as all stably transfected populations always include a proportion of cells becoming resistant to the selective agent but which are negative for Ii expression. This allows the direct, simultaneous and unbiased comparison of class II surface expression between the Ii⁺ and Ii⁻ subpopulations. Thus, in our flow cytometry analyses, any Iip35-induced intracellular retention of class II molecules unable to mask the ERM would

result in a specific decrease of surface HLA-DR staining for cells in the Ii^+ quadrants as compared to those in the Ii^- quadrants.

The utility of this system for the detection of Iip35-induced retention of class II molecules was tested using the control Iip35 S6K, S8H molecule having the two N-terminal phosphorylated serine residues substituted for positively charged amino acids (Fig. 2.2A). Although the precise effect of these mutations remains to be established, it is clear that these serine residues are critical for the Ii delivery to the endocytic pathway (34,39,40). Indeed, a sharp decrease in class II expression was observed at the surface of Ii^+ cells (Fig. 2.2A). This intracellular retention by the S6K,S8H mutant confirms the DR/Iip35 interaction and validates our experimental system for monitoring the masking of the ERM.

We then assessed the role of the HLA-DR cytoplasmic tails on the ER egress of Iip35. HeLa cells expressing both truncated HLA-DR α and DR β chains (DR α TM/ β TM, fig. 2.1A and B) were stably transfected with Iip35. Cell surface expression of class II molecules was monitored by flow cytometry as above. Figure 2.2A demonstrates that those cells expressing Iip35 have less surface class II molecules as compared to Ii^- cells and that the decrease appears proportional to the level of Ii expression. However, this reduction in class II surface expression was not observed when co-expressed with Iip33 (Fig. 2.2A). The Iip35-induced down-modulation of truncated HLA-DR expression was confirmed using different class II-specific antibodies (Fig. 2.2B and data not

shown). Importantly, we ruled out the trivial possibility that Ii-expressing cells selectively lost one or both of the α TM/ β TM chains, precluding cell surface expression. Figure 2.2C shows that despite heterogeneous staining for surface class II molecules, the Ii-transfected total population of DR α TM/ β TM cells expresses homogeneous levels of total class II molecules.

Due to the lack of HLA-DM in these transfectants, CLIP is not removed from the class II molecules. Therefore, the presence of CLIP at the cell surface reflects the efficient DR/Ii interaction as well as ER egress and targeting of the complex to endosomes where Ii is degraded. As shown by flow cytometry using the CerCLIP.1 mAb, only the full-length class II molecules are bound with CLIP at the cell surface (Fig. 2.2D). Moreover, no CerCLIP.1 staining was observed in permeabilized cells expressing Iip35 and the truncated HLA-DR mutant (data not shown). Altogether, these results show that DR α TM/ β TM are prevented from reaching the cell surface in the presence of Iip35, suggesting that the complex is retained in the ER.

2.5.2 DR α TM/ β TM accumulates in the ER in the presence of Iip35

To further characterize the mechanism responsible for the reduced surface expression of DR α TM/ β TM in Iip35⁺ cells, the sub-cellular localization of DR and DR α TM/ β TM molecules was compared by confocal microscopy. In HeLa DR cells expressing Iip35 or p33, the intracellular class II staining was characterized by the presence of well-defined vesicles reminiscent of

endosomal / lysosomal compartments (Fig. 2.3, panel a,b). Many of these vesicles were also found positive for Ii expression but negative for calnexin, an ER resident chaperone (Fig. 2.3, insets m' and n'). On the other hand, no such small vesicle containing class II and/or Ii was seen in cells expressing DR α TM/ β TM and Iip35 (panels c,g). Moreover, the distribution of these molecules overlapped the one of calnexin (panels k, o and o'). Control DR α TM/ β TM cells expressing Iip33 showed large endocytic DR $^+$,Ii $^+$ vesicles devoid of calnexin (see inset p'). These results demonstrate that the Iip35 ERM is active and retains in the ER those tailless class II molecules.

2.5.3 Iip35 prevents the sialylation of DR α TM/ β TM

To further confirm that the truncated class II molecules are retained in the ER when associated with Iip35, we assessed the sensitivity of their glycans to EndoH and neuraminidase. EndoH removes high mannose but not complex forms of N-linked glycans that are acquired following passage through the medial- and trans-Golgi compartments. Sensitivity to neuraminidase, which catalyses the hydrolysis of N-acetyl-neuraminic acid (sialic acid), reflects an encounter with sialyl-transferase in the trans-Golgi compartment.

Figure 2.4A shows that in the presence of Iip33 or Iip35, wild-type class II molecules acquire EndoH-resistant carbohydrates (black arrow). This maturation is reminiscent of a passage beyond the cis-Golgi compartment and therefore reflects an efficient egress from the ER. The EndoH-sensitive DR β

chains (arrow head) most likely represent those molecules in the ER that have yet to associate with an α chain or which are part of newly associated heterodimers. On the other hand, truncated class II molecules acquired EndoH-resistant carbohydrates when expressed with Iip33 but not with Iip35 (Fig. 2.4B). The sensitivity to neuraminidase of these p33-associated DR β TM molecules suggests that they have acquired sialic acid. Surprisingly, we could not detect any EndoH-resistant Ii molecules, even in cells expressing wild-type HLA-DR (Figure 2.4C). This was true also for Iip35 molecules co-immunoprecipitated with class II molecules using a DR-specific monoclonal antibody (data not shown). These results suggest that the maturation of Ii-bound sugars cannot be used as a read-out for monitoring ER egress in this system (see below). Altogether, these experiments provide biochemical evidence that truncated class II complexes are retained in the ER in the presence of Iip35.

2.5.4 DR α TM/ β TM prevents the cell surface expression of Iip35 LI/ML

In order to unequivocally demonstrate that Iip35 does not access compartments beyond the Golgi or ER, we have generated a mutant molecule devoid of its two leucine-based sorting signals (Fig. 2.1C). This modification was shown previously to direct Ii to the plasma membrane rather than to the endocytic pathway (9,10). Thus, in our system, an efficient masking of the Iip35 ERM should lead to the cell surface expression of Ii. First, HeLa cells stably expressing DR or DR α TM/ β TM were transfected with the mutant Iip35 LI/ML

and analyzed by flow cytometry as above. The level of DR α TM/ β TM at the cell surface sharply decreases upon co-expression of Iip35 LI/ML whereas wild-type class II molecules are not affected (Fig. 2.5A). This result confirms the capacity of Iip35 to prevent expression of truncated class II molecules. Then, we stained transfected cells for the surface expression of Iip35 LI/ML molecules. As expected, when expressed in the absence of class II molecules, no cell surface accumulation of this Ii mutant can be detected (Fig. 2.5b). However, when Iip35 LI/ML was expressed in HeLa DR cells, a significant level of Ii was detected at the cell surface. On the other hand, truncated DR α TM/ β TM did not support cell surface expression of Iip35 LI/ML, corroborating our previous observations that the cytoplasmic tails of HLA-DR are required to overcome the Iip35 ERM (Fig. 2.5b). Accordingly, in these cells, the DR β TM chain did not acquire EndoH-resistant sialylated sugars (Fig. 2.5C, upper panel).

Our biochemical analysis presented above failed to detect EndoH-resistant sugars on Iip35 in DR⁺ cells (Fig. 2.4C). One possibility to explain this result is that Iip35 is degraded rapidly after leaving the Golgi and gaining access to the endosomes. We took advantage of the fact that Iip35 LI-ML accumulates at the cell surface of DR⁺ cells to further characterize the nature of its glycans. Nonetheless, we could not detect EndoH-resistant forms of Ii in DR⁺ cells (Fig. 2.5C, lower panel), suggesting that upon association with class II molecules in the ER, Ii glycans become inaccessible and are no longer

processed to complex forms in the Golgi. The same was observed for the p33 isoform in class II positive cells (data not shown). A control experiment revealed that this lack of sugar maturation on Ii is caused by class II molecules and is not inherent to HeLa cells. Indeed, we could clearly show the acquisition of complex type carbohydrates and even sialic acid moieties on Iip33 which egress the ER in class II negative cells (Fig. 2.5D). These observations are in agreement with previous reports showing that the N-linked oligosaccharides of the α and β chains were processed to the complex form while those on the associated Ii remained predominantly Endo-H sensitive (59). Furthermore, Schaiff et al. have shown that only one of the two N-linked carbohydrates on HLA-DR α is processed to complex-type oligosaccharides in the presence of Ii whereas both are processed in Ii negative transfectants (60). Taken together these results demonstrate the reciprocal impact of MHC class II molecules and Ii, especially p35, on their maturation.

2.5.5 HLA-DR β cytosolic tail is responsible for masking the Iip35 ERM

In order to determine which cytoplasmic tail of the HLA-DR heterodimer is involved in the ER egress of Iip35, mixed pairs containing either a truncated α or β chain were expressed in HeLa cells (see Fig. 2.1A and 2.1B). Cell surface expression of these truncated molecules in HeLa cells confirmed their proper folding and membrane anchoring (Figure 2.1B). As shown in figure 2.6A, the

expression profile of DR α TM/ β in the presence of Iip35 was similar to the one observed for Ii negative cells. On the other hand, we observed a markedly decreased cell surface expression of DR α / β TM in Ii⁺ cells. These results suggest that the DR β chain is required to overcome the Ii ERM.

The critical role of the β chain in masking the Ii ERM was validated by looking at the maturation of class II and Iip35 glycans. Figure 2.6B shows that a significant proportion of the Ii-associated DR α TM/ β class II molecules became EndoH-resistant. Coupled to the near complete absence of complex sugars on DR α / β TM molecules, these results further support the fact that the β chain cytoplasmic tail masks the Iip35 ERM.

The intracellular localization of the truncated molecules was analyzed by confocal microscopy. In DR α TM/ β cells, class II molecules colocalized with Iip35 or Iip33 in small endosomal/lysosomal vesicles (Fig. 2.6C). On the other hand, when the β chain cytoplasmic tail is truncated, DR α / β TM and Iip35 molecules co-localized with the ER marker calnexin and no punctuated, scattered vesicles could be observed (Fig. 2.6C, panel o'). This pattern contrasts with the vesicular co-localization observed between the β -truncated class II molecule and control Iip33 (Fig. 2.6C, panel p').

Finally, to decisively demonstrate that only the DR β cytoplasmic tail can mask the R-X-R motif, we tested the ability of truncated $\alpha\beta$ combinations to support cell surface expression of Iip35 LI/ML. DR and Iip35 molecules

were co-expressed stably in HeLa cells or transiently in HEK 293T cells. As predicted from the above-described experiments using Iip35, we observed the surface expression of Iip35 LI/ML on cells transfected with DR or DR α TM/ β but not on those expressing DR α / β TM (Fig. 2.7). These results conclusively pinpoint the DR β cytosolic tail as the key element needed to overcome the Iip35 ERM.

2.5.6 All class II isotypes mask the Iip35 di-arginine motif

In humans, the family of classical MHC class II molecules comprises three isotypes called HLA-DR, -DP and -DQ. Overall, the crystal structures of the extracellular domains of DR and DQ are very much alike (61) and DP is likely to adopt a similar quaternary structure (62). Isotypic polymorphisms are found in all regions of the proteins including the cytoplasmic portions of both the α and β chains (63). Interestingly, allelic polymorphisms in DQ β allotypes have been described and some arise from the differential splicing of exon 5 in DQB1*06011 and DQB1*05031. Thus, in addition to variations in their own primary structure, most DQ molecules are 8 and 2 amino acids shorter than DR and DP, respectively. This significant polymorphism prompted us to test the capacity of each isotype to mask the R-X-R motif of Iip35.

Having demonstrated the utility of screening for cell surface expression of Iip35 LI/ML (Figures 2.5 and 2.7), we turned to transient transfections to

rapidly assess the capacity of any class II molecule or mutant to mask the R-X-R motif. Moreover, we used human HEK 293T cells to circumvent our repeated inability to generate stable HeLa cells expressing HLA-DQ. All three isotypes, in addition to the DR α / β TM molecule, were efficiently expressed after 48h (see legend, figure 2.8A). As described above, class II molecules lacking the β chain cytoplasmic tail could not support the maturation and sorting of Iip35 LI/ML. Indeed, the ratio of surface over total Ii was low for cells expressing such class II molecules. On the other hand, the ratio was about ten times higher for cells expressing DR and DP molecules showing that both isotypes mask the Iip35 R-X-R motif. Surprisingly, cells expressing HLA-DQ were consistently found to be nearly negative for Iip35 LI/ML surface expression. However, the possibility remained that the di-leucine motif found in the cytoplasmic tail of DQ ((64) and see below) could compensate for the mutation of the two sorting signals of Ii, thus preventing accumulation of the complex at the cell surface. To get around this problem, we repeated the experiment with Iip35 and monitored, by fluorescence microscopy using Pin.1, the presence of Ii in the endocytic pathway. As a matter of fact, the results clearly showed the presence of Ii⁺ vesicles in cells expressing the DQ molecules, suggesting that this isotype can efficiently associate with Ii and mask its R-X-R motif (Figure 2.8B). In cells devoid of a β chain cytoplasmic tail, Iip35 staining did not produce vesicles but rather a diffuse pattern reminiscent of the ER (see figure 2.6). We reasoned that the presence of Ii in the endocytic pathway should result in its processing and

the expression of class II-CLIP complexes at the cell surface. To test this hypothesis, the cells were stained using the CerCLIP.1 antibody that recognizes DR/CLIP as well as DQ/CLIP complexes (Fig. 2.8C). The strong expression of DQ/CLIP complexes at the cell surface confirmed that this isotype can overcome the R-X-R motif of Ii and allow its egress from the ER.

The possibility remains that the DP and DQ β chain polymorphisms preclude masking but that the α chain compensates in these isotypes. To decisively demonstrate the activity of these short cytosolic tails, we used chimeric DR molecules in which the β chain cytoplasmic region was replaced by the one of DP or DQ. These chains were expressed transiently in HEK 293T cells together with the truncated DR α chain (DR α TM/ β cytoDP and DR α TM/ β cytoDQ) and Iip35 (Fig. 2.9A). Positive cell-surface staining for CLIP expression suggested that all three cytoplasmic tails could efficiently mask the Ii-encoded retention motif (Fig. 2.9B). Again, as judged by the presence of Ii in distinct vesicles spread out in these cells (figure 2.9B), we assume that the CLIP staining detected by flow cytometry originates from the processing of Iip35 by acid proteases and the subsequent export of class II/CLIP complexes to the cell surface. Similar results were obtained for stably transfected HeLa cells and no sign of class II ER retention was detected in bi-parametric analyses (data not shown). Interestingly, in HeLa cells, sorting of the DR α TM/ β cytoDQ molecules to endosomes from the Golgi seems less stringent than in HEK 293T cells (figure 2.8A) and we were able to detect

expression of the Iip35 LI-ML molecule at the cell surface (Fig. 2.9C). Although we cannot formally rule out a small contribution of the α chain of DP or DQ in the context of the wild-type heterodimers, our results strongly support a role for the β chain of all class II isotypes in masking the Iip35 ERM.

2.6 DISCUSSION

Ii plays a critical role in maintaining the specificity of class II molecules for antigens of the endocytic pathway (65,66). It prevents peptides from binding to class II molecules in the early stages of biosynthesis (42,54) and directs the complex to a post-Golgi intracellular compartment containing internalized antigens and proteases (67). However, the exact function of the ERM found in Iip35 and p45 remains enigmatic. In most APCs, Ii is present in excess over class II α and β chains, probably to efficiently inhibit peptide uptake in the ER. In various class II-expressing cell types, the Iip35 isoform accounts for 20% of the total Ii pool and an estimated 48% of all Ii exist as heterotrimers containing at least one Iip35 molecule (2,68). This could maximize the chance of an encounter between Ii and class II molecules and/or prevent the sorting of an Ii overload capable of fusing endosomal compartments (69-73). Recently, down-regulation of Iip35 expression in diabetic B cell lines was proposed to impair antigen processing and presentation (74). On the other hand, the impact of the Iip35 overexpression on antigen presentation in tumours such as hairy cell leukemia (75-77). and B-CLL (78,79) remains to be determined.

Individual subunits of multimeric protein complexes are often retained in the ER by arginine- or lysine-based signals (33,80). These retention motifs could be part of quality control mechanisms preventing cell surface expression of partially assembled or misfolded complexes. For example, the R-X-R motif would coordinate the assembly and proper stoichiometry of mature K_{ATP}

channels, GABA_B receptors or NMDA receptors (35,36,81). By analogy, proper assembly of the class II/Ii nonameric protein complex would result in the shielding of the Iip35 retention motif, allowing ER egress. Interestingly, as opposed to its human p33 counterpart, the murine Ii contains an R-X-R sequence in its cytoplasmic tail. Although not as stringent as the di-arginine motif found in the human Iip35, an ER retention mechanism might also operate on the murine Iip33. Characterization of this motif will be required before establishing any functional correlation with the human Iip35 ERM.

Our results clearly identified the β -chain as the critical class II determinant allowing egress of Iip35. However, the mechanism by which this cytosolic tail overcomes the Ii ERM remains to be determined. Di-basic signals were found to bind COP I proteins which mediate retrieval from the Golgi (82,83). Very recently, the coupling of such signals to a “release” sequence has been proposed to explain the masking and ER egress (34). This release motif encompasses the phosphorylated serine at position 8 and binds the 14-3-3 β adaptor protein. Although the binding of COP I and 14-3-3 is mutually exclusive, interaction with the latter is certainly not sufficient to allow phosphorylated Iip35 molecules to leave the ER (39). Thus, we can speculate that unphosphorylated Iip35 bound to class II molecules are retained in the ER because of a COP I-dependent retrograde transport from the cis-Golgi. On the other hand, in the absence of class II molecules, PKC-phosphorylated Iip35

would bind 14-3-3 and be retained by a still unidentified chaperone. The β chain cytoplasmic tail could allow ER egress of Ii by displacing this chaperone.

We are presently investigating if a specific molecular determinant embedded in the cytoplasmic tail of the β -chain is needed to prevail over the Ii ERM. Although a critical motif in the β chain could assist the folding of the Ii cytoplasmic tail and release of a retention chaperone, the poor conservation between DR, DP and DQ isotypes in this region suggests otherwise (63). Such variability would rather be compatible with a steric hindrance mechanism of masking, similar to the one described for the assembled Fc γ receptor (84). The fact that the short (8 amino acids) cytosolic tail of DQ is capable of hiding the retention motif suggests that the N-terminal region of Ii folds in such a manner to keep the R-X-R motif close to the membrane. Such folding could be in line with reported quaternary structure constraints leading to the formation of a coplanar triple-stranded α -helical bundle of Ii cytosolic tails (85). Site-directed mutagenesis in the β chain and Ii cytoplasmic domains will shed some light on the mechanism by which the complex egress the ER. Finally, it was recently shown that Ii associates with CD1d and regulates its trafficking to endosomal compartments. It will be interesting to test the ability of this molecule to egress the ER when bound to the p35 isoform.

2.7 ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. Eric O. Long, Dr. William W. Kwok and Dr. Peter Cresswell for providing cDNAs, antibodies and hybridomas. We thank Dr. Robert Nabi for the use of the confocal microscopy facility. We thank Nathalie Simard for helping in the construction of the Iip35 LI/ML cDNA. H.K. and A.B. are supported by studentships from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR). R.P.S holds a scientific award from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). J.T. is the recipient of a CIHR scholarship. This work was supported by grants from Boehringer Ingelheim Canada to J.T. and Valorisation Recherche Québec (VRQ) to R.P.S. and J.T.

2.8 ABBREVIATIONS

The abbreviations used are: Ii, Invariant chain; MHC, major histocompatibility complex; ER, endoplasmic reticulum; PCR, polymerase chain reaction; CLIP, class-II associated Ii peptide; ERM, endoplasmic reticulum retention motif; mAb, monoclonal antibody; FCS, fetal calf serum.

2.9 REFERENCES

- 1 Cresswell, P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 12:259-293.
- 2 Marks, M. S., Blum, J. S., and Cresswell, P. 1990. Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J.Cell Biol.* 111:839-855.
- 3 Roche, P. A., Marks, M. S., and Cresswell, P. 1991. Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein. *Nature* 354:392-394.
- 4 Lamb, C. A. and Cresswell, P. 1992. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J.Immunol.* 148:3478-3482.
- 5 Roche, P. A. and Cresswell, P. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345:615-618.
- 6 Romagnoli, P. and Germain, R. N. 1994. The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J.Exp.Med.* 180:1107-1113.
- 7 Stumptner, P. and Benaroch, P. 1997. Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *EMBO J.* 16:5807-5818.
- 8 Busch, R., Cloutier, I., Sekaly, R.-P., and Hammerling, G. J. 1996. Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 15:418-428.
- 9 Pieters, J., Bakke, O., and Dobberstein, B. 1993. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J.Cell.Sci.* 106:831-846.
- 10 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. *J.Cell Biol.* 126:317-330.
- 11 Letourneur, F. and Klausner, R. D. 1992. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 69:1143-1157.
 - 12 Johnson, K. F. and Kornfeld, S. 1992. A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function. *J.Biol.Chem.* 267:17110-17115.
 - 13 Bakke, O. and Dobberstein, B. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63:707-716.
 - 14 Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S. L., Quaranta, V., and Peterson, P. A. 1990. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348:600-605.
 - 15 Anderson, M. S., Swier, K., Arneson, L., and Miller, J. 1993. Enhanced antigen presentation in the absence of the invariant chain endosomal localization signal. *J.Exp.Med.* 178:1959-1969.
 - 16 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. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:8581-8585.
 - 17 Nijenhuis, M., Calafat, J., Kuijpers, K. C., Janssen, H., de Haas, M., Nordeng, T. W., Bakke, O., and Neefjes, J. J. 1994. Targeting major histocompatibility complex class II molecules to the cell surface by invariant chain allows antigen presentation upon recycling. *Eur.J.Immunol.* 24:873-883.
 - 18 Ericson, M. L., Sundstrom, M., Sansom, D. M., and Charron, D. J. 1994. Mutually exclusive binding of peptide and invariant chain to major histocompatibility complex class II antigens. *J.Biol.Chem.* 269:26531-26538.
 - 19 Jensen, P. E., Weber, D. A., Thayer, W. P., Westerman, L. E., and Dao, C. T. 1999. Peptide exchange in MHC molecules. *Immunol.Rev.* 172:229-238.

- 20 Thery, C., Brachet, V., Regnault, A., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Bonnerot, C., and Amigorena, S. 1998. MHC class II transport from lysosomal compartments to the cell surface is determined by stable peptide binding, but not by the cytosolic domains of the a. *J.Immunol.* 161:2106-2113.
- 21 Denzin, L. K., Robbins, N. F., Carboy-Newcomb, C., and Cresswell, P. 1994. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1:595-606.
- 22 Sloan, V. S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., and Zaller, D. M. 1995. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA- DR. *Nature* 375:802-806.
- 23 Weber, D. A., Evavold, B. D., and Jensen, P. E. 1996. Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* 274:618-620.
- 24 Sung, E. and Jones, P. P. 1981. The invariant chain of murine Ia antigens: its glycosylation, abundance and subcellular localization. *Mol.Immunol.* 18:899-913.
- 25 Machamer, C. E. and Cresswell, P. 1982. Biosynthesis and glycosylation of the invariant chain associated with HLA-DR antigens. *J.Immunol.* 129:2564-2569.
- 26 Swiedler, S. J., Hart, G. W., and Freed, J. H. 1983. Characterization of the oligosaccharides from the invariant chain associated with murine Ia antigens. *J.Immunol.* 131:352-358.
- 27 Arunachalam, B. and Cresswell, P. 1995. Molecular requirements for the interaction of class II major histocompatibility complex molecules and invariant chain with calnexin. *J.Biol.Chem.* 270:2784-2790.
- 28 Schroder, K., Martoglio, B., Hofmann, M., Holscher, C., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T. A., and Dobberstein, B. 1999. Control of glycosylation of MHC class II-associated invariant chain by translocon-associated RAMP4. *EMBO J.* 18:4804-4815.
- 29 Strubin, M., Long, E. O., and Mach, B. 1986. Two forms of the Ia antigen-associated invariant chain result from alternative initiations at two in-phase AUGs. *Cell* 47:619-625.

- 30 Strubin, M., Berte, C., and Mach, B. 1986. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* 5:3485-3488.
- 31 O'Sullivan, D. M., Noonan, D., and Quaranta, V. 1987. Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternative splicing and alternate initiation of transcription/translation. *J.Exp.Med.* 166:444-450.
- 32 Bevec, T., Stoka, V., Pungercic, G., Dolenc, I., and Turk, V. 1996. Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *J.Exp.Med.* 183:1331-1338.
- 33 Schutze, M.-P., Peterson, P. A., and Jackson, M. R. 1994. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 13:1696-1705.
- 34 O'Kelly, I., Butler, M. H., Zilberberg, N., and Goldstein, S. A. 2002. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111:577-588.
- 35 Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. 1999. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22:537-548.
- 36 Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. 2000. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27:97-106.
- 37 Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y., and De Waard, M. 2000. The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25:177-190.
- 38 Standley, S., Roche, K. W., McCallum, J., Sans, N., and Wenthold, R. J. 2000. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28:887-898.
- 39 Anderson, H. A. and Roche, P. A. 1998. Phosphorylation regulates the delivery of MHC class II invariant chain complexes to antigen processing compartments. *J.Immunol.* 160:4850-4858.
- 40 Kuwana, T., Peterson, P. A., and Karlsson, L. 1998. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.* 95:1056-1061.

- 41 Newcomb, J. R. and Cresswell, P. 1993. Structural analysis of proteolytic products of MHC class II-invariant chain complexes generated in vivo. *J.Immunol.* 151:4153-4163.
- 42 Teyton, L., O'Sullivan, D., Dickson, P. W., Lotteau, V., Sette, A., Fink, P., and Peterson, P. A. 1990. Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 348:39-44.
- 43 Sekaly, R.-P., Tonnelle, C., Strubin, M., Mach, B., and Long, E. O. 1986. Cell surface expression of class II histocompatibility antigens occurs in the absence of the invariant chain. *J.Exp.Med.* 164:1490-1504.
- 44 Tonnelle, C., DeMars, R., and Long, E. O. 1985. DO β : a new β chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J.* 4:2839-2847.
- 45 Long, E. O., Rosen-Bronson, S., Karp, D. R., Malnati, M., Sekaly, R.-P., and Jaraquemada, D. 1991. Efficient cDNA expression vectors for stable and transient expression of HLA-DR in transfected fibroblast and lymphoid cells. *Hum.Immunol.* 31:229-235.
- 46 Sugden, B., Marsh, K., and Yates, J. 1985. A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus. *Mol.Cell Biol.* 5:410-413.
- 47 Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59.
- 48 Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J. I., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K. I., Yoshida, M., and Arai, N. 1988. SRa promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol.Cell.Biol.* 8:466-472.
- 49 Robadey, C., Ammerlaan, W., Muller, C., Cloutier, I., Sékaly, R. P., Haefliger, J. A., and Demotz, S. 1997. The processing routes determined by negatively charged residues in DR1-restricted T cell determinants. *J.Immunol.* 159:3238-3246.
- 50 Brunet, A., Samaan, A., Deshaies, F., Kindt, T. J., and Thibodeau, J. 2000. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta. *J.Biol.Chem.* 275:37062-37071.

- 51 Panina-Bordignon, P., Fu, X., Lanzavecchia, A., and Karr, R. W. 1992. Identification of HLA-DR α chain residues critical for binding of the toxic shock syndrome toxin superantigen. *J.Exp.Med.* 176:1779-1784.
- 52 Radka, S. F., Machamer, C. E., and Cresswell, P. 1984. Analysis of monoclonal antibodies reactive with human class II beta chains by two-dimensional electrophoresis and western blotting. *Hum.Immunol.* 10:177-188.
- 53 Watanabe, M., Suzuki, T., Taniguchi, M., and Shinohara, N. 1983. Monoclonal anti-Ia murine alloantibodies crossreactive with the Ia-homologues of other mammalian species including humans. *Transplantation* 36:712-718.
- 54 Roche, P. A., Marks, M. S., and Cresswell, P. 1991. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354:392-394.
- 55 Landolt-Marticorena, C., Williams, K. A., Deber, C. M., and Reithmeier, R. A. 1993. Non-random distribution of amino acids in the transmembrane segments of human type I single span membrane proteins. *J.Mol.Biol.* 229:602-608.
- 56 Wallin, E. and von Heijne, G. 1998. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7:1029-1038.
- 57 Persson, B. and Argos, P. 1994. Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments. *J.Mol.Biol.* 237:182-192.
- 58 Warmerdam, P. A., Long, E. O., and Roche, P. A. 1996. Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J.Cell Biol.* 133:281-291.
- 59 Machamer, C. E. and Cresswell, P. 1984. Monensin prevents terminal glycosylation of the N- and O-linked oligosaccharides of the HLA-DR-associated invariant chain and inhibits its dissociation from the alpha-beta chain complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81:1287-1291.
- 60 Schaiff, W. T., Hruska, K. A., Bono, C., Shuman, S., and Schwartz, B. D. 1991. Invariant chain influences post-translational processing of HLA- DR molecules. *J.Immunol.* 147:603-608.

- 61 Lee, K. H., Wucherpennig, K. W., and Wiley, D. C. 2001. Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. *Nat.Immunol.* 2:501-507.
- 62 Brown, J. H., Jardetzky, T., Saper, M. A., Samraoui, B., Bjorkman, P. J., and Wiley, D. C. 1988. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 332:845-850.
- 63 Marsh, S. G. E., Parham, P., and Barber, L. D. 2000. In *The HLA FactsBook*, Academic Press, London.
- 64 Zhong, G., Romagnoli, P., and Germain, R. N. 1997. Related leucine-based cytoplasmic targeting signals in invariant chain and major histocompatibility complex class II molecules control endocytic presentation of distinct determinants in a single protein. *J.Exp.Med.* 185:429-438.
- 65 Nordeng, T. W. and Bakke, O. 1994. The bio-logical role of invariant chain (Ii) in MHC class II antigen presentation. *Immunol.Lett.* 43:47-55.
- 66 Stumptner-Cuvelette, P. and Benaroch, P. 2002. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochim.Biophys.Acta* 1542:1-13.
- 67 Lamb, C. A., Yewdell, J. W., Bennink, J. R., and Cresswell, P. 1991. Invariant chain targets HLA class II molecules to acidic endosomes containing internalized influenza virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:5998-6002.
- 68 Anderson, H. A., Bergstralh, D. T., Kawamura, T., Blauvelt, A., and Roche, P. A. 1999. Phosphorylation of the invariant chain by protein kinase C regulates MHC class II trafficking to antigen-processing compartments. *J.Immunol.* 163:5435-5443.
- 69 Lagaudriere-Gesbert, C., Newmyer, S. L., Gregers, T. F., Bakke, O., and Ploegh, H. L. 2002. Uncoating ATPase Hsc70 is recruited by invariant chain and controls the size of endocytic compartments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:1515-1520.
- 70 Stang, E. and Bakke, O. 1997. MHC class II associated invariant chain induced enlarged endosomal structures. A morphological study. *Exptl.Cell Res.* 235:79-92.
- 71 Gedde-Dahl, M., Freisewinkel, I., Staschewski, M., Schenck, K., Koch, N., and Bakke, O. 1997. Exon 6 is essential for invariant chain

- trimerization and induction of large endosomal structures. *J.Biol.Chem.* 272:8281-8287.
- 72 Gregers, T. F., Nordeng, T. W., Birkeland, H. C., Sandlie, I., and Bakke, O. 2003. The cytoplasmic tail of invariant chain modulates antigen processing and presentation. *Eur.J Immunol* 33:277-286.
- 73 Nordeng, T. W., Gregers, T. F., Kongsvik, T. L., Meresse, S., Gorvel, J. P., Jourdan, F., Motta, A., and Bakke, O. 2002. The cytoplasmic tail of invariant chain regulates endosome fusion and morphology. *Mol.Biol.Cell* 13:1846-1856.
- 74 Yan, G., Shi, L., Penfornis, A., and Faustman, D. L. 2003. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J.Immunol.* 170:620-627.
- 75 Spiro, R. C., Sairenji, T., Townsend, P., Reisert, P. S., and Humphreys, R. E. 1984. The Ii nature of p35 on hairy leukemic cells. *Semin.Oncol.* 11:427-432.
- 76 Spiro, R. C., Sairenji, T., and Humphreys, R. E. 1984. Identification of hairy cell leukemia subset defining p35 as the human homologue of Ii. *Leuk.Res.* 8:55-62.
- 77 Elliott, W. L., Lu, S., Nguyen, Q., Reisert, P. S., Sairenji, T., Sorli, C. H., Stille, C. J., Thomas, L. J., and Humphreys, R. E. 1987. Hyperexpressed hairy leukemic cell Ii might bind to the antigen-presenting site of class II MHC molecules. *Leukemia* 1:395-396.
- 78 Veenstra, H., Jacobs, P., and Dowdle, E. B. 1996. Abnormal association between invariant chain and HLA class II alpha and beta chains in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Immunol.* 171:68-73.
- 79 Veenstra, H., Jacobs, P., and Dowdle, E. B. 1993. Processing of HLA-class II invariant chain and expression of the p35 form is different in malignant and transformed cells. *Blood* 82:2494-2500.
- 80 Teasdale, R. D. and Jackson, M. R. 1996. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 12:27-54.
- 81 Scott, D. B., Blanpied, T. A., Swanson, G. T., Zhang, C., and Ehlers, M. D. 2001. An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J.Neurosci.* 21:3063-3072.

- 82 Cosson, P., Lefkir, Y., Demolliere, C., and Letourneur, F. 1998. New COP1-binding motifs involved in ER retrieval. *EMBO J.* 17:6863-6870.
- 83 Cosson, P. and Letourneur, F. 1994. Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 263:1629-1631.
- 84 Letourneur, F., Hennecke, S., Demolliere, C., and Cosson, P. 1995. Steric masking of a dilysine endoplasmic reticulum retention motif during assembly of the human high affinity receptor for immunoglobulin E. *J.Cell Biol.* 129:971-978.
- 85 Motta, A., Amodeo, P., Fucile, P., Castiglione Morelli, M., Bremnes, B., and Bakke, O. 1997. A new triple-stranded α -helical bundel in solution: the assembling of the cytosolic tail of MHC associated invariant chain. *Structure* 5:1453-1464.

2.10 FIGURES

Figure 2.1. Antigen presentation-related molecules used in this study.

(A) Schematic representation of the DR α and DR β chain combinations expressed in HeLa cells. (B) HeLa cells stably transfected with the wild-type or truncated DR molecules were sorted and analyzed by flow cytometry using L243. (C) N-terminal amino acid sequence and schematic representation of Iip35 and Iip33. The glycosylation sites are depicted next to the CLIP region. The two methionine residues corresponding to the two initiation sites are boxed. The arginine residues forming the ERM are underlined; the leucine-based targeting signals and the phosphorylated serines 6 and 8 are indicated.

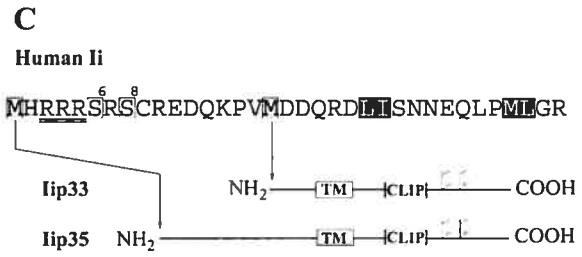
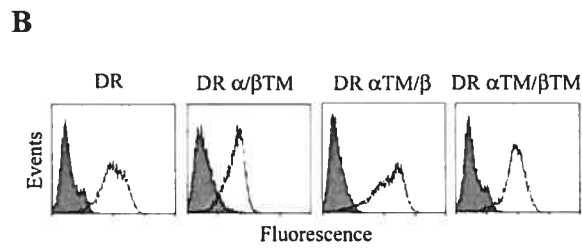
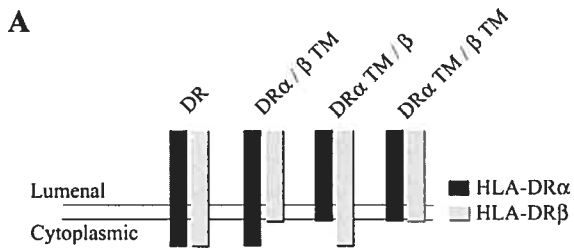


Figure 2.2. Iip35 prevents the surface expression of class II molecules devoid of their cytoplasmic tails.

(A) Cells expressing homogenous levels of class II molecules were stably transfected with either Iip33, Iip35 or Iip35 (S6K,S8H) cDNAs cloned in pREP4. Expression of surface class II molecules and total Ii was monitored by flow cytometry. Cells were stained at the surface with the conformational antibody L243 then permeabilized with saponin and stained for Ii using BU45. Similar results were obtained in independent transfections using Iip35 cloned in SR α puro (data not shown). (B) HeLa DR α TM/ β TM transfected with Iip35 were stained as in panel A using either L243 (upper panel) or ISCR3 (lower panel). (C) HeLa DR α TM/ β TM cells expressing Iip35 were stained with ISCR3 (bold lines) for cell surface (top histogram) or total (bottom histogram) class II molecules after permeabilization. The ISCR3 antibody was used for this experiment instead of L243 because the latter mAb would not recognize immature class II molecules bound to Ii in the ER (60). Control cells were stained only with the goat anti-mouse secondary antibody coupled to Alexa Fluor®488 (thin line). (D) Cell surface staining using the CerCLIP.1 antibody (bold line). Control cells were stained only with the secondary antibody (thin line).

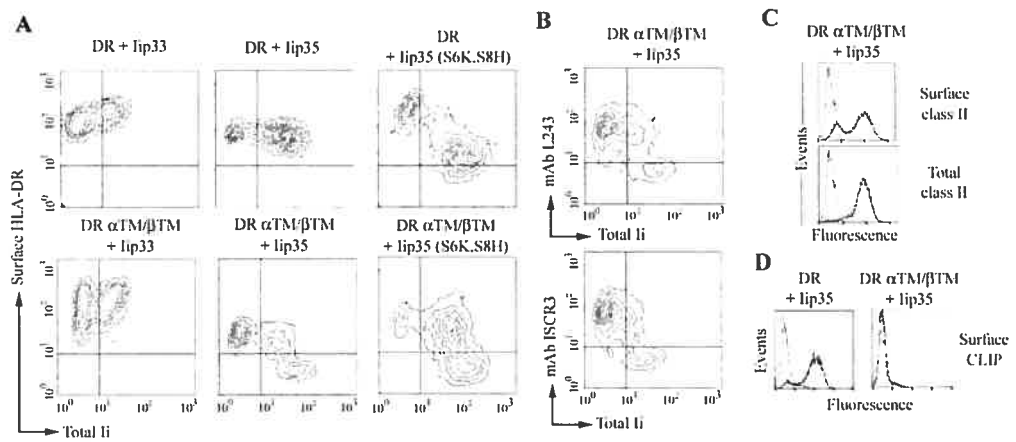


Figure 2.3. Intracellular localization of class II molecules in the presence of Iip35.

Cells were grown on coverslips for 24-48h before permeabilization and simultaneous staining for class II (ISCR3) (panel a-d), invariant chain (Pin.1) (panel c-h) and calnexin (panel i-l). The secondary antibody used were goat anti-mouse IgG2b coupled to phycoerythrin, goat anti-mouse IgG1 coupled to Alexa Fluor®488 and goat anti-rabbit coupled to Alexa Fluor®633, respectively. Cells were analyzed by confocal microscopy. Shown in panels m,n,o and p are overlays of class II, invariant chain and calnexin staining for the representative cells. White boxes indicate the areas shown at higher magnification in panels m' to p'. Colocalization of class II and invariant chain is seen in *yellow* whereas colocalization of class II, invariant chain and calnexin is seen in *white*. The *arrows* indicate vesicles containing class II and Ii but devoid of calnexin.

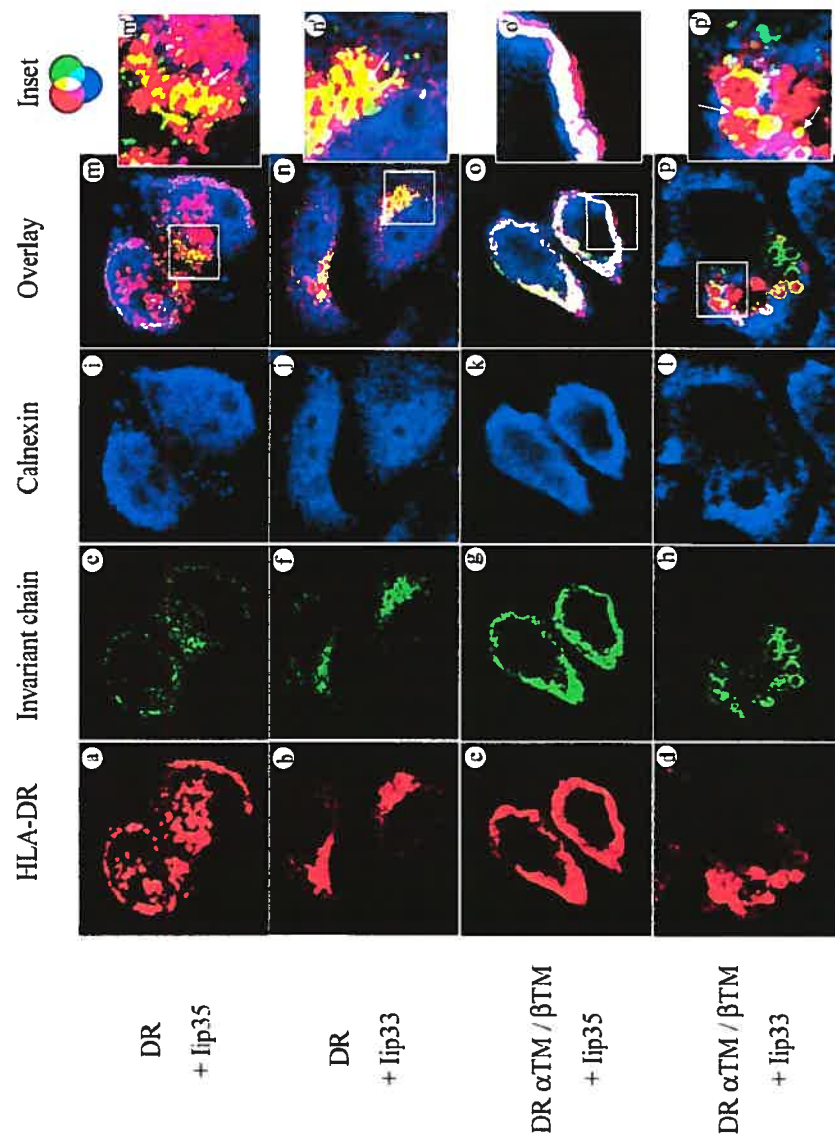
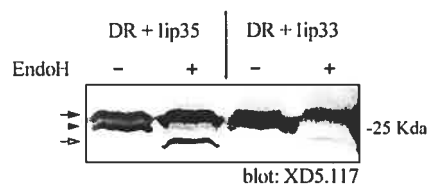
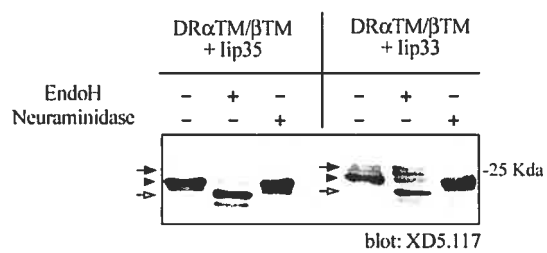
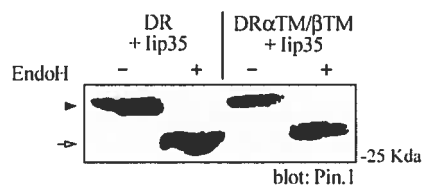


Figure 2.4. Maturation of class II molecules and Ii in HeLa cells.

Cells expressing Ii and surface class II molecules were sorted positively using CerCLIP.1 in order to obtain a homogenous expression of Ii. Cells expressing DR α TM/ β TM together with Iip35 were sorted negatively using L243. (A) HeLa cells were lysed in 1% Triton X-100 and either mock digested or digested with Endo H before SDS-PAGE and western blot analysis. Proteins were immunoblotted with a DR β -specific mAb (XD5.117). (B) Cells were lysed, treated with Endo H or with Neuraminidase and analyzed by Western blotting as above. (C) Cells were lysed, treated with Endo H and analyzed by Western blotting using the Ii-specific mAb Pin.1 Black arrows depict proteins containing Endo H-resistant sialic acid. A filled arrowhead indicates molecules that have acquired high mannose or complex type oligosaccharides and an open arrow indicates Endo H-sensitive species.

A**B****C**

- Sialylated forms
- ▷ High mannose or Complex forms
- ↪ N-Linked glycans cleaved

Figure 2.5. Iip35 LI/ML is not expressed at the cell surface in the presence of DR α TM/ β TM.

(A) HeLa cells expressing homogenous levels of class II molecules were stably transfected with the SR α puro Iip35 LI/ML cDNA. Expression of surface class II molecules and Ii was monitored as in figure 2.2. (B) HeLa cells were stably transfected with the indicated molecules and analyzed by flow cytometry using BU45 either before (upper panel) or after permeabilization with saponin (lower panel). (C) Cells were sorted positively (DR1) using CerClip.1 or negatively (DR α TM/ β TM) using L243 to obtain a homogenous expression of Ii (data not shown). After lysis in 1% Triton X-100, the DR β chain was analyzed by Western blotting as in figure 2.4 using mAb XD5.117 or the Iip35-specific rabbit antiserum (R.Ip35N) which recognizes the LI/ML Ii mutant. The R.Ip35N antibody was used for this experiment instead of Pin.1 because the latter mAb would not recognize the LI/ML Ii mutant. (D) HeLa cells were stably transfected with pREP4 Iip33 or a mock pREP4 vector. Cell lysates were treated or not with EndoH and analyzed by Western blotting using Pin.1. (E) 293T cells were stably transfected with the indicated molecules and analyzed by flow cytometry using BU45 either before (upper panel) or after permeabilization with saponin (lower panel).

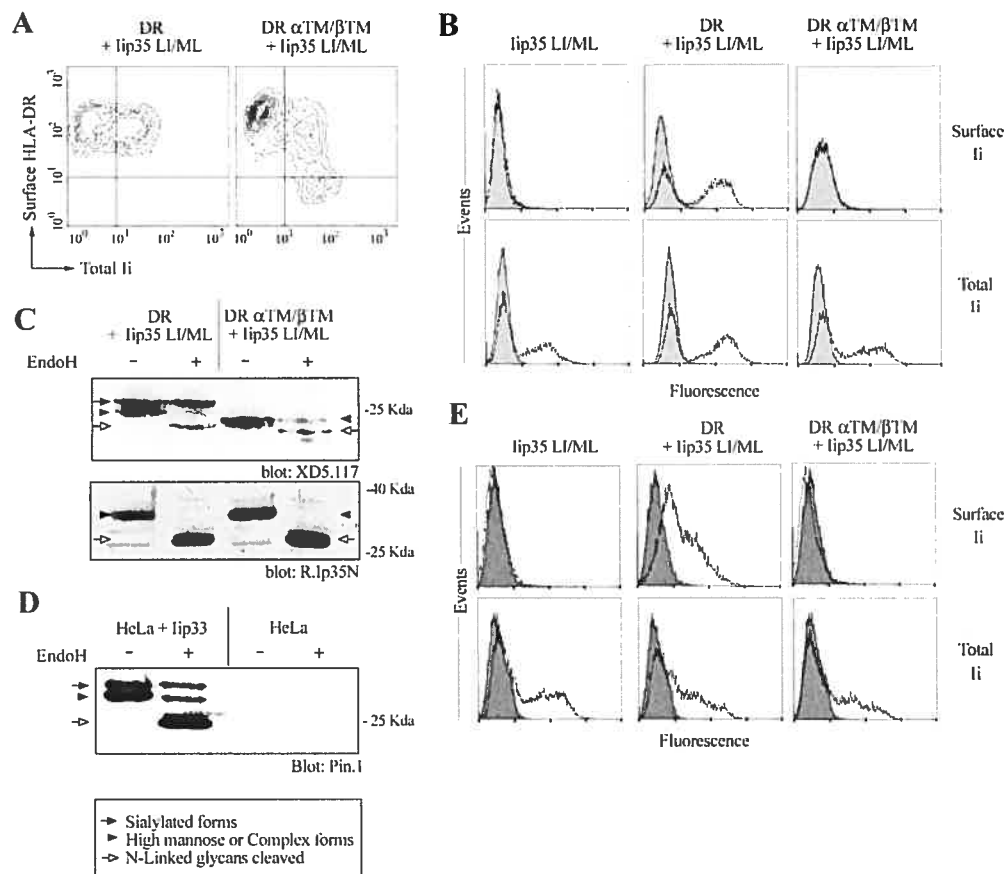


Figure 2.6. The DR β chain cytoplasmic tail is required to overcome Iip35 ER retention motif.

(A) HeLa cells expressing truncated class II molecules were stably transfected with pREP4 Iip35 and double stained as in figure 2.2A. Independent transfections using SR α puro Iip35 gave similar results (data not shown). (B) Unsorted populations shown in figure 2.6A were used. The invariant chain was immunoprecipitated from cell lysates using BU45. The samples were treated or not with EndoH and analyzed by Western blotting using the HLA-DR β -specific mAb (XD5.117). Black arrows depict proteins containing Endo H-resistant sialic acid. A filled arrowhead indicates molecules that have acquired high mannose or complex type oligosaccharides and an open arrow indicates Endo H-sensitive species. (C) Cells were grown on coverslips for 24-48h before permeabilization and simultaneous staining for class II (ISCR3) (panel a-d), invariant chain (Pin.1) (panel e-h) and calnexin (panel i-l). The secondary antibody used were as in figure 2.3. Cells were analyzed by confocal microscopy. Shown in panels m,n,o and p are overlays of class II, invariant chain and calnexin staining for the representative cells. White boxes indicates the areas shown at higher magnification in panels m'-p'. Colocalization of class II and Ii is seen in *yellow* whereas colocalization of class II, invariant chain and calnexin is seen in *white*. The *arrows* point to vesicles containing class II and Ii but devoid of calnexin.

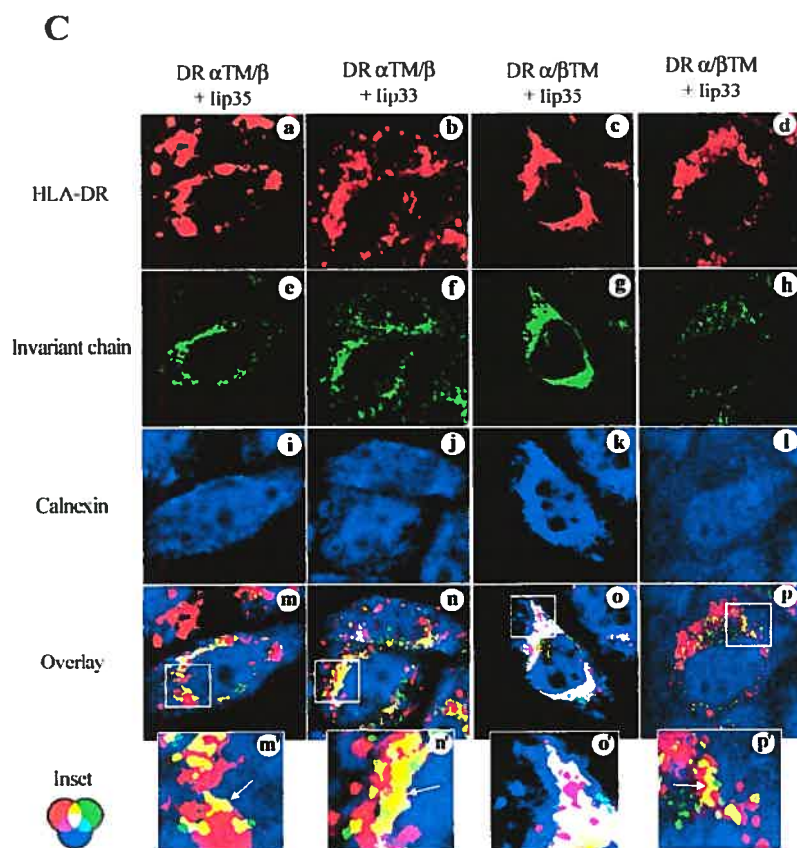
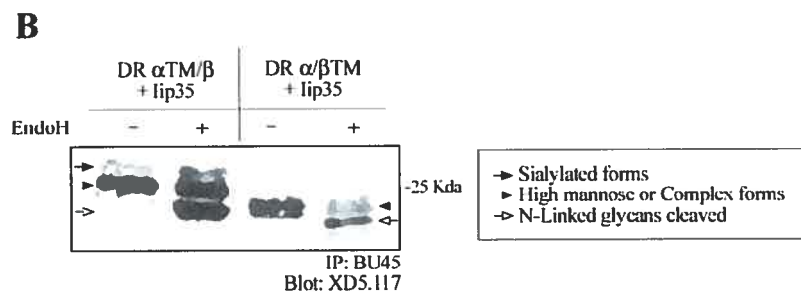
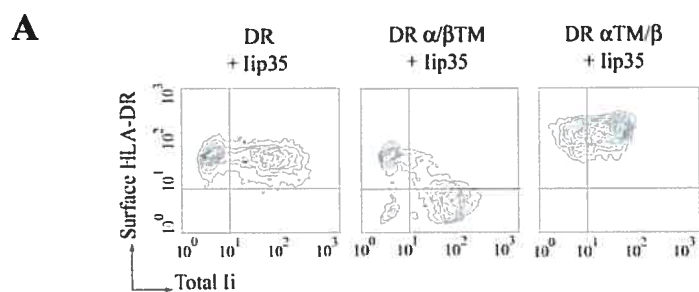


Figure 2.7. Iip35 LI/ML is not expressed at the cell surface in the presence of DR α / β TM.

HeLa cells expressing class II molecules were stably transfected with pREP4 Iip35 LI/ML. HEK 293T cells were transiently co-transfected with the indicated DR molecules and with pREP4 Iip35 LI/ML and tested after 48h. Cells were analyzed by flow cytometry using BU45 either before (surface Ii) or after permeabilization with saponin (total Ii). The surface / total Ii ratios are shown. The XD5.117 MFVs for DR, DR α TM/ β , DR α / β TM expression were 411, 331, 109 in HeLa cells and 298, 229, 290 in HEK 293T cells, respectively. The MFV for the secondary antibody alone was 4 (data not shown).

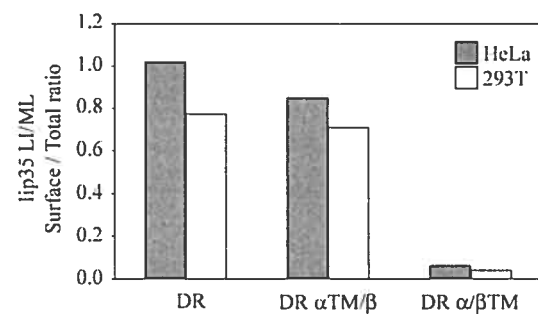


Figure 2.8. HLA-DP and -DQ mask the Iip35 R-X-R motif.

(A) HEK 293T cells were transfected with either DR, DP, DQ or DR α/β TM together with pREP4 Iip35 LI/ML and analyzed after 48h by flow cytometry using BU45 either before (surface Ii) or after permeabilization with saponin (total Ii). The surface / total Ii ratios are shown. The XD5.117 MFVs for DR, DP, DQ and DR α/β TM expression were 298, 257, 88 and 229, respectively. The MFV for mock-transfected cells was 5 (data not shown). (B) HEK 293T cells transfected with either a mock vector or the DR, DQ and DR α/β TM cDNAs together with pBUD Iip35 were permeabilized with saponin after 72h and stained for the invariant chain using Pin.1. Cells were centrifuged onto microscope slides and analyzed by confocal microscopy. (C) These transfected HEK 293T cells were also analyzed by flow cytometry for surface class II (XD5.117) and CLIP (CerCLIP.1) expression. Cells were also permeabilized with saponin and stained with BU45 to monitor total invariant chain content. Filled histograms represent the background obtained using the secondary antibody alone.

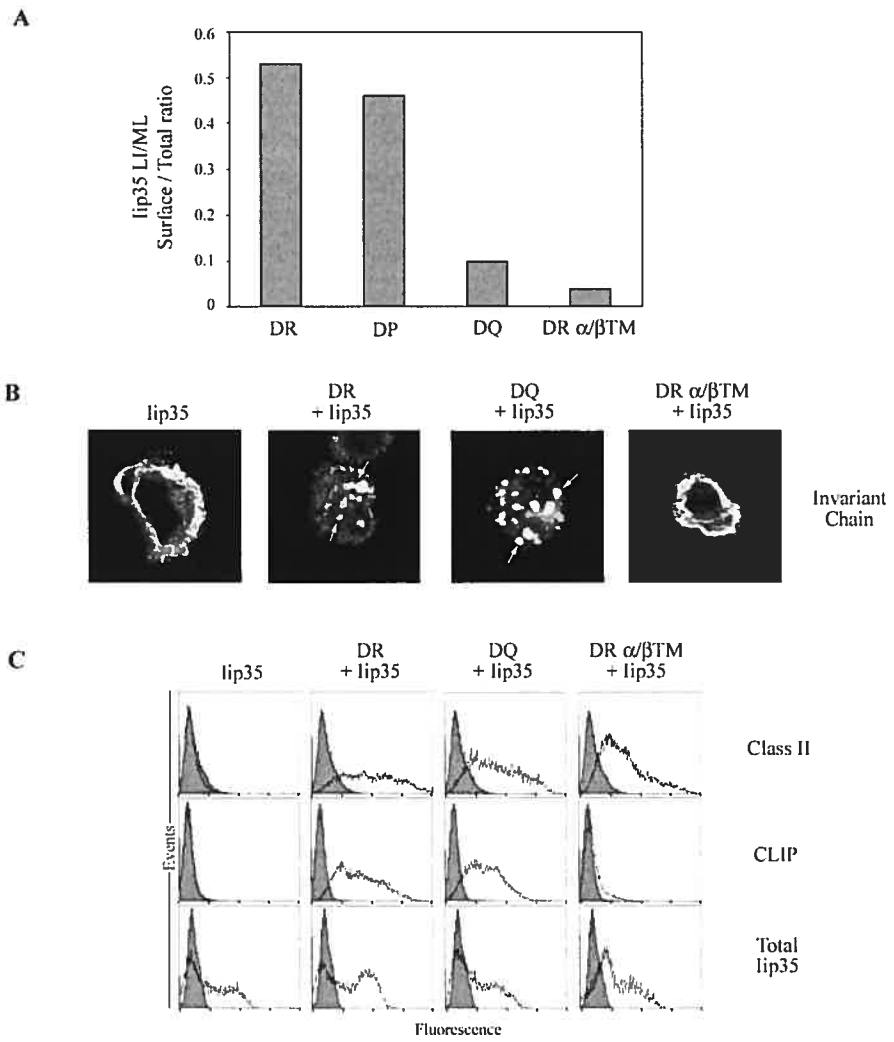
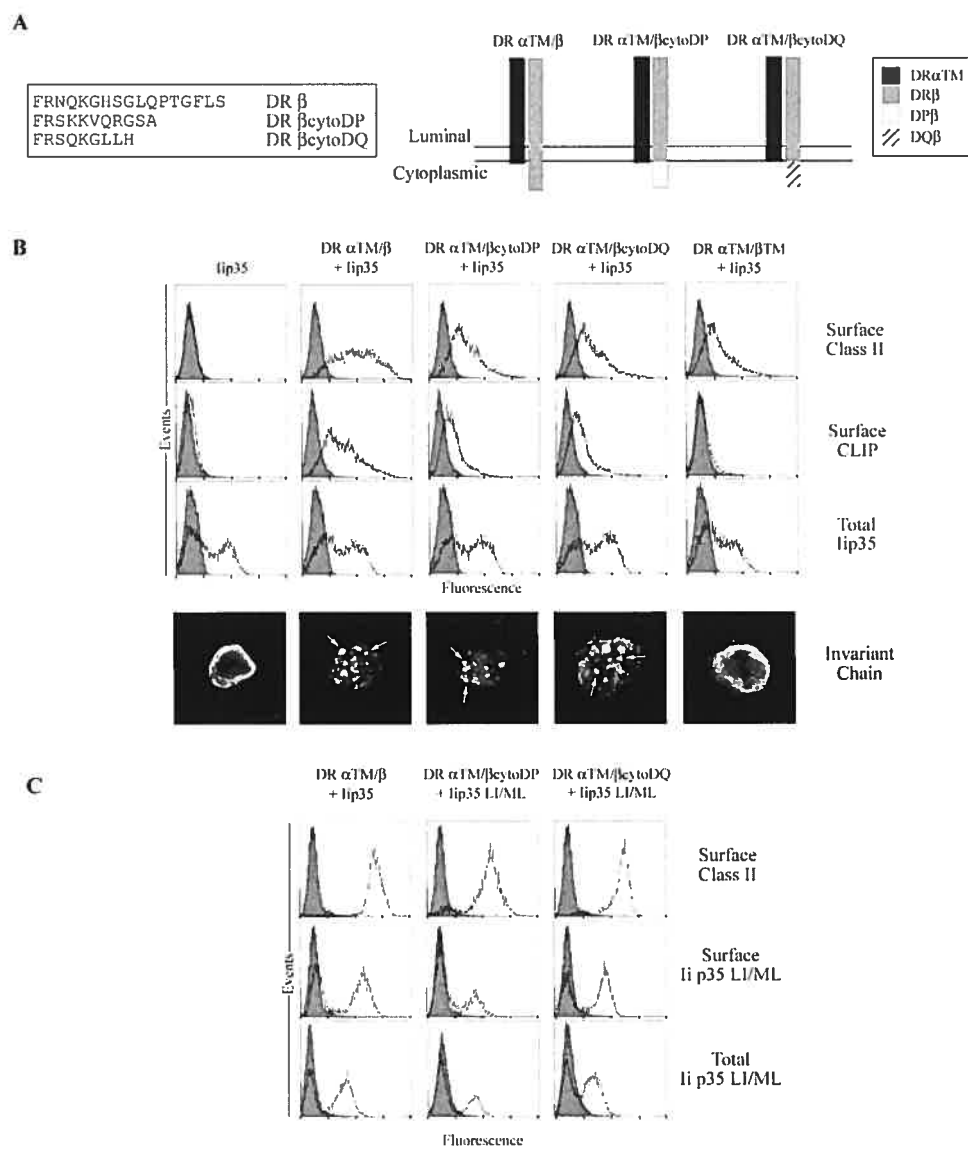


Figure 2.9. The DP β and DQ β chain cytoplasmic tails are sufficient to overcome Iip35 ER retention motif.

(A) Schematic representation of the chimeric class II α and β chain combinations expressed in HeLa cells. The C-terminal amino acid sequence of the recombinant DR β chains is shown. (B) HEK 293T cells transfected with pBUD Iip35 and either a mock vector or a combination of chimeric chains, as indicated. Cells were analyzed by flow cytometry for either surface class II (XD5.117) or CLIP (CerCLIP.1). A fraction of the transfected cells was also permeabilized with saponin and stained with BU45. Total invariant chain expression was monitored by flow cytometry and the sub-cellular localization of Ii was analyzed by confocal microscopy. (C) HeLa cells stably expressing combinations of chimeric DR chains were transfected with pREP4 Iip35 LI/ML and analyzed by flow cytometry for the surface expression of class II molecules (XD5.117) or Ii (BU45). Cells were also permeabilized with saponin and stained for Ii using BU45 (total Iip35 LI/ML). Filled histograms represent the background obtained using the secondary antibody alone.



CHAPITRE 3 - ARTICLE

**Sequence-Dependent and –Independent Masking by MHC Class II β
Chain Cytoplasmic Tail is Required to Overcome the Invariant Chain p35-
Encoded Endoplasmic Reticulum Retention Signal**

Hayssam Khalil*, Alexandre Brunet* and Jacques Thibodeau*[¶]

* Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de
Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de
Montréal, Canada.

Running title: Masking of Iip35 di-arginine motif

Keywords: HLA, Iip35, R-X-R, di-arginine, antigen presentation

[¶] **Corresponding author:** Jacques Thibodeau, Laboratoire d'Immunologie
Moléculaire,
Département de Microbiologie et Immunologie,
Université de Montréal, CP 6128,
Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec
Canada, H3C 3J7
Tel: (514) 343-6279; **Fax:** (514) 343-5701
e-mail: Jacques.Thibodeau@umontreal.ca

3.1 SUMMARY

The p35 isoform of the human invariant chain contains an R-X-R endoplasmic reticulum retention signal, which becomes inactivated upon assembly with MHC class II molecules. We have previously shown that the cytoplasmic tail of MHC class II β -chain is critical for an efficient egress of class II/Iip35 complexes. To shed some light on the molecular determinants required for this masking, we performed site-directed mutagenesis in the β chain and Ii cytoplasmic domains. Substitution of the β chain cytoplasmic domain with the one of the non-classical MHC class II molecules HLA-DM or HLA-DO resulted in efficient transport of Iip35 out of the ER, suggesting that steric hindrance may account for the masking of the retention signal. This was further confirmed by performing an alanine scan of the cytoplasmic tail of HLA-DR β . We then assessed the minimal requirement in terms of length for the β chain cytoplasmic tail. Surprisingly, in order to overcome Iip35 ERM, only two amino acids (F231 and R232) are required following Y230 present at the interface between the transmembrane and cytoplasmic domain of DR β . When these residues are substituted to alanine, the ability to overcome the retention motif of Iip35 is greatly reduced but not abrogated. In order to evaluate the importance of Iip35 cytoplasmic domain structure, we mutated the prolines at position 31 (P31A) or 37 and 40 (P37A,P40A). These mutations did not affect Iip35 ERM, and MHC class II molecules retained the ability to mask this retention signal when the β chain cytoplasmic tail was present. Thus a

cytoplasmic tail with a length of at least two amino acids is required to overcome the Iip35 ERM, and this tail should contain a positive charge. These results suggest that the cytoplasmic region next to the transmembrane of HLA-DR is involved in the structure of the invariant chain cytoplasmic tail.

3.2 RÉSUMÉ

Chez l'humain, l'isoforme p35 de la chaîne invariante possède un signal de type di-arginine (R-X-R) responsable de la rétention au niveau du réticulum endoplasmique. Ce signal est inactivé lors de l'association du trimère de chaîne invariante avec trois molécules du CMH de class II. Nous avons démontré préalablement que la queue cytoplasmique de la chaîne β du CMH de class II joue un rôle critique dans la sortie du complexe CMH class II/Iip35 du RE. Dans le but de caractériser plus précisément les déterminants moléculaires requis pour un masquage efficace, nous avons criblé par mutagenèse dirigée le domaine cytoplasmique de la chaîne β et de la chaîne invariante. Lorsque le domaine cytoplasmique de la chaîne β est remplacé par celui des molécules non classiques HLA-DM ou HLA-DO, le masquage du motif de rétention de Iip35 est maintenu, suggérant un mécanisme de masquage stérique. Cette hypothèse a ensuite été confirmée en effectuant un "alanine scan" de la queue cytoplasmique de HLA-DR β . Nous avons ensuite déterminé la longueur minimum requise au niveau du domaine cytoplasmique de la chaîne β . De façon surprenante, nous avons déterminé que seulement deux acides aminés (F231 et R232) sont requis à la suite de Y230 qui lui délimite l'interface entre le transmembrane et la queue cytoplasmique. Lorsque ces deux résidus ont été substitués pour des alanines, nous avons observé une diminution importante dans la capacité de masquage de motif de rétention de Iip35. Nous avons ensuite muté les prolines de Ii à la position 31 (P31A) ou 37 et 40 (P37A,P40A) dans le but d'évaluer l'importance de la structure tertiaire de la région

cytoplasmique lors du masquage par la queue cytoplasmique de DR β . Ces mutations n'affectent pas la rétention de Iip35 dans le RE ni le masquage par les molécules HLA-DR. Nos résultats suggèrent donc que le masquage de Iip35 requiert à la fois une queue cytoplasmique d'au moins deux acides aminés, mais également que l'un de ces deux acides aminés porte une charge positive. Ces résultats suggèrent que la région cytoplasmique de HLA-DR près de la portion transmembranaire est impliquée dans la structure de la queue cytoplasmique de la chaîne invariante.

3.3 INTRODUCTION

The major histocompatibility complex (MHC) class II molecules are expressed on antigen presenting cells of the immune system and display foreign antigenic peptides to T lymphocytes (1). During their assembly in the endoplasmic reticulum (ER), class II $\alpha\beta$ dimers associate with preformed trimers of the invariant chain (Ii) to form nonameric $(\alpha\beta Ii)_3$ oligomers (2-4). Ii folds in part through the peptide binding groove and promotes the folding of class II by preventing aggregation and premature binding of endogenously synthesized peptides (5-10). Targeting of the $(\alpha\beta Ii)_3$ complex to the endocytic pathway is mediated by two leucine-based motifs in the cytoplasmic tail of Ii (11,12). When these endosomal localization signals are obliterated, Ii is found mostly at the cell surface and has a much longer half-life (13-17). Within acidic compartments, the Ii luminal domain is progressively degraded facilitating dissociation of Ii from MHC class II molecule and peptide loading (18-20).

The human invariant chain gene produces two separate messenger RNAs that differ by an alternatively spliced exon. Furthermore, the alternative use of two in-phase start codons on each mRNA produce either the predominant forms p33 and p35 or p41 and p43 (21,22).

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) and Hairy cell leukemia (HCL), which account together for 25 to 30 percent of all cases of leukemia in western countries, express an unusually large amount of the Iip35 (23,24). High levels of Iip35 may alter presentation of endogenous tumor antigens preventing an

efficient host immune response. Also, very recently, it was described that B cells from diabetic patients expressed less Iip35 than those from discordant identical twins. Development of type-1 diabetes is positively associated with the expression of certain alleles of MHC class II molecules (25). More specifically, products of the HLA-DQ2 and -DQ8 specificities are thought to present pancreas-specific peptides that could, under still undefined mechanisms, trigger an auto-immune reaction. We feel that it is crucial to understand the sorting of Iip35 at the molecular and sub-cellular levels as it could impact on the peptide repertoire presented by class II molecules such as HLA-DQ. Moreover, the intracellular trafficking of class II molecules bound to Iip35 is presumed to differ from those bound to Iip33 as the former is not detected at the cell surface. Thus, Iip35 plays an important role in coordinating the assembly of newly synthesized Ii with class II molecules and in the transport of the complex to endosomal compartments.

Iip35 differs from p33 by an N-terminal cytoplasmic extension of 16 amino acids containing a strong di-arginine ER retention motif (ERM) (Fig. 3.1B) (26). This di-basic sequence is a short signal that plays a crucial role for the ER localization of many soluble proteins contained in the cisternal lumen and of transmembrane proteins, respectively (27-29). Such signals usually determine retrieval from post-ER compartments in the exocytic pathway by virtue of a COPI-mediated retrograde transport mechanism (30-35). As compared to their p35 counterparts, Ii p33 homotrimers, have a much shorter half-life, acquire Endo-H-resistant sugars in certain cell types and are found in

the endocytic pathway even in the absence of class II molecules (4,13,36). Accordingly, mixed trimers consisting of p33 and at least one p35 molecule accumulate in the ER (2,4). In normal B cells, the proportion of the Ii pool harbouring this ER retention signal has been estimated to 20%. The mechanism regulating the usage of these initiation codons has yet to be discovered but no internal ribosome entry site has been identified between the two ATG triplets. Iip35, therefore, seems to play an important role in coordinating the assembly and transport of newly synthesized Ii and class II molecules. It has been reported that a serine residue (S8) present exclusively in the p35 cytoplasmic tail is phosphorylated in B cell lines and transfected HeLa cells (37-39). Although the exact trafficking step requiring such phosphorylation is still a matter of debate, it is clearly a prerequisite for efficient sorting of p35-class II complexes to the endocytic pathway (37-39).

Recently, O'Kelly and co-workers suggested that the binding of 14-3-3 and β COP is mutually exclusive on Iip35 and KCNK3 receptor (40). The 14-3-3 family members are highly acidic dimeric cytoplasmic proteins that bind to phosphoserine motifs (26,41-44). These authors concluded that the 14-3-3 binding site constitutes a "release" motif allowing ER egress. However, this generalization cannot be applied to Iip35. Indeed, this study totally overlooked the essential role of class II molecules in the ER release of Iip35.

As a first step in understanding the mechanism of action of Iip35, we have recently shown that the cytoplasmic tail of the DR β chain is critical to

overcome the ER retention motif (45). In the present work, we have pushed this characterization further by analyzing the structural determinants in the tail that are involved in the masking of the R-X-R motif. Our results could have important implications for the other multimeric proteins dependent on proper association for ER egress.

3.4 EXPERIMENTAL PROCEDURES

3.4.1 cDNAs and mutagenesis

cDNAs encoding both the p33 and p35 isoforms of the human invariant chain (46), HLA-DR α (46) and HLA-DR β 0101 (DR β 008) (47) were obtained from Dr. Rafick Sékaly. A mutation was introduced in the Ii cDNA in order to eliminate the second start codon (Met17 to Ala) and translate exclusively the long p35 isoform (45). The cDNA coding for the truncated DR α and DR β chain (Fig. 3.1A) were described previously (45,48). The two leucine-based sorting signals of the p35 invariant chain were mutated to alanines and cloned into the pREP4 vector (pREP4 Iip35 LI/ML) (45). The cytoplasmic tail of HLA-DR β was replaced by that of either HLA-DM β or HLA-DO β as described previously (45). The alanine scan of HLA-DR β cytoplasmic tail was done by the PCR overlap extension method (49) and the sequence of the mutagenic oligonucleotides are available upon request. The cytoplasmic tail of HLA-DR β was replaced by segments of different length and composition by cloning overlapping oligonucleotides. To this end, an intermediate DR β molecule (DR β AAA.1) had to be constructed to facilitate cloning. This mutation creates an *Avr*II restriction site near the stop coding region. The overlapping oligonucleotides were cloned into *Sty*I and *Avr*II sites of pBS KS 3'DR β AAA.1 and the DNA sequence was confirmed by sequencing. The chimeric cDNA was cloned as a *Bam*HI fragment into the *Bam*HI site of pBUD-CE4. Mutations of Iip35 cytoplasmic tail prolines were done by the PCR

overlap extension method (49) and cloned into the pREP4 Iip35 LI/ML vector. The Iip35 Δ 17-44 mutant was obtained by PCR overlap deletion of Iip35 amino acid 17 to 44 and cloned into the pBUD-CE4 vector. The Iip35 Δ 1-34 (called Ii Δ 20) mutant was a kind gift from Dr. Odmund Bakke.

3.4.2 Cell lines and transfections

MHC class II negative HEK 293T cells were cultured in DMEM (Wisent, St.-Bruno, Quebec, Canada) containing 10% FBS (Wisent). For transient expression, cells were co-transfected by the calcium phosphate precipitation method using 2 μ g of each DNA (50). Cells were analyzed 2-3 days post-transfection.

3.4.3 Antibodies

BU45 (IgG1) is a mouse mAb specific for a C-terminal epitope of human Ii (The Binding Site, Birmingham, England). ISCR3, a kind gift from Dr. Robert Busch, recognizes the $\alpha\beta$ heterodimer through an epitope on the DR α chain (51). Pin.1 mAb (3) recognizes the N-terminal cytoplasmic domain of Iip33 and p35. Goat anti-mouse coupled to Alexa Fluor® was obtained from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR).

3.4.4 Flow cytometry and fluorescence microscopy

For surface staining of Ii, cells were first stained using BU45 followed by a goat anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor®488. Intracellular staining for class II molecules or Ii was done on saponin-permeabilized cells as previously described (45,50). Briefly, cells were washed, fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with saponin (50) and stained for Ii or class II molecules using BU45 or ISCR3, respectively, followed by a goat anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor®488. Cells were analyzed on a FACSCalibur® flow cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, Canada).

3.5 RESULTS

3.5.1 Chimeric class II molecules with irrelevant cytoplasmic tails mask Iip35 ERM

In our previous study (45) we have shown that masking of Iip35 di-basic retention signal can be accomplished by the β chain cytoplasmic tail of all three human MHC class II isotypes (HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ). In the present report, we investigated whether the cytoplasmic tail of HLA-DR encodes for a specific signal required to overcome the Iip35 ERM or can mask it by non-specific molecular hindrance. To gain insights into this phenomenon, we used transiently transfected HEK 293T cells that do not normally express Ii or class II molecules and have already been used to study the trafficking of

these molecules (45). We have previously generated a transient transfection method to rapidly assess the capacity of any class II molecule or mutant to mask the Iip35 ERM using a mutant molecule devoid of its two leucine-based sorting signals (45). This molecule, Iip35 LI/ML, was shown to be directed to the plasma membrane rather than the endocytic pathway. Thus, in our system, an efficient masking of Iip35 ERM should lead to the cell surface expression of Ii as detected using the mAb Bu45. First, as a control, DR or DR α TM/ β TM molecules were co-expressed with the mutant Iip35 LI/ML transiently in HEK 293T cells and analyzed by flow cytometry after 48 hours. As previously shown (45), we observed the surface expression of Iip35 LI/ML on cells transfected with DR but not on those expressing DR α TM/ β TM (Fig. 3.1b). We next used chimeric DR molecules in which the β chain cytoplasmic region was replaced by the one of DM or DO. These chains were expressed transiently in HEK 293T cells together with the truncated DR α chain (DR α TM/ β cytoDM and DR α TM/ β cytoDO) and Iip35 LI/ML (Fig. 3.1A). Positive cell-surface staining for Ii clearly suggested that both cytoplasmic tails could efficiently mask the Ii-encoded retention motif (Fig. 3.1B). Similar results were obtained for stably transfected HeLa cells as no evidence for class II ER retention was obtained (data not shown). Altogether, the poor conservation between DR, DP, DQ, DO and DM in the cytoplasmic tail suggests a steric hindrance mechanism of masking.

3.5.2 Alanine scan of DR β cytoplasmic tail reveals no critical motif

In order to confirm that no critical motif in the cytoplasmic tail of HLA-DR β is required to overcome Iip35 ERM, an alanine scan of this region was performed. DR molecules in which the β chain cytoplasmic region was mutated were co-expressed transiently in HEK 293T cells together with the truncated DR α chain and Iip35 LI/ML as shown in Figure 3.2. Based on the surface/total ratio of invariant chain expression, we can conclude that all mutants are able to overcome Iip35 ERM, confirming our previous hypothesis of steric hindrance.

3.5.3 Arginine 232 is critical for an efficient masking

Our alanine scan was based on the fact that all cytoplasmic tails tested include a conserved arginine at position +2 after the amino acid defining the start of the cytoplasmic tail. Thus, all chimeric molecules were made starting at this conserved ARG 232. In order to conclude to a steric hindrance mechanism, we felt it was important to assess the possible role of the membrane proximal residues. Based on our previous results, we already knew that tyrosine 230 is not sufficient to mask the ERM motif of Iip35 (45). The only residues that haven't been covered by the previous alanine scan were phenylalanine 231 and arginine 232. In order to assess the role of these residues, we inserted a stop codon after the R232 residue in HLA-DR β (β YFR) (Fig. 3.3). Surprisingly, this mutant β chain, with only two residues in the cytoplasmic region, was as

efficient as DR β wild-type in masking Iip35 ERM as indicated by the surface/total ratio of Iip35 LI/ML (Fig. 3.3). To investigate if this phenomenon is steric or motif-specific, we mutated both F231 and R232 to alanines (β YAA). The β YAA mutant showed a marked decrease in the level of surface/total invariant chain ratio when compared to the β YFR mutant. However, β YAA still allowed a small fraction of Iip35 LI/ML to be expressed at the cell surface when compared to DR β TM. Reducing the length of the β chain cytoplasmic tail further (β YF or β YA) completely abolished Iip35 LI/ML surface expression. This suggests that both the length of the tail and the presence of R232 are critical for an efficient masking.

3.5.4 Steric and motif-specific masking are required to completely overcome Iip35 ERM

In order to investigate whether these steric and motif-specific masking can be dissociated, we generated a mutant β chain with an Y230R substitution followed by a stop codon (DR β R) (Fig. 3.4). When this mutant was co-transfected in HEK 293T cells with a truncated α chain and Iip35 LI/ML, we could observe only a weak cell surface expression of Ii. The surface/total ratio showed that in comparison to DR β wild type, DR β R could not completely overcome Iip35 ERM (Figure 3.4). Based on the results presented above a cytoplasmic tail with a length of at least two amino acid is required for full egress of Iip35.

3.5.5 The secondary structure of the Ii cytoplasmic tail is not crucial for efficient masking

To gain insights into the masking of the ERM we constructed a mutant of Iip35 LI/ML lacking the region of Iip33 (Iip35 Δ 17-44). Interestingly deletion of this region inactivates Iip35 ERM and allows its ER even in the absence of MHC class II molecules (Figure 3.6b, Black bars). Cell surface expression of Iip35 Δ 17-44 in the absence of MHC class II molecules was comparable to the level of expression of a mutant Ii molecule devoid of most of its cytoplasmic tail (Iip35 Δ 1-34). This indicates that the ERM was completely inactivated in Iip35 Δ 17-44. Upon co-transfection with class II molecules, Iip35 Δ 17-44 and Iip35 Δ 1-34 cell surface expression increased, indicating facilitation by MHC class II molecules. This increase in cell surface expression of invariant chain upon association with MHC class II molecule was also observed for Iip33 {4620}. These results suggest that the conformation of the Ii tail is critical to the function of the ERM.

Also, the interplay between the very short YFR cytoplasmic tail of DR and Ii suggests that the conformation of the latter must be critical for an efficient masking of its ERM. In order to test this hypothesis, we generated mutants of Iip35 LI/ML where prolines in the p33 region were mutated to alanines (Fig. 3.5A). As shown in Figure 3.5B, mutation of Iip35 LI/ML prolines at position 31 (P31A) or 37 and 40 (P37A,P40A) did not affect the capacity of the ERM to

retain Iip35 molecules in the absence of class II molecules (Black bars). When class II molecules (DR α TM/ β) were co-transfected with these Ii mutants, an efficient masking of the ERM was still observed (Grey bars, Fig. 3.5B). These results suggest that the wild-type β chain can efficiently mask Iip35 retention signal even if the secondary structure of the integral Iip35 cytoplasmic tail is affected.

3.6 DISCUSSION

The role of Ii as a chaperone for major histocompatibility complex class II molecules has been well characterized. Recently, we have shed some light on the mechanism required to overcome Iip35 retention motif upon class II association. We have identified the cytoplasmic region of the MHC class II molecule β chain as a key player in the masking of Iip35 ERM (45). The data presented in this study revealed that in order to overcome Iip35 retention signal, a combination of steric and motif-specific masking by MHC class II β chain cytoplasmic tail is required.

Recently, O'Kelly et al. demonstrated in class II⁻ cells that the binding of 14-3-3 β and β COP is mutually exclusive on Iip35 (and KCNK3 receptor) (40). Although egress was not monitored, the authors concluded that the 14-3-3 β binding site constitutes an ER "release" motif. Several characteristics of Iip35 were not taken into account in this model. First, Ii trimerizes in the endoplasmic reticulum, raising the question whether this mutually exclusive binding occurs on all three invariant chains. What would happen if 14-3-3 and β COP are found on the same trimer? Second, the binding of 14-3-3 to Iip35 does not allow ER egress in MHC class II negative cells even if it prevents β COP association. MHC class II association is required for an efficient egress of Iip35 molecules, specifically the β chain cytoplasmic tail (4,45,54). And finally the binding of

14-3-3 is totally dispensable as an Iip35 S8D mutant does not bind 14-3-3 but still egress the ER in the presence of class II molecules.

Based on our results, and the study of O'Kelly et al., we propose that Iip35 is retained in the ER by at least two different mechanisms. In class II⁻ cells (or expressing DR β TM), Iip35 could be retained through β COP-mediated retrograde transport or by 14-3-3 mediated aggregation. This last mechanism is supported by the early work of Cresswell revealing the presence of high molecular weight, aggregated trimers of Ii by electrophoresis or chromatography (2). We postulate that 14-3-3, which is dimeric, aggregates trimers of Ii into multimolecular complexes that are excluded from budding regions of the ER. Therefore, the β COP-mediated retrieval operates only a) on non phosphorylated Iip35 that has yet to bind PKC or b) on phosphorylated Iip35 that has yet to bind 14-3-3. Thus the role of class II would be twofold: 1) through steric hindrance, the β chain cytoplasmic tail would disrupt 14-3-3 induced aggregates and allow ER egress and/or 2) through a salt bridge involving ARG 232 and the phosphorylated Iip35 serine 8, class II would affect conformation of the Ii cytoplasmic tail and overcome all retention mechanisms by preventing binding of both β COP and 14-3-3. This model is in line with our results showing that mutation of the positively charged arginine (R232) in the tail of DR β greatly diminishes ER egress of Iip35 (Fig. 3.3). A charge-charge interaction would explain why an Asp can replace S8 on Ii (Iip35 S8D) and still

allow egress in the presence of class II (39). The fact that mutation of R232 does not totally abrogate egress most probably reflects steric hindrance and Ii deaggregation caused by the transmembrane-proximal residues of the class II tail. Retention by 14-3-3 was recently ruled out using a chimeric CD4 molecule (55). However this construct was monomeric and not at all representative of the trimeric invariant chain. This issue has to be reevaluated in the context of Ii as the valency and spatial arrangement of the tails are undoubtedly crucial to the formation of large aggregates.

Our results have also shown that the separate mutation of three prolines in the Iip33 tail does not preclude masking by HLA-DR (Fig. 3.5B). Still, we think that some structural features in the invariant chain are critical for masking and/or egress. This is based in part on our Iip35 Δ 17-44 deletion mutant that exits the ER by itself, even though the p35 ERM is present on the residual tail. This might relate to other studies on di-basic signals suggesting that the ERM is inactive if too close to the membrane (56).

3.7 ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. Eric O. Long and Dr. Peter Cresswell for providing cDNAs, antibodies and hybridomas. H.K. and A.B. are supported by studentships from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR). J.T. is the recipient of a CIHR scholarship. This work was supported by a Young Investigator Award to J.T. by Boeringher Ingelheim Canada.

3.8 ABBREVIATIONS

The abbreviations used are: Ii, Invariant chain, MHC, major histocompatibility complex; ER, endoplasmic reticulum; PCR, polymerase chain reaction; CLIP, class-II associated Ii peptide; ERM, endoplasmic reticulum retention motif; mAb, monoclonal antibody; FCS, fetal calf serum.

3.9 REFERENCES

1. Cresswell,P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 259-293 (1994).
2. Marks,M.S., Blum,J.S. & Cresswell,P. Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J. Cell Biol.* **111**, 839-855 (1990).
3. Roche,P.A., Marks,M.S. & Cresswell,P. Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein. *Nature* **354**, 392-394 (1991).
4. Lamb,C.A. & Cresswell,P. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J. Immunol.* **148**, 3478-3482 (1992).
5. Roche,P.A. & Cresswell,P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* **345**, 615-618 (1990).
6. Romagnoli,P. & Germain,R.N. The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J. Exp. Med.* **180**, 1107-1113 (1994).
7. Stumptner,P. & Benaroch,P. Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *EMBO J.* **16**, 5807-5818 (1997).
8. Busch,R., Cloutier,I., Sekaly,R.-P. & Hammerling,G.J. Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **15**, 418-428 (1996).
9. Anderson,M.S. & Miller,J. Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2282-2286 (1992).
10. Hitzel,C. & Koch,N. The invariant chain derived fragment CLIP is an efficient *in vitro* inhibitor of peptide binding to MHC class II molecules. *Mol. Immunol.* **33**, 25-31 (1996).

11. Pieters,J., Bakke,O. & Dobberstein,B. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J. Cell. Sci.* **106**, 831-846 (1993).
12. Odorizzi,C.G. *et al.* Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J. Cell Biol.* **126**, 317-330 (1994).
13. Bakke,O. & Dobberstein,B. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* **63**, 707-716 (1990).
14. Lotteau,V. *et al.* Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* **348**, 600-605 (1990).
15. Anderson,M.S., Swier,K., Arneson,L. & Miller,J. Enhanced antigen presentation in the absence of the invariant chain endosomal localization signal. *J. Exp. Med.* **178**, 1959-1969 (1993).
16. Roche,P.A., Teletski,C.L., Stang,E., Bakke,O. & Long,E.O. Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8581-8585 (1993).
17. Nijenhuis,M. *et al.* Targeting major histocompatibility complex class II molecules to the cell surface by invariant chain allows antigen presentation upon recycling. *Eur. J. Immunol.* **24**, 873-883 (1994).
18. Ericson,M.L., Sundstrom,M., Sansom,D.M. & Charron,D.J. Mutually exclusive binding of peptide and invariant chain to major histocompatibility complex class II antigens. *J. Biol. Chem.* **269**, 26531-26538 (1994).
19. Jensen,P.E., Weber,D.A., Thayer,W.P., Westerman,L.E. & Dao,C.T. Peptide exchange in MHC molecules. *Immunol. Rev.* **172**, 229-238 (1999).
20. Theyry,C. *et al.* MHC class II transport from lysosomal compartments to the cell surface is determined by stable peptide binding, but not by the cytosolic domains of the α . *J. Immunol.* **161**, 2106-2113 (1998).
21. Strubin,M., Long,E.O. & Mach,B. Two forms of the Ia antigen-associated invariant chain result from alternative initiations at two in-phase AUGs. *Cell* **47**, 619-625 (1986).

22. O'Sullivan,D.M., Noonan,D. & Quaranta,V. Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternative splicing and alternate initiation of transcription/translation. *J. Exp. Med.* **166**, 444-450 (1987).
23. Spiro,R.C., Sairenji,T., Townsend,P., Reisert,P.S. & Humphreys,R.E. The Ii nature of p35 on hairy leukemic cells. *Semin. Oncol.* **11**, 427-432 (1984).
24. Veenstra,H., Jacobs,P. & Dowdle,E.B. Processing of HLA-class II invariant chain and expression of the p35 form is different in malignant and transformed cells. *Blood* **82**, 2494-2500 (1993).
25. Neumer,C., Brandt,R. & Zuhlke,H. The major histocompatibility complex and diabetes mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol.* **89**, 112-125 (1987).
26. Schutze,M.-P., Peterson,P.A. & Jackson,M.R. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **13**, 1696-1705 (1994).
27. Jackson,M.R., Nilsson,T. & Peterson,P.A. Identification of a consensus motif for the retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **9**, 3153-3162 (1990).
28. Munro,S. & Pelham,H.R. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907 (1987).
29. Pelham,H.R. Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 530-535 (1995).
30. Cole,N.B., Ellenberg,J., Song,J., DiEuliis,D. & Lippincott-Schwartz,J. Retrograde transport of Golgi-localized proteins to the ER. *J. Cell Biol.* **140**, 1-15 (1998).
31. Cosson,P. & Letourneur,F. Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* **263**, 1629-1631 (1994).
32. Zerangue,N., Schwappach,B., Jan,Y.N. & Jan,L.Y. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* **22**, 537-548 (1999).
33. Margeta-Mitrovic,M., Jan,Y.N. & Jan,L.Y. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* **27**, 97-106 (2000).

34. Bichet,D. *et al.* The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* **25**, 177-190 (2000).
35. Standley,S., Roche,K.W., McCallum,J., Sans,N. & Wenthold,R.J. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* **28**, 887-898 (2000).
36. Teyton,L. *et al.* Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* **348**, 39-44 (1990).
37. Anderson,H.A., Bergstralh,D.T., Kawamura,T., Blauvelt,A. & Roche,P.A. Phosphorylation of the invariant chain by protein kinase C regulates MHC class II trafficking to antigen-processing compartments. *J. Immunol.* **163**, 5435-5443 (1999).
38. Anderson,H.A. & Roche,P.A. Phosphorylation regulates the delivery of MHC class II invariant chain complexes to antigen processing compartments. *J. Immunol.* **160**, 4850-4858 (1998).
39. Kuwana,T., Peterson,P.A. & Karlsson,L. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**, 1056-1061 (1998).
40. O'Kelly,I., Butler,M.H., Zilberberg,N. & Goldstein,S.A. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* **111**, 577-588 (2002).
41. Muslin,A.J. & Xing,H. 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal.* **12**, 703-709 (2000).
42. Tzivion,G., Shen,Y.H. & Zhu,J. 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene* **20**, 6331-6338 (2001).
43. van Hemert,M.J., Steensma,H.Y. & van Heusden,G.P. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* **23**, 936-946 (2001).
44. Yaffe,M.B. How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* **513**, 53-57 (2002).

45. Khalil,H. *et al.* The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int. Immunol.* **15**, 1249-1263 (2003).
46. Sekaly,R.-P., Tonnelle,C., Strubin,M., Mach,B. & Long,E.O. Cell surface expression of class II histocompatibility antigens occurs in the absence of the invariant chain. *J. Exp. Med.* **164**, 1490-1504 (1986).
47. Tonnelle,C., DeMars,R. & Long,E.O. DO β : a new β chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J.* **4**, 2839-2847 (1985).
48. Robadey,C. *et al.* The processing routes determined by negatively charged residues in DR1-restricted T cell determinants. *J. Immunol.* **159**, 3238-3246 (1997).
49. Ho,S.N., Hunt,H.D., Horton,R.M., Pullen,J.K. & Pease,L.R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59 (1989).
50. Brunet,A., Samaan,A., Deshaies,F., Kindt,T.J. & Thibodeau,J. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta. *J. Biol. Chem.* **275**, 37062-37071 (2000).
51. Watanabe,M., Suzuki,T., Taniguchi,M. & Shinohara,N. Monoclonal anti-Ia murine alloantibodies crossreactive with the Ia- homologues of other mammalian species including humans. *Transplantation* **36**, 712-718 (1983).
52. Wallin,E. & von Heijne,G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* **7**, 1029-1038 (1998).
53. Persson,B. & Argos,P. Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* **237**, 182-192 (1994).
54. Roche,P.A., Marks,M.S. & Cresswell,P. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* **354**, 392-394 (1991).
55. Yuan,H., Michelsen,K. & Schwappach,B. 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr. Biol.* **13**, 638-646 (2003).

56. Shikano,S. & Li,M. Membrane receptor trafficking: evidence of proximal and distal zones conferred by two independent endoplasmic reticulum localization signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* **100**, 5783-5788 (2003).
57. Motta,A. *et al.* A new triple-stranded α -helical bundel in solution: the assembling of the cytosolic tail of MHC associated invariant chain. *Structure* **5**, 1453-1464 (1997).

3.10 FIGURES

Figure 3.1. The DM β and DO β chain cytoplasmic tails are sufficient to overcome Iip35 ER retention motif.

(A) Schematic representation of the chimeric class II α and β chain combinations expressed in HeLa cells. (B) HEK 293T cells were transiently co-transfected with the indicated chimeric molecules and with pREP4 Iip35 LI/ML and tested after 48h. Cells were analyzed by flow cytometry using BU45 either before (surface Ii) or after permeabilization with saponin (total Ii). The surface / total Ii ratios are shown. The total ISCR3 MFVs for DR α TM/ β , DR α / β , DR α / β cytoDM-Y and DR α / β cytoDO expression were 280, 267, 275, 251, respectively. The MFV for the secondary antibody alone was 4 (data not shown).

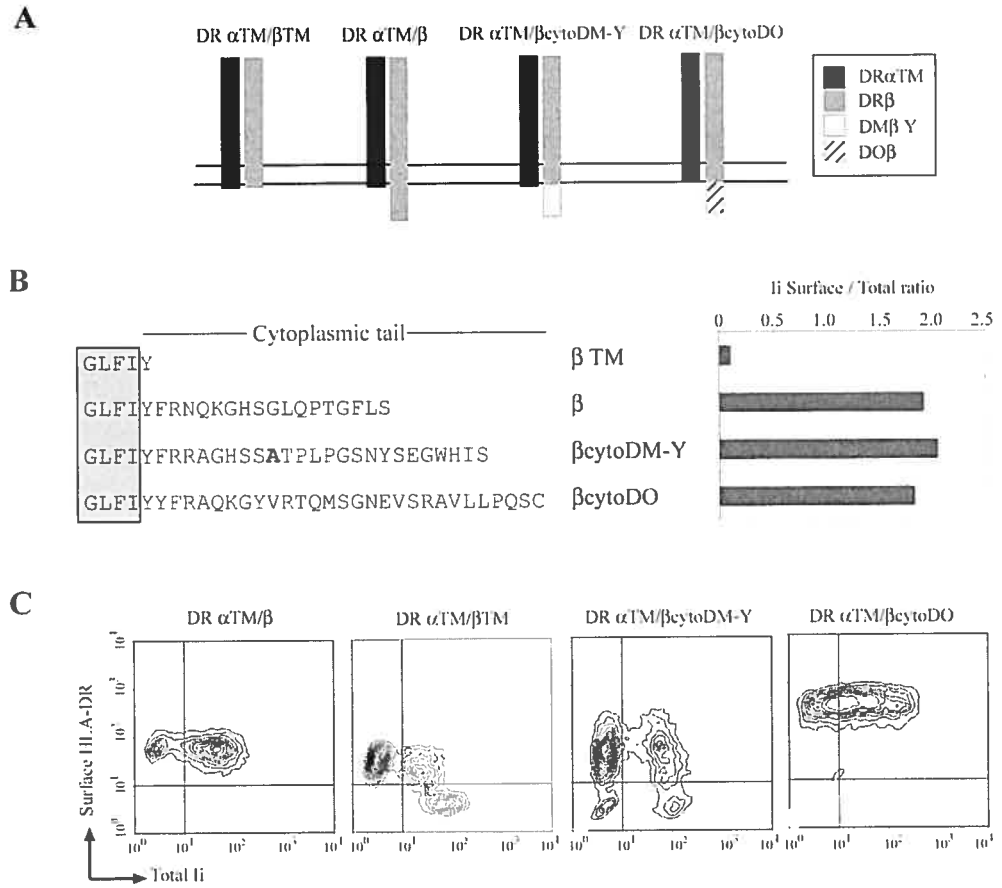


Figure 3.2. Alanine scan of DR β cytoplasmic tail.

HEK 293T cells were transiently co-transfected with the indicated chimeric molecules and with pREP4 Iip35 LI/ML and tested after 48h. Cells were analyzed by flow cytometry using BU45 either before (surface Ii) or after permeabilization with saponin (total Ii). The surface / total Ii ratios are shown. The total ISCR3 MFVs for all the chimeric molecules was between 242 and 260. The MFV for the secondary antibody alone was 5 (data not shown).

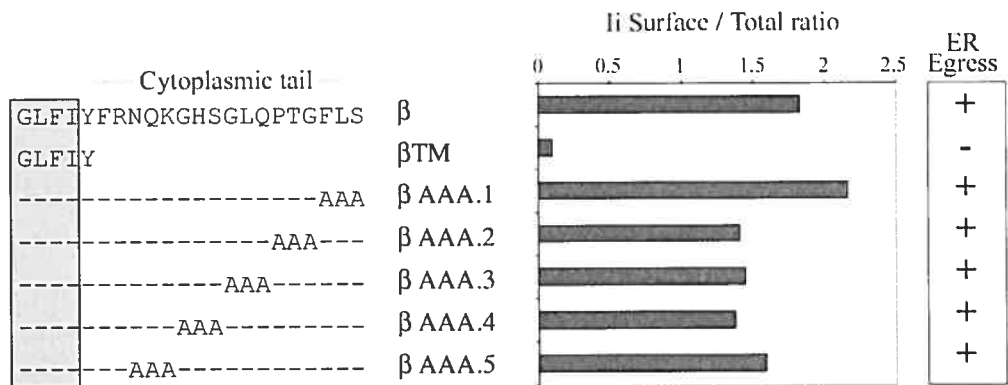


Figure 3.3. Truncation of DR β cytoplasmic tail after arginine 232 hinders Iip35 ERM masking.

HEK 293T cells were transiently co-transfected with the indicated chimeric molecules and with pREP4 Iip35 LI/ML and tested after 48h. Cells were analyzed by flow cytometry using BU45 either before (surface Ii) or after permeabilization with saponin (total Ii). The surface / total Ii ratios are shown. The total ISCR3 MFVs for all the chimeric molecules was between 242 and 260. The MFV for the secondary antibody alone was 5 (data not shown).

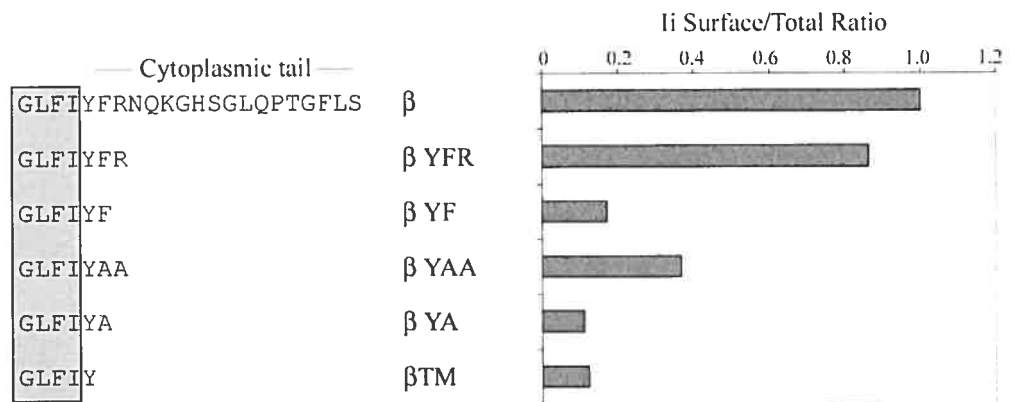


Figure 3.4. Position of the arginine in DR β cytoplasmic tail is critical for an efficient masking of Iip35 ERM.

(A) HEK 293T cells were transiently co-transfected with the indicated chimeric molecules and with pREP4 Iip35 LI/ML and tested after 48h. Cells were analyzed by flow cytometry using BU45 either before (surface Ii) or after permeabilization with saponin (total Ii). The surface / total Ii ratios are shown. The total ISCR3 MFVs for all the chimeric molecules was between 242 and 260. The MFV for the secondary antibody alone was 5 (data not shown). (B) Schematic representation of the “Snorkeling effect” induced by an arginine at the end of the transmembrane region.

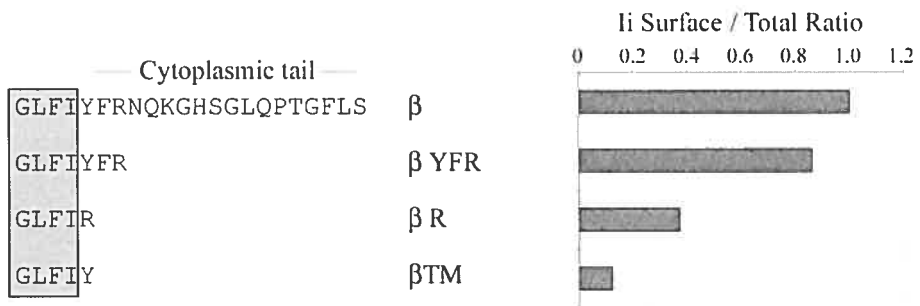


Figure 3.5. Proline residues in Iip35 cytoplasmic tail are not required for its retention and masking by HLA-DR.

(A) N-terminal amino acid sequence of the Iip35 proline mutants. Positions 1 and 17 are the initiation sites of Iip35 and Iip33 respectively. The arginine residues forming the ERM are underlined, the leucine-based targeting signals are in black boxes, prolines in Iip33 region are in bold and the phosphorylated serine 8 is boxed. (B) HEK 293T cells were transiently co-transfected with the indicated invariant chain molecules and with or without DR α TM/ β and tested after 48h. Cells were analyzed by flow cytometry using BU45 either before (surface Ii) or after permeabilization with saponin (total Ii). The surface / total Ii ratios are shown. (C) Schematic representation of the p33 cytoplasmic tail structure as determined by NMR (57). Prolines residues that were mutated to alanines are indicated.

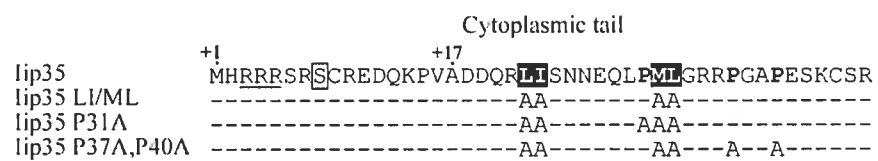
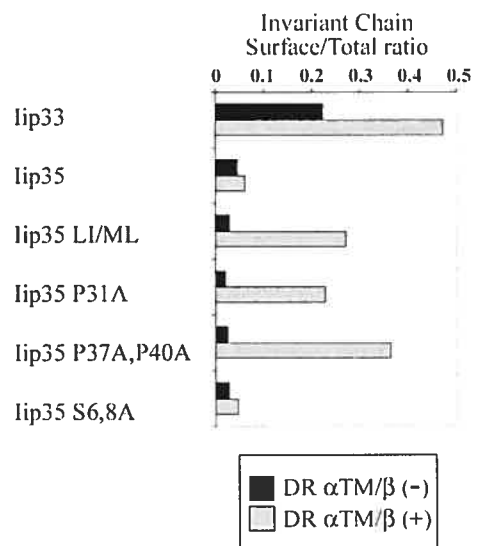
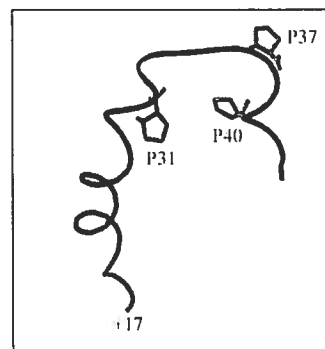
A**B****C**

Figure 3.6. Removing the p33 portion of Iip35 cytoplasmic tail inactivates the ERM.

(A) N-terminal amino acid sequence of Iip35 LI/ML and the mutants with deletions in this region. Positions 1 and 17 are the initiation sites of Iip35 and Iip33 respectively. The arginine residues forming the ERM are underlined, the original position of the mutated leucine-based targeting signals are in black boxes, prolines in Iip33 region are in bold and the phosphorylated serine 8 is boxed. (B) The indicated invariant chain molecules were transiently co-transfected in HEK 293T cells with or without DR α TM/ β and tested after 48h. Cells were analyzed by flow cytometry using BU45 either before (surface Ii) or after permeabilization with saponin (total Ii). The surface / total Ii ratios are shown.

CHAPITRE 4 - ARTICLE

Class II transactivator-Induced Expression of HLA-DO β in HeLa Cells

Hayssam Khalil^{1¶}, Francis Deshaies^{1¶}, Angélique Bellemare-Pelletier¹,
Alexandre Brunet¹, Amélie Faubert¹, Georges A. Azar¹ and Jacques
Thibodeau^{1,2}

Publié dans *Tissue antigens* ©

2002 Nov;60(5):372-82

¹ Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Canada.

Running title: HLA-DO β induction by CIITA

Keywords: MHC, HLA-DO, HLA-DM, CIITA, HeLa

² **Corresponding author:** Jacques Thibodeau, Laboratoire d'Immunologie Moléculaire,
Département de Microbiologie et Immunologie,
Université de Montréal, CP 6128,
Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec
Canada, H3C 3J7
Tel: (514) 343-6279; **Fax:** (514) 343-5701
e-mail: Jacques.Thibodeau@umontreal.ca

4.1 SUMMARY

HLA-DO is an intracellular non-classical MHC class II molecule expressed in the endocytic pathway of B lymphocytes. It shapes the repertoire of peptides bound to classical class II molecules such as HLA-DR by regulating the activity of HLA-DM. Using a peptide corresponding to the cytoplasmic tail of HLA-DO β , we have developed a mouse monoclonal antibody, HKC5. Immunofluorescence microscopy revealed that HKC5 recognizes HLA-DO molecules present in the endoplasmic reticulum as well as those in vesicular compartments of the endocytic pathway. In addition, the antibody detects the isolated β chain on Western blots. Using mutants of the DO β cytoplasmic tail fused to a reporter molecule and expressed in epithelial cells, we showed by flow cytometry that the antibody epitope includes one or both of the leucine residues forming the lysosomal sorting signal. Finally, we have used HKC5 to evaluate the presence of the HLA-DO β chain in HeLa cells expressing the class II transactivator protein CIITA. Our flow cytometry and confocal microscopy analysis showed a marked expression of DO β suggesting that HLA-DO can accumulate under the influence of CIITA in non-B cells.

4.2 RÉSUMÉ

HLA-DO est une molécule non-classique intracellulaire présente dans la voie endocytaire des lymphocytes B. En régulant l'activité de HLA-DM, elle permet d'établir le répertoire des peptides associés aux molécules du CMH de classe II classiques tel que HLA-DR. À l'aide d'un peptide correspondant à la queue cytoplasmique de HLA-DO β , nous avons développé un anticorps monoclonal de souris, HKC5. Des expériences de microscopie par immunofluorescence ont permis de démontrer que HKC5 reconnaît les molécules HLA-DO présentes au niveau du réticulum endoplasmique ainsi que celles dans les compartiments vésiculaires de la voie endocytaire. De plus, cet anticorps permet de détecter les chaînes β par « Western blots ». À partir de mutants de la queue cytoplasmique de DO β , exprimés au sein de cellules épithéliales, nous avons mis en évidence que l'épitope de HKC5 inclut une ou deux des leucines formant le motif de ciblage aux lysosomes. Finalement, nous avons utilisé HKC5 dans le but d'évaluer la présence de la chaîne HLA-DO β au niveau de cellules HeLa exprimant la protéine CIITA (Class II transactivator). Nos résultats de cytométrie en flux et de microscopie confocale ont permis de démontrer une expression considérable de DO β suggérant que HLA-DO peut s'accumuler dans ces cellules autres que les lymphocytes B sous l'influence de CIITA.

4.3 INTRODUCTION

MHC class II molecules are highly polymorphic proteins composed of two non-covalently associated α and β -chains presenting antigen fragments to $CD4^+$ T lymphocytes (1). Very rapidly after their synthesis, three MHC class II molecules associate with trimers of a chaperone called the invariant chain (Ii) to form an $(\alpha\beta Ii)_3$ nanomeric complex (2,3). Targeting of these complexes to the endocytic pathway is mediated by two leucine-based motifs in the cytoplasmic tail of Ii (4,5). In these compartments, Ii is degraded leaving a residual peptide called CLIP (Class II-associated Invariant chain Peptide) in the groove of the class II molecule (6).

Two non-classical proteins encoded in the MHC class II locus, HLA-DM and HLA-DO (H2-M and H2-O in mice), are involved in the exchange of CLIP for antigenic peptides (7-9). They are called non-classical class II molecules mainly because of their very limited polymorphism. (10-12). In addition, they do not bind peptides and mostly accumulate in the endocytic pathway (7,13). In normal cells, HLA-DM catalyzes peptide loading and edits the general repertoire of class II-bound peptides by releasing those of low affinity (14-18). Cells deficient in the expression of HLA-DM bear large amounts of cell surface CLIP-class II complexes due to a failure in peptide loading (15,19,20). Whereas DM is constitutively expressed in all APCs, DO expression is restricted mainly

to B lymphocytes and a subset of thymic epithelial cells (21-23). HLA-DO associates with HLA-DM, a pre-requisite for its exit from the endoplasmic reticulum (13). The physiological role of HLA-DO is still controversial. When overexpressed in transfected cells, HLA-DO clearly inhibits the activity of HLA-DM, causing a dramatic accumulation of CLIP at the cell surface (24,25). The activity of DO is pH-dependent and it would inhibit HLA-DM exclusively in early compartments of the endocytic pathway to prevent non-specific activation of B cells (26). This hypothesis originates from experiments using mice with a deletion of the H2-O α genes and whose B-cells showed an increased presentation of fluid-phase endocytosed antigens (26). Therefore, HLA-DO modulates class II peptide loading in B lymphocytes and regulates antigen presentation in the immune system (27).

The restricted cellular distribution of HLA-DO implies that the regulation of its expression must be subjected to a different control than classical class II molecules or DM and Ii. The DO α mRNA was found to be expressed at lower levels as compared to other class II genes, probably because of a defective polyadenylation (28). However, despite this low level of expression, DO α is co-regulated with other class II molecules its gene contains putative promoter sequences similar to those of other class II genes (28) and is inducible by γ -IFN (11). Thus, it seems that DO β is the one gene subjected to a tight and differential regulation. The first evidence for this came from the group of Long that showed that the RJ2.2.5 mutant B cells express DO β mRNA eventhough

the DR β gene was shut down. In addition, DO β or H-2O β gene expression could not be up-regulated by γ -IFN (11,23). When the CIITA molecule was found to be mutated in RJ2.2.5 and identified as the master switch in the induction of class II genes by γ -IFN (29), it was concluded that DO β gene expression was independent from CIITA and that other nuclear factors were involved in its transcription. CIITA is a transactivating factor regulating the constitutive and inducible expression of class II related genes (30). It does not bind directly to DNA but is rather involved in multiple protein-protein interactions allowing its recruitment to the promoters (30). Representational difference analysis (RDA) of expressed transcripts using cDNAs from CIITA⁻ and CIITA⁺ cells also suggested that DO α and DO β were differentially regulated (31).

Interestingly, other studies point to a role for CIITA in increasing transcription of the DO β expression. Ponzoni et al. have reported increased levels of highly unstable HLA-DO β mRNAs after INF- γ treatment of neuroblastoma cells (32). Also, it was recently postulated that HLA-DO β protein expression is increased by CIITA but only in B cells (33). Given the potential of HLA-DO to inhibit antigen presentation and modify the peptide repertoire, we investigated the ability of CIITA to increase the expression of DO β in non-professional APCs. We made use of a new mouse monoclonal antibody to assess by flow cytometry

and confocal microscopy the expression of DO β in CIITA-transfected HeLa cells.

4.3 MATERIAL AND METHODS

4.3.1 Cell lines, plasmids and transfections

Mouse myeloma cells P3X63Ag8.653 (ATCC, Rockville, MD) were cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum (FBS). The Epstein-Barr transformed B-lymphoblastoid cell line 721.45 (.45) and its counterpart, 721.61 (.61), having the DO β gene region deleted have been obtained from Robert DeMars (University of Wisconsin) (34). The Burkitt lymphoma B cell lines Raji (EBV; ATCC CCL-86) and BJA-B (EBV; (35,36)) were obtained from Rafick Sékaly. The human CIITA cDNA (FLAG.CIITA8), cloned in pcDNA3 and in pREP4, was obtained from Dr Jenny Ting (University of North Carolina) (37). HeLa cells (Cervix adenocarcinoma, ATCC CCL 2.1) were transfected by the calcium phosphate co-precipitation method as described (38) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Burlington, ON) containing 10% fetal bovine serum (Wisent, St.-Bruno, QC) with appropriate selective agents. Cells stably expressing CIITA were sorted using magnetic beads (DynaL ASA Inc., Oslo, Norway) coated with the DR-specific L243 antibody as described (39). HeLa DO, HeLa DM.5 / DO α + DO β , HeLa DR1, HeLa DR α TM + DR/DO β cyto, HeLa DR α TM + DR/DO β cyto Y227A and HeLa DR α TM + DR/DO β cyto LL242-243AA cells have been described previously (39).

4.3.2 Antibodies

Monoclonal antibody (mAb) Map.DM1 (IgG₁) is directed against the luminal portion of HLA-DM (PharMingen International, Oakville, ON). mAb L243 (IgG2_a) (ATCC HB-55) binds a DR α 1 conformational determinant (40). mAb XD5.117 (IgG1) recognizes a linear epitope in the β 1 domain of HLA-DR β (41). mAb Cer-CLIP (IgG₁) is directed against the N-terminal segment of CLIP bound to class II molecules (PharMingen International, Oakville, ON) (42). Rabbit antisera against HLA-DM β was previously described (39). Goat anti-mouse IgG(H + L) and Goat anti-rabbit IgG(H+L) coupled to Alexa Fluor®488 were obtained from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Biotinylated goat anti-rabbit, biotinylated goat anti-mouse and peroxidase-coupled goat anti-mouse were from Jackson ImmunoResearch, (Westgrove, PA). Texas Red-coupled streptavidin was from Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, England). The polyclonal rabbit antibody against calnexin recognizes the carboxy-terminal part of the protein (Stressgen, Victoria, BC).

4.3.3 Immunization and cell fusion

The peptide used for the production of antibody HKC5 corresponds to the amino acid sequence of the HLA-DO β cytoplasmic tail (a kind gift from Rafick Sékaly). The peptide was conjugated to bovine serum albumin (BSA) for immunization and screening purposes, as described (43). BALB/c mice

(Charles Rivers, St-constant, QC) were immunized four times at one-week interval s.c. at multiple sites with 10 µg of BSA-conjugated HLA-DOβ peptide mixed with 10 µg of QUIL-A saponin adjuvant (Cederlane, Hornby, ON). Three days after the final injection, 6×10^8 spleen cells were fused in 50% polyethylene glycol with P3X63Ag8.653 myeloma cells (44). Hybridomas were selected in HAT medium (5 mM hypoxanthine, 20 µM aminopterin and 0.8 µM thymidine) (Sigma, Oakville, ON) and screened by ELISA (45). After subcloning clone HKC5 was further characterized.

4.3.4 Isotyping of HKC5

HKC5 class and subclass were determined using the mouse immunoglobulin isotyping ELISA kit (PharMingen International, Oakville, ON). mAbs were purified from the hybridoma supernatant by ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation at 50% saturation. Crystalline ammonium sulfate (341g/L) was added to cell culture supernatant and stirred overnight at 4°C to ensure precipitation of proteins. The IgG containing pellet was dissolved in 10 ml PBS (pH:7.2) and dialyzed against PBS overnight at 4°C. Antibody was purified by immunoaffinity chromatography using protein G-sepharose.

4.3.5 Western blot

Cells (1.2×10^7) were trypsinized, washed in PBS and lysed into 1% Triton X-100 as described previously (46). Samples were boiled 5 minutes under non-

reducing conditions in SDS loading buffer and analyzed on 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred to hybond ECL membranes (Amersham Pharmacia Biotech, England) and blotted with HKC5 overnight at 40C with agitation. Peroxidase-coupled goat anti-mouse secondary antibody was used. After washings, the membrane was developed by chemiluminescence (Roche Molecular Biochemicals, Quebec, QC) on superRX fuji films.

4.3.6 Flow Cytometry

Cells were stained at their cell surface for the presence of CLIP and HLA-DR using CerCLIP.1 and L243 monoclonal antibodies, respectively. Intracellular staining was done on saponin-permeabilized cells as previously described (39) using the DR-specific XD5.117 or DO-specific HKC5 monoclonal antibodies. We used a secondary goat anti-mouse IgG (H + L) coupled to Alexa Fluor[®]488 for both surface and intracellular staining. Cells were analyzed by flow cytometry on a FACScalibur[®] (Becton Dickinson, Mississauga, ON).

4.3.7 Fluorescence Microscopy

Cells (1×10^4) were plated on coverslips in 24-well plates and cultured for 3 days before intracellular staining as previously described (39). Cells were analyzed by confocal fluorescence microscopy on a Leica TCS-NT SP1 system.

4.4 RESULTS

4.4.1 Characterization of the HKC5 mAb

Monoclonal antibodies against HLA-DO β have been difficult to obtain and many attempts using mice immunized with mouse fibroblasts expressing DR α /DO β mixed pairs (47,48) have been unsuccessful. We turned to mice immunized with a synthetic peptide corresponding to the entire cytoplasmic tail of the HLA-DO β chain (11). A monoclonal antibody called HKC5, reactive to this peptide, was produced. We determined by ELISA that HKC5 belongs to the IgG1- κ subclass (not shown). HKC5 specifically recognized HLA-DO β on western blots of whole cell lysates made from HeLa cells transfected with both chains of HLA-DO together with HLA-DM (to ensure full maturation and expression) (Figure 4.1A). No signal could be detected in non-transfected HeLa cells (left lane) or in HeLa cells transfected with HLA-DM alone (not shown).

To confirm the specificity of HKC5 and to evaluate its capacity to recognize DO β by flow cytometry in detergent-permeabilized cells, we utilized a B cell line expressing HLA-DO β (721.45 cells) as well as its derivative carrying a deletion of the DO β genes (721.61 cells) (34). As shown in figure 4.1B, HKC5 recognized HLA-DO β in the parental cell line .45, but not in .61 cells. Finally, the specificity of HKC5 was confirmed by the positive staining observed using DO $\alpha\beta$ -transfectants in the absence of DM (figure 4.1C). Therefore, HKC5 is able to recognize both the denatured and folded forms of HLA-DO β .

The usefulness of HKC5 for analysing the sub-cellular distribution of HLA-DO in transfected cells was determined. It was shown that HLA-DO is retained in the ER and exits to the endocytic pathway only in the presence of HLA-DM (13). In accordance with the western blot results presented above, HKC5 did not significantly stain HeLa cells analyzed by confocal microscopy (figure 4.2). On the other hand, in HeLa cells transfected with both chains of HLA-DO, HKC5 displayed a pattern indistinguishable from the one obtained for the ER-resident chaperone calnexin (panel b,e,h). When HLA-DM was co-transfected with HLA-DO in these cells, HLA-DO β was localized in well-defined perinuclear vesicles reminiscent of endosomal/lysosomal compartments (panel c). Moreover, this pattern did not overlap with the one obtained for calnexin (panel f,i). These results demonstrate that HKC5 is a useful tool to monitor the cellular localization of HLA-DO or DO/DM complexes.

4.4.2 HKC5 binds the di-leucine targeting motif of HLA-DO β

The HLA-DO β cytoplasmic tail contains a leucine-based endosomal sorting sequence (49). Recently, we reported that this sorting signal is responsible for the redistribution and accumulation in endosomes of a HLA-DR reporter molecule having the cytoplasmic tail of the DR β chain replaced by the one of DO β (DR/DO β cyto) (39). In order to study these targeting signals we had

performed site directed mutagenesis of the tyrosine (DR/DO β cyto Y227A) or di-leucine (DR/DO β cyto LL242-243AA) motifs (figure 4.3A). In an effort to refine the epitope recognized by HKC5, we made use of HeLa cells expressing these β -chain constructs. As shown in Figure 4.3B, HKC5 is able to recognize the chimeric DR/DO β cyto chain when transfected in HeLa cells without showing any cross-reactivity with the wild-type DR β chain. The XD5.117 mAb specific for an extra-cytoplasmic region of the β chain was used to confirm the expression of the various class II molecules (left panels). Interestingly, HKC5 could not recognize the DR/DO β cyto LL242-243AA molecule, whereas mutation of the tyrosine had no effect on recognition of the DR/DO β cyto Y227A chain. These results pinpoint one or both leucine residues of the LL motif as part of the epitope recognized by HKC5.

4.4.3 Variable expression of HLA-DO in Burkitt lymphoma cell lines

Recently, an important quantitative difference has been observed on western blots for the expression of DO β between the two Burkitt lymphoma B cell lines Raji (EBV⁺) and Ramos (EBV⁻) (50). We have used HKC5 to compare the expression of DO β between Raji and another EBV⁻ Burkitt lymphoma cell line called BJA-B (35,36). Figure 4.4A shows that Raji cells express much higher levels of DO β (MFV=18) than BJA-B (MFV=4). This was confirmed by confocal microscopy experiments (figure 4.4B) showing a strong DO β signal

only in Raji cells and a clear co-localization with HLA-DM in vesicular structures. Interestingly, as described for Ramos, the low DO expression in BJA-B cells correlates with the display of few CLIP-class II complexes at the cell surface (figure 4.4C).

4.4.4 HLA-DO β expression in CIITA+ HeLa cells

The role of CIITA in the regulation of HLA-DO has been controversial and it was recently proposed that a B cell-specific factor is required for CIITA to exert its effect (33). As a first step in the design of an experimental system aimed at cloning such a factor, HeLa cells were stably transfected with CIITA under the control of the CMV promoter and cells expressing HLA-DR were sorted using magnetic beads. A highly homogenous cell population was obtained (figure 4.5A, left panel). These cells were permeabilized and stained for DO β expression (right panel). To our surprise, flow cytometry analysis revealed a significant expression of HLA-DO β in CIITA-transfected cells. We confirmed by co-immunoprecipitation and western blot analyzes that this DO β chain was associated to DO α (not shown). Also, HLA-DO could be found outside the ER in vesicular structures suggesting a tight association with HLA-DM (Figure 4.5B).

Human B cells and mouse splenocytes deficient in CIITA expression still express significant DO β mRNAs or proteins suggesting the existence of an additional, B cell-specific factor regulating transcription of this gene. We

reasoned that expression of DO β in HeLa CIITA cells could not be maximal given the absence of such B cell-specific factor (31,33). Thus, the DO α chain was probably produced in excess in these cells. To verify this hypothesis, we super-transfected the DO β chain cDNA in HeLa CIITA and monitored the level of CLIP at the cell surface as a measure of DO $\alpha\beta$ dimer expression. Figure 4.6 shows that the sole transfection of DO β in CIITA⁺ cells (HeLa CIITA+DO β) increased not only the level of HKC5 staining but also the expression of CLIP at the cell surface. These results strongly suggest that free DO α chains were present in HeLa CIITA cells.

4.5 DISCUSSION

Our results describe HKC5 as a powerful tool for characterizing the expression and regulation of HLA-DO in cell lines, primary B cells and tumours. However, caution must be exercised if using this antibody to assess the role of the LL sorting signal found in the DO β chain. It remains to be determined if this motif can be inactivated by mutating only one or the other leucine residue without abrogating the reactivity of HKC5.

HKC5 was used to evaluate the expression of DO β in Burkitt lymphoma cell lines. Our results are in agreement with those of Roucard and collaborators who showed a direct correlation between the level of cell surface CLIP and the expression of DO β (50). The differential expression of DO β between Raji and BJA-B (or Ramos) most probably reflects their different activation status or maturation stage. (50). More studies will be needed to understand the regulation of HLA-DO during B cell ontogeny and activation.

Our results using HeLa clearly demonstrate the expression of DO β in CIITA-transfected cells. Still, the effect of CIITA on the DO β gene is marginal as compared to other class II genes and Ii. The high sensitivity of our detection methods due to the use of secondary antibodies coupled to Alexa Fluor[®]488 and of transfectants expressing high levels of CIITA probably accounts for our ability to detect DO in those cells. Recently, Boss and collaborators showed that CIITA augments HLA-DO β expression only in B cells and concluded to an indispensable role for a cell-specific factor (33). Our data do not support this

conclusion. Rather, CIITA and such a B cell-specific factor could independently increase transcription at the DO β promoter but also act together for maximal expression. Transfection of DO β somehow compensated for the absence of this cell-specific factor in HeLa CIITA and resulted in a drastic increase in the amount of surface class II molecules bound with the CLIP peptide (figure 4.6B). However, one can predict that transfection of the putative B cell-specific factor cDNA in HeLa CIITA would increase the expression of both HLA-DO α and β genes and bring the CLIP/DR ratio close to the one found in Raji cells.(Figure 4.4C) Indeed, the CIITA-deficient human B cell line RJ2.2.5 and CIITA knock-out mice still showed a strong expression of both DO α and β chain mRNAs (31,51). The nature of this transactivator regulating the DO genes is presently unknown. Using HKC5 to screen HeLa cells expressing cDNA libraries made from B cells, we hope to be able to identify such a factor in the near future.

At a molecular level, the mechanisms responsible for the differential effect of CIITA on class II genes are unknown. DO α and DO β promoters must share similarities allowing their expression in the absence of CIITA in B cells but differences must also exist to account for their differential level of response to the presence of CIITA. The overall structure of the DO β promoter is similar to other class II genes with the presence of S (also called W or Z), X, X2 and Y boxes (30). It was shown that the X box of DO β could substitute for the one of DR α to promote assembly of the multiprotein complex of transcription factors called the enhanceosome (52) and to induce transcription of the CAT reporter

gene in Raji cells (53). However, substitution of the 5' S box in the DR α promoter by the one of DO β resulted in more than 80% reduction in CAT activity. The nature of the proteins binding to the S box of class II genes is still unknown and such factors are likely going to differ in the case of the DO β promoter. The expression of DO α and DO β genes is completely abolished in RFX-deficient cells (31) and the complete enhanceosome with factors bound to the S, X, X2 and Y boxes is needed to recruit CIITA, (52). Factors bound to the DO β S box might reduce the interaction with CIITA favouring the binding of another, B cell-specific factor.

Altogether, these observations suggest that the overall affinity of CIITA is weak for the enhanceosome assembled on the promoter of DO β as compared to other class II genes. Expression of DO β in a majority of cell types would probably be possible given that the expression of CIITA is sufficiently high. Thus, the repertoire of class II-bound peptides may be directly influenced by the level of CIITA expression. This could represent an important issue when considering gene therapy based on de novo expression of CIITA in BLS or cancer patients (54).

4.6 ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Dr Rafick Sékaly for providing the HLA-DO β peptide, Dr. Robert DeMars for mutant B cell lines, Dr Jenny Ting for the CIITA cDNA and Dr Angela Samaan for the rabbit DM β antibody. We thank Dr Robert Nabi for helping with the confocal microscopy. This work was supported by grants to J.T. from the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and the Cancer Research Society Inc. H.K., F.D., and A.B. are scholars of the FCAR (Fonds des Chercheurs et Aides à la Recherche). J.T. is supported by a fellowship from the CIHR.

FOOTNOTES

¶ These authors contributed equally to this work

4.7 REFERENCES

1. Cresswell P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 259-293.
2. Roche PA, Marks MS, Cresswell P. Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein. *Nature* 1991; **354**: 392-394.
3. Lamb CA, Cresswell P. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J Immunol* 1992; **148**: 3478-3482.
4. Pieters J, Bakke O, Dobberstein B. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* 1993; **106**: 831-846.
5. Odorizzi CG, Trowbridge IS, Xue L, Hopkins CR, Davis CD, Collawn JF. Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J Cell Biol* 1994; **126**: 317-330.
6. Riberdy JM, Newcomb JR, Surman MJ, Barbosa JA, Cresswell P. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 1992; **360**: 474-477.
7. Alfonso C, Karlsson L. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 2000; **18** : 113-142.
8. Alfonso C, Liljedahl M, Winqvist O, Surh CD, Peterson PA, Fung-Leung WP, Karlsson L. The role of H2-O and HLA-DO in major histocompatibility complex class II-restricted antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 1999; **172**: 255-266.
9. Kropshofer H, Hammerling GJ, Vogt AB. The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunol Rev* 1999; **172**: 267-278.
10. Young JA, Trowsdale J. The HLA-DNA (DZA) gene is correctly expressed as a 1.1 kb mature mRNA transcript. *Immunogenetics* 1990; **31**: 386-388.
11. Tonnelde C, DeMars R, Long EO. DO β : a new β chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J* 1985; **4**: 2839-2847.

12. Serenius B, Rask L, Peterson PA. Class II genes of the human major histocompatibility complex. The DO beta gene is a divergent member of the class II beta gene family. *J Biol Chem* 1987; **262**: 8759-8766.
13. Liljedahl M, Kuwana T, Fung-Leung WP, Jackson M, Peterson PA, Karlsson L. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J* 1996; **15**: 4817-4824.
14. Weber DA, Evavold BD, Jensen PE. Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* 1996; **274**: 618-620.
15. Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II $\alpha\beta$ dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 1995; **82**: 155-165.
16. Roche PA. HLA-DM: an in vivo facilitator of MHC class II peptide loading. *Immunity* 1995; **3**: 259-262.
17. Van Ham SM, Grueneberg U, Malcherek G, Broeker I, Melms A, Trowsdale J. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs. *J Exp Med* 1996; **184**: 2019-2024.
18. Kropshofer H, Vogt AB, Moldenhauer G, Hammer J, Blum JS, Hammerling GJ. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J* 1996; **15**: 6144-6154.
19. Sherman MA, Weber DA, Jensen PE. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* 1995; **3**: 197-205.
20. Sloan VS, Cameron P, Porter G, Gammon M, Amaya M, Mellins E, Zaller DM. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 1995; **375**: 802-806.
21. Douek DC, Altmann DM. HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *Int Immunol* 1997; **9**: 355-364.
22. Karlsson L, Surh CD, Sprent J, Peterson PA. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* 1991; **351**: 485-488.
23. Wake CT, Flavell RA. Multiple mechanisms regulate the expression of murine immune response Genes. *Cell* 1985; **42**: 623-628.

24. Denzin LK, Sant'Angelo DB, Hammond C, Surman MJ, Cresswell P. Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 1997; **278**: 106-109.
25. Van Ham, S. M., Tjin, E. P. M., Lillemeir, B. F., Gruneberg, U., Van Meijgaarden, K. E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D., Ottenhoff, T. H. M., Pappin, D. J. C., Trowsdale, J., and Neefjes, J. HLA-DO is a negative regulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Current Biology* 1997; **7**: 950-957..
26. Liljedahl M, Winqvist O, Surh CD, Wong P, Ngo K, Teyton L, Peterson PA, Brunmark A, Rudensky AY, Fung-Leung WP, Karlsson L. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 1998; **8**: 233-243.
27. van Ham M, van Lith M, Griekspoor A, Neefjes J. What to do with HLA-DO? *Immunogenetics* 2000; **51**: 765-770.
28. Trowsdale J, Kelly A. The Human HLA class II α chain DZ α is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions. *EMBO J* 1985; **4**: 2231-2237.
29. Steimle V, Siegrist C-A, Mottet A, Lisowska-Groszpiere B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994; **265**: 106-109.
30. Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W. Regulation of MHC class II genes: Lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 301-331.
31. Taxman DJ, Cressman DE, Ting JP. Identification of class II transcriptional activator-induced genes by representational difference analysis: discoordinate regulation of the DN alpha/DO beta heterodimer. *J Immunol* 2000; **165**: 1410-1416.
32. Ponzoni M, Guarnaccia F, Corrias MV, Cornaglia-Ferraris P. Uncoordinate induction and differential regulation of HLA class-I and class-II expression by gamma-interferon in differentiating human neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 1993; **55**: 817-823.
33. Nagarajan UM, Lochamy J, Chen X, Beresford GW, Nilsen R, Jensen PE, Boss JM. Class II Transactivator is required for maximal expression of HLA-DOB in B Cells. *J Immunol* 2002; **168**: 1780-1786.
34. DeMars R, Chang CC, Shaw S, Reitnauer PJ, Sondel PM. Homozygous deletions that simultaneously eliminate expression of class I and class II antigens of EBV-transformed B-lymphoblastoid cells. I. Reduced proliferative responses of autologous and allogeneic T cells to mutant

cells that have decreased expression of class II antigens. *Hum Immunol* 1984; **11**: 77-97.

35. Klein G, Sugden B, Leibold W, Menezes J. Infection of EBV-genome-negative and -positive human lymphoblastoid cell lines with biologically different preparations of EBV. *Intervirology* 1974; **3**: 232-244.
36. Menezes J, Leibold W, Klein G, Clements G. Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus (EBV)-negative lymphoblastoid B cell line (BJA-B) from an exceptional, EBV- genome-negative African Burkitt's lymphoma. *Biomedicine* 1975; **22** : 276-284.
37. Chin KC, Li GG, Ting JP. Importance of acidic, proline/serine/threonine-rich, and GTP-binding regions in the major histocompatibility complex class II transactivator: generation of transdominant-negative mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 2501-2506.
38. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973; **52**: 456-467.
39. Brunet A, Samaan A, Deshaies F, Kindt TJ, Thibodeau J. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DO β . *J Biol Chem* 2000; **275**: 37062-37071.
40. Panina-Bordignon P, Fu X, Lanzavecchia A, Karr RW. Identification of HLA-DR α chain residues critical for binding of the toxic shock syndrome toxin superantigen. *J Exp Med* 1992; **176**: 1779-1784.
41. Radka SF, Machamer CE, Cresswell P. Analysis of monoclonal antibodies reactive with human class II beta chains by two-dimensional electrophoresis and western blotting. *Hum Immunol* 1984; **10**: 177-188.
42. Denzin LK, Robbins NF, Carboy-Newcomb C, Cresswell P. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1994; **1**: 595-606.
43. Chong P, Chan N, Kandil A, Tripet B, James O, Yang YP, Shi SP, Klein M. A strategy for rational design of fully synthetic glycopeptide conjugate vaccines. *Infect Immun* 1997; **65**: 4918-4925.
44. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; **256**: 495-497.
45. Lietzke R, Unsicker K. A statistical approach to determine monoclonality after limiting cell plating of a hybridoma clone. *J Immunol Methods* 1985; **76**: 223-228.

46. Lavoie PM, Thibodeau J, Cloutier I, Busch R, Sekaly RP. Selective binding of bacterial toxins to major histocompatibility complex class II-expressing cells is controlled by invariant chain and HLA-DM. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 6892-6897.
47. Thibodeau J, Lavoie PM, Samaan A, Corre JP, Sékaly RP, Cazenave PA. Conserved structural features between HLA-DO β and -DR β . *Mol Immunol* 1998; **35**: 885-893.
48. Samaan A, Thibodeau J, Mahana W, Castellino F, Cazenave PA, Kindt TJ. Cellular distribution of a mixed MHC class II heterodimer between DR α and a chimeric DO β chain. *Int Immunol* 1999; **11**: 99-111.
49. Heilker R, Spiess M, Crottet P. Recognition of sorting signals by clathrin adaptors. *Bioessays* 1999; **21**: 558-567.
50. Roucard C, Thomas C, Pasquier MA, Trowsdale J, Sotto JJ, Neefjes J, van Ham M. In vivo and in vitro modulation of HLA-DM and HLA-DO is induced by B lymphocyte activation. *J Immunol* 2001; **167**: 6849-6858.
51. Chang CH, Guerder S, Hong SC, Van Ewijk W, Flavell RA. Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression. *Immunity* 1996; **4**: 167-178.
52. Masternak K, Muhlethaler-Mottet A, Villard J, Zufferey M, Steimle V, Reith W. CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev* 2000; **14**: 1156-1166.
53. Voliva CF, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. The function of the octamer-binding site in the DRA promoter. *Immunogenetics* 1995; **43**: 20-26.
54. Martin BK, Frelinger JG, Ting JP. Combination gene therapy with CD86 and the MHC class II transactivator in the control of lung tumor growth. *J Immunol* 1999; **162**: 6663-6670.
55. Robadey C, Ammerlaan W, Muller C, Cloutier I, Sékaly RP, Haefliger JA, Demotz S. The processing routes determined by negatively charged residues in DR1-restricted T cell determinants. *J Immunol* 1997; **159**: 3238-3246.

4.8 FIGURES

Figure 4.1. Monoclonal antibody HKC5 is specific for HLA-DO β .

(A) Lysates from HeLa cells transfected with HLA-DO (α and β) and HLA-DM were immunoblotted with HKC5 and compared to lysates from wild-type HeLa cells. HKC5 reacts with a 28 KDa protein corresponding to HLA-DO β in transfected cells. (B) Flow cytometry analysis was performed on permeabilized human 721.45 B cell and mutant derivative 721.61 using HKC5 and Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (solid line). Filled histograms represent the control fluorescence of cells incubated with an irrelevant antibody and Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG. (C) Cells transfected with the DO α and β chains cDNAs were stained as above with HKC5 and analyzed by flow cytometry. Filled histograms represent the staining of control untransfected HeLa cells with HKC5.

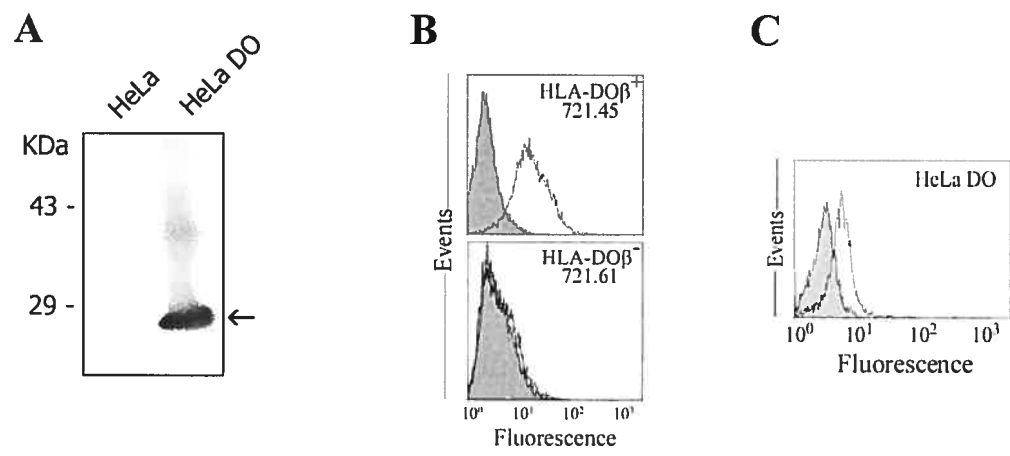


Figure 4.2. HKC5 reacts with HLA-DO in the ER and in the endocytic pathway.

(A) Permeabilized HeLa cells expressing HLA-DO with or without HLA-DM were simultaneously stained intracellularly for DO β with HKC5 and for the endoplasmic reticulum-resident protein Calnexin. Secondary antibody was biotinylated goat anti-mouse followed by Texas Red-coupled streptavidin for HKC5 and Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-rabbit IgG for calnexin. Panels *a*, *b*, and *c* show the staining obtained with HKC5 (*red*), while panels *d*, *e* and *f* show the distribution of calnexin (*green*). Co-localization of the two proteins is shown in *g*, *h*, and *i* (*yellow*). Immunofluorescence was monitored by confocal microscopy.

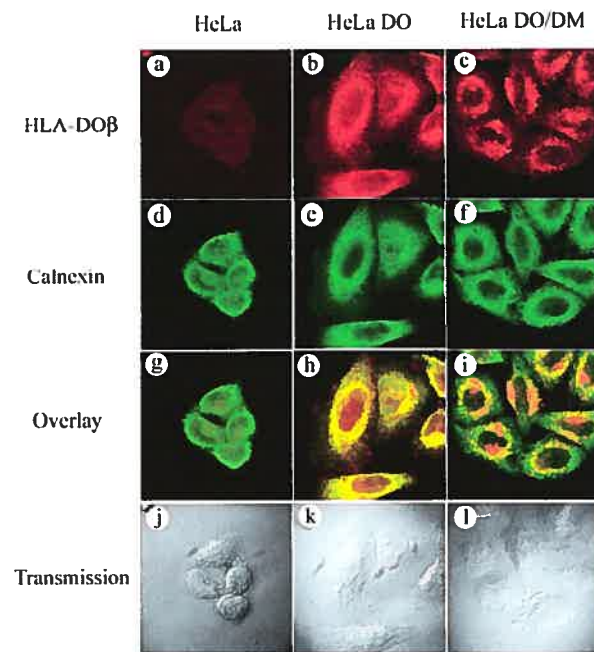


Figure 4.3. HKC5 reacts with the di-leucine motif of HLA-DO β cytoplasmic tail.

(A) Amino acid sequence of the chimeric molecules used in this experiment. The cytoplasmic tail of HLA-DO β was fused to the transmembrane (TM) region of DR β . The asterisk indicates the end of the proteins. (B) Permeabilized HeLa cells expressing the different β chains together with the wild-type or truncated α chain (without its cytoplasmic tail, α TM) (55) were analyzed by flow cytometry using HKC5 or XD5.117 followed by Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (solid line). Filled histograms represent the control fluorescence of cells incubated with an irrelevant antibody and Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG.

A

| | |
|-------------|--|
| | <u>TM</u> ——— Cytoplasmic tail (C-ter) ——— * |
| DR | IYFRNQKGHSGLQPTGFLS |
| DR/DO cyto | IYFRAQKGYVRTQMSGNEVSRVLLPQSC |
| Y227A | IYF-----A----- |
| LL242-243AA | IYF-----AA----- |

B

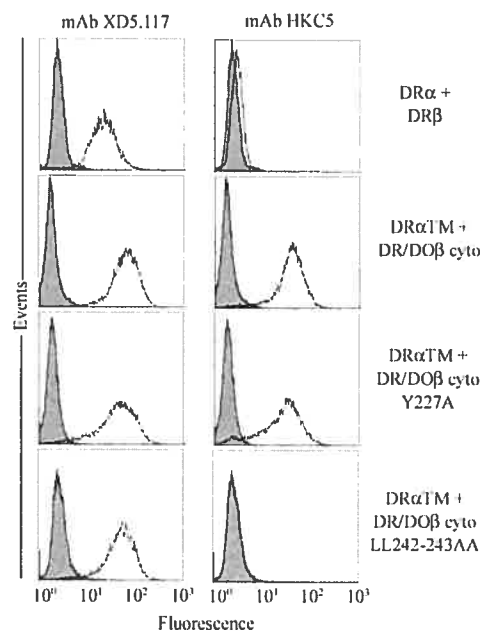


Figure 4.4. Expression of HLA-DO β in B cell lines correlates with high levels of surface CLIP/class II complexes.

(A) BJA-B and Raji cells were stained for cell surface HLA-DR, CLIP/class II complexes and intracellular HLA-DO β using L243, CerCLIP and HKC5, respectively. Secondary antibody was Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse IgG (solid line) in all cases. Filled histograms represent the control fluorescence of cells incubated with an irrelevant antibody and Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse IgG. (B) Cells were permeabilized and simultaneously stained intracellularly for DO β (HKC5) and DM (rabbit antisera against DM β). Secondary antibody was Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse IgG for HKC5 and biotinylated goat anti-rabbit followed by Texas Red-coupled streptavidin for the DM-specific antibody. (C) The mean fluorescence values (MFV) found in panel A were used to calculate the CLIP/DR ratios. MFV obtained with Cer-CLIP was divided by the MFV obtained with L243.

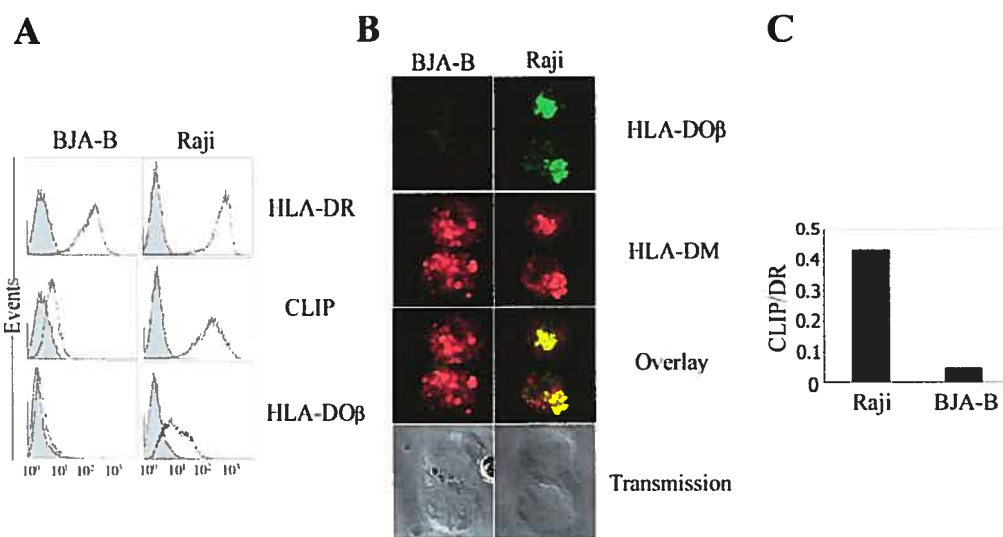


Figure 4.5. CIITA activates DO β gene expression in HeLa cells.

(A) Flow cytometry analysis was performed on HeLa cells transfected or not with CIITA. Cells were stained for surface HLA-DR using L243 or permeabilized and stained for HLA-DO using HKC5, respectively. Secondary antibody was Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse IgG in both cases (solid line). Filled histograms represent the control fluorescence of non-transfected HeLa cells. (B) Cells were analyzed by confocal microscopy after simultaneous staining for DO β (HKC5) and the endoplasmic reticulum-resident protein calnexin. Secondary antibody was Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse IgG for HKC5 (green) and biotinylated goat anti-rabbit followed by Texas Red-coupled streptavidin for anti-calnexin (red).

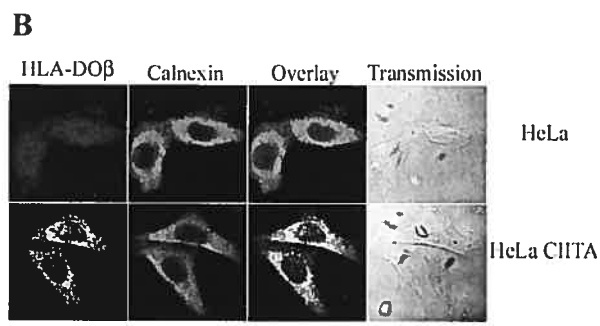
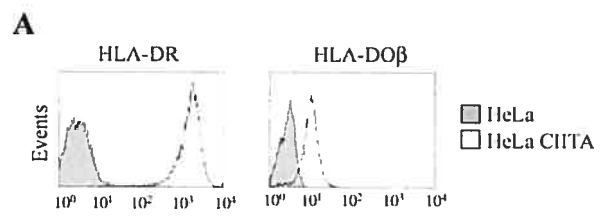
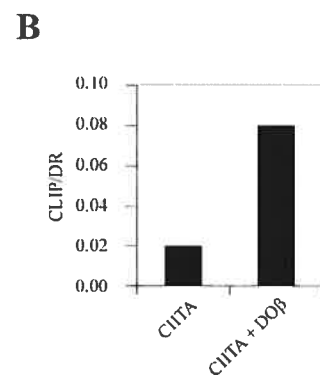
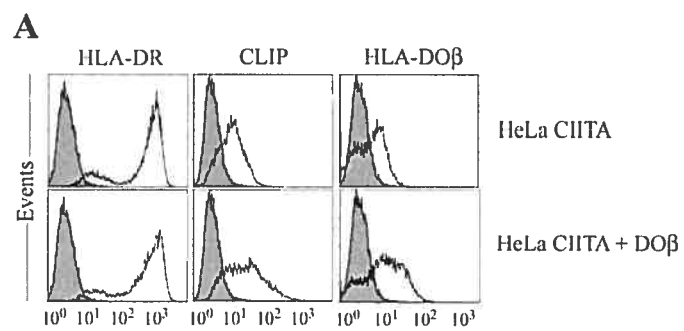


Figure 4.6. Transfection of HLA-DO β in HeLa CIITA cells increases surface expression of CLIP.

(A) HeLa CIITA cells were super-transfected with DO β (HeLa CIITA + DO β) and stained for surface HLA-DR (mAb L243) and CLIP/class II complexes (mAb Cer-CLIP) or for intracellular HLA-DO β (mAb HKC5). Filled histograms represent the control fluorescence of HeLa cells stained with the same antibodies. (B) The mean fluorescence values found in panel A were used to calculate the CLIP/DR ratios as in figure 4.4. The DO β mean fluorescence values for HeLa CIITA and HeLa CIITA+DO β were 8 and 21 , respectively.



CHAPITRE 5- DISCUSSION

L'activation de lymphocytes T CD4⁺ nécessite une présentation d'antigène par les molécules du CMH de classe II. Afin de remplir cette fonction, les molécules de classe II doivent être ciblées vers les compartiments endosomaux pour y fixer un peptide antigénique et ensuite atteindre la surface cellulaire. Les études présentées dans cette thèse ont été entreprises pour mieux comprendre le rôle de deux chaperons qui régulent cette présentation antigénique. Le premier volet avait pour but d'étudier les mécanismes responsables du masquage par les classes II du motif de rétention d'une des isoformes de la chaîne invariante, Iip35. Le second volet consistait à mettre en évidence la présence de molécules HLA-DO au niveau de cellules épithéliales transfectées avec le transactivateur CIITA. Ces deux chaperons, Iip35 et HLA-DO, sont respectivement responsables du transport des molécules de classe II et du contrôle des peptides chargés.

La chaîne invariante est un chaperon qui contribue à maintenir une spécificité des molécules de classe II pour les antigènes des compartiments endosomaux. Dès leur synthèse, les molécules de classe II s'associent à un trimère de chaînes invariantes qui est alors responsable d'empêcher l'agrégation des classe II et de bloquer leurs niches peptidiques. La chaîne invariante sera ensuite responsable du ciblage des complexes nonamériques vers les compartiments endosomaux.

Finalement, la cinétique de relâche du fragment CLIP issu de la chaîne invariante et parfois l'inhibition des protéases par certaines isoformes influencent la liaison des peptides aux classes II.

Plusieurs études ont démontré que la présentation antigénique par les molécules de classe II est également possible en absence de Ii (199). Cependant les données issues des études chez les souris KO pour la chaîne invariante ont clairement mis en évidence le rôle essentiel de ce chaperon au cours de la présentation antigénique (19-21). Au niveau de plusieurs types cellulaires, la forme p35 de Ii représente environ 20% de l'ensemble des molécules de Ii. Bien que celles-ci ne représentent pas la majorité des molécules de Ii, leur capacité de former des trimères avec les autres isoformes permet de retrouver une chaîne Iip35 dans environ 48% des trimères (63;118). Étant donné qu'il a été démontré qu'il suffit d'une chaîne Iip35 dans un trimère pour retenir le complexe en absence de classe II (62;63), on peut donc estimer que la moitié des trimères de chaînes invariantes résideront dans le RE en absence de classe II. Le rôle exact des motifs de rétention dans le RE des isoformes p35 et p43 reste encore inconnu. Cette rétention pourrait entre autre permettre d'augmenter la probabilité d'association entre le trimère de Ii et les molécules de classe II, mais également d'éviter une fusion excessive des compartiments endosomaux par l'intermédiaire des queues cytoplasmiques de Ii (119-122). Les mécanismes responsables de cette rétention ainsi que ceux impliqués dans le masquage du motif de rétention par les classes II sont encore inconnus.

Dans le cadre du premier volet de cette thèse, nous nous sommes penchés sur les mécanismes responsables du masquage du motif de rétention de Iip35 par les molécules de classe II.

5.1 La régulation de la présentation antigénique par Iip35

5.1.1 Rôle des molécules de classe II dans le masquage du motif R-X-R

On sait jusqu'à présent qu'il faut au moins la présence des classe II et une phosphorylation de Ii pour permettre la sortie du complexe nonamérique. Cependant, aucune étude ne s'est penchée sur les éléments requis au niveau des molécules de classe II pour permettre le masquage du motif de rétention de Iip35 et si cet élément se retrouve chez tous les isotypes. Notre première approche a été d'évaluer l'importance des queues cytoplasmiques α et β de la molécule HLA-DR. À l'aide de molécules chimériques tronquées au niveau des domaines cytoplasmiques, nous avons observé une rétention de ces molécules au niveau du RE lorsqu'elles sont exprimées en présence de Iip35 dans des cellules HeLa. Ceci nous a donc permis de démontrer que la région cytoplasmique des molécules HLA-DR contient les éléments requis pour le masquage du motif R-X-R de Iip35. Nous avons ensuite voulu savoir si les deux queues cytoplasmiques α et β étaient nécessaires pour le masquage. Nos résultats ont permis de déterminer que la queue cytoplasmique de la chaîne β

des molécules de classe II est essentielle pour un masquage du motif de rétention de Iip35 tandis que le domaine cytoplasmique de la chaîne α ne l'est pas. Finalement, nous avons démontré que les trois isotypes de classe II (DR, DP et DQ) possèdent la capacité de masquer le motif R-X-R de Iip35 et que la queue cytoplasmique de la chaîne β de ces isotypes est responsable de ce masquage.

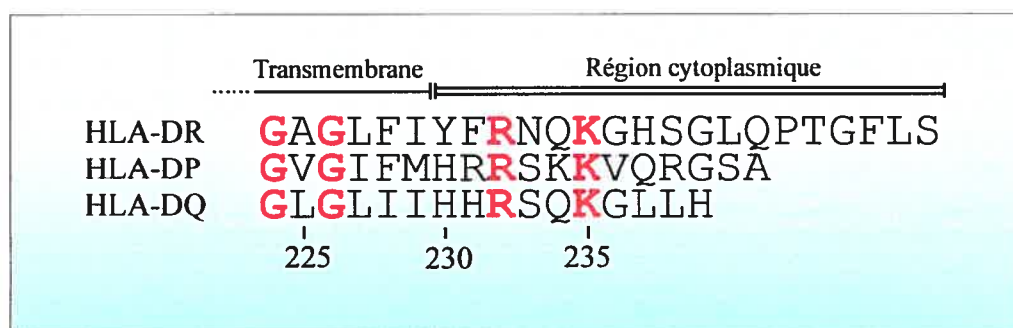


Figure 5.1. Alignement des séquences des trois isotypes de classe II humain.

Les résidus conservés entre les trois isotypes sont indiqués en rouge. La numérotation est basée sur HLA-DR.

Le faible niveau d'homologie entre les trois isotypes au niveau de la région cytoplasmique (Figure 5.1) suggère un mécanisme de masquage de type stérique semblable à celui en jeu lors de l'assemblage de récepteur Fc ϵ (127). Nous avons donc voulu déterminer les éléments nécessaires au niveau de la queue cytoplasmique de la chaîne β pour permettre un masquage du motif R-X-R. À l'aide de plusieurs mutants de cette région nous avons mis en évidence que les résidus 230-232 sont suffisants pour le masquage (Chapitre 3).

Cependant un seul de ces résidus, l'arginine 232, est conservé dans les trois isotypes de classe II humain (DR, DP et DQ). Lorsque cette arginine est mutée au niveau de la queue cytoplasmique de HLA-DR, on observe une diminution importante du niveau de masquage. Ceci suggère donc que l'arginine 232, présente au niveau des trois isotypes de classe II est importante pour le masquage du R-X-R de Iip35. Cependant, le masquage n'est pas complètement aboli par la mutation de l'arginine 232. Ce n'est que lorsque la queue cytoplasmique de la molécule HLA-DR est réduite aux résidus 230 et 231 uniquement, que l'on observe alors une abolition complète du masquage du motif de rétention de Iip35. Par conséquent, on peut en conclure qu'au moins trois acides aminés doivent être présents au niveau cytoplasmique de HLA-DR et que le troisième résidu doit être une arginine pour permettre un masquage total de Iip35. La présence d'un seul résidu arginine au niveau de la queue cytoplasmique ne permet aucun masquage. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires afin de déterminer l'importance de la position de l'arginine au niveau de la queue cytoplasmique. De plus des expériences de mutagenèse de la région cytoplasmique de HLA-DP beta et HLA-DQ beta seront nécessaires afin de confirmer l'importance de cette arginine au niveau de ces isotypes. La présence de deux autres acides aminés chargés positivement en position 230 et 231 pourrait compenser pour la perte de l'arginine. L'importance de la sérine 233 (Figure 5.1) devra également être évaluée au sein de ces deux isotypes. Cette sérine peut-elle être phosphorylée ? Si oui, pourrait-

elle affecter la charge positive de l'arginine 232 et par conséquent la capacité de masquer le motif R-X-R de Iip35 ?

5.1.2 Modèle du mécanisme de rétention et de masquage

Récemment, deux études ont permis de démontrer une association entre les sous-unités du coatomer de COP-I et le motif de rétention de type di-arginine (123;136). De plus, l'association de ces signaux de rétention à une séquence de « relâche » a été proposée pour expliquer le masquage et la sortie du RE des molécules possédant un motif de type R-X-R (123). Ce motif de « relâche » mettrait en jeu la protéine adaptatrice 14-3-3 β . Bien que la sortie du RE n'est jamais été mesurée, les auteurs ont conclu que la fixation de 14-3-3 à la chaîne invariante permettait le masquage du motif R-X-R de rétention de Iip35 et ceci en absence de molécules de classe II. Plusieurs points importants n'ont jamais été mentionnés au niveau de cette étude. Tout d'abord, tel que démontré par plusieurs études, les molécules d'Iip35 ne peuvent pas sortir du RE en absence de classe II (18;62;63;200). De plus, les molécules de chaîne invariante s'assemblent en trimères immédiatement après leur synthèse au niveau du RE. Est-ce que les trois chaînes invariantes du trimère sont liées au même chaperon ? Que se passerait-il si une des chaînes était liée à une molécule de 14-3-3 et les deux autres à β COP ? La trimérisation est-elle essentielle pour une rétention de Ii ? Sachant que les molécules de 14-3-3 sont présentes sous formes dimériques et que la chaîne invariante est trimérique, que ce passe t-il avec les sites de

liaison sur 14-3-3 qui ne sont pas occupés ? Ces sites peuvent-ils fixer d'autres trimères à leurs tours, entraînant la création d'un agrégat de trimères ?

Il est clair que la fixation de 14-3-3 aux molécules de Iip35 ne permet pas la sortie de ces molécules du RE en les libérant de leurs chaperons de rétention. Ce masquage requiert l'interaction des molécules de classe II, plus particulièrement le masquage par la queue cytoplasmique de la chaîne β (18;62;63;200). La molécule 14-3-3 pourrait être nécessaire pour permettre le masquage du motif R-X-R par la queue cytoplasmique de DR β . Cependant cette hypothèse ne peut être retenue car un mutant IiS8D qui ne permet plus la liaison de 14-3-3 est capable de sortir du RE en présence de classe II (201). Malgré le fait que la liaison de 14-3-3 à la chaîne invariante p35 soit dispensable pour une sortie du complexe classe II / Ii, il n'en demeure pas moins que la phosphorylation de la sérine 8 de Iip35 est pour sa part essentielle à ce masquage. Ceci est démontré par la rétention des molécules de classe II, au niveau des cellules HeLa exprimant Iip35S8A.

Malgré ces nombreuses contradictions, nous pouvons retenir qu'une même molécule de chaîne invariante Iip35 ne peut lier simultanément les molécules β -COP et 14-3-3 (123;136).

Quel est alors le rôle des classes II dans ce contexte ? Les molécules de classe II pourraient masquer le motif de rétention de la chaîne invariante Iip35 par deux

mécanismes : 1) Décrocher un chaperon de rétention présent au niveau de la chaîne invariante et/ou 2) Modifier la conformation du domaine cytoplasmique de Iip35 empêchant la fixation d'un chaperon de rétention. Nous pensons que ces deux rôles sont remplis par les molécules de classe II au niveau du réticulum endoplasmique. À la lumière de nos résultats, et en se basant sur les études de O'Kelly et Yuan nous proposons le modèle suivant.

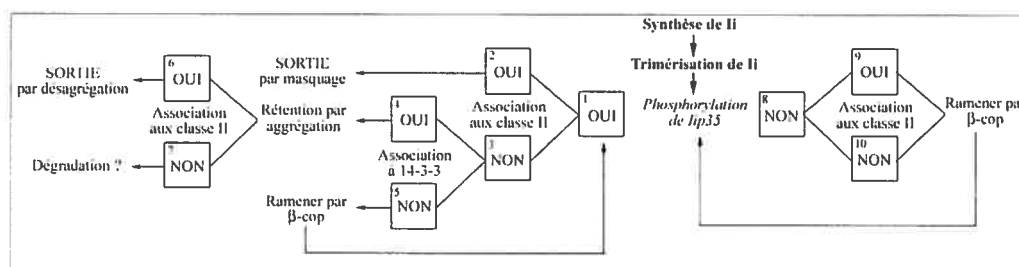


Figure 5.2. Modèle du masquage du motif R-X-R de Iip35.

La rétention de Iip35 par β -COP est possible uniquement dans les deux cas suivants : 1) lorsque la chaîne invariante n'a pas encore été phosphorylée par les PKC (Fig.5.2 boîte 8) ou 2) lorsque les molécules Iip35 phosphorylées n'ont pas encore été reconnues par 14-3-3 (boîte 5). Ceci serait alors en accord avec les résultats de O'Kelly démontrant clairement que la fixation de 14-3-3 et β -COP est mutuellement exclusive. Nous postulons que la fixation des dimères de 14-3-3 aux trimères de chaînes invariantes entraîne l'agrégation de ces complexes au niveau du RE (boîte 4). Cette agrégation pourrait alors expliquer la présence de bandes de très hauts poids moléculaires observés par le groupe de Cresswell (63). Le rôle des molécules de classe II serait donc : 1) d'induire

une désagrégation des complexes par encombrement stérique à l'aide de la queue cytoplasmique de HLA-DR β (boîte 6) et/ou 2) d'empêcher le recrutement de β -COP et 14-3-3 par l'intermédiaire d'un changement de conformation masquant le R-X-R au niveau de la queue cytoplasmique de Iip35 (boîte 2). Ce dernier mécanisme ferait intervenir un pont salin entre l'arginine 232 de HLA-DR β et la sérine 8 de Iip35 modifiant ainsi la conformation de la queue cytoplasmique de Iip35 et empêchant la rétention au niveau du RE. Cette interaction charge-charge est supportée par le fait que la sérine 8 de Iip35 peut être remplacée par une asparagine sans affecter le masquage par les molécules de classe II (201). De plus, une étude récente a démontrée que les motifs R-X-R doivent être à une certaine distance de la membrane pour être fonctionnels (Figure 5.3) (202). Nous avons observé le même phénomène dans le chapitre 3 lorsque la portion p33 est supprimée de Iip35 amenant le R-X-R près de la membrane (Figure 3.6) L'inactivation de ce motif pourrait donc être due à un rapprochement trop près de la membrane lors de l'interaction entre l'arginine 232 de DR et la sérine phosphorylée de Iip35.

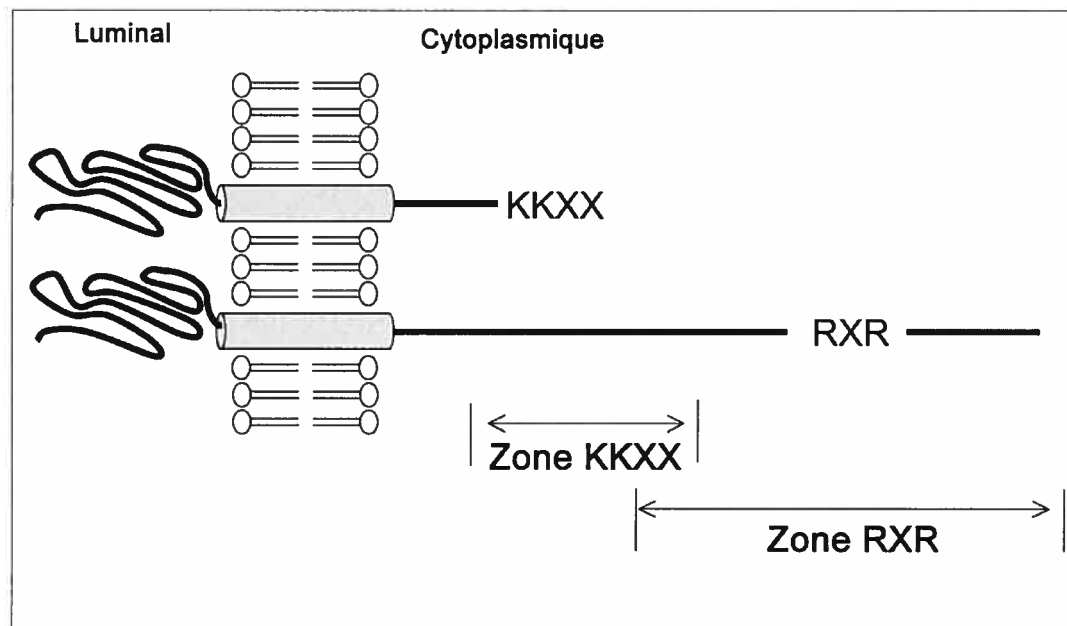


Figure 5.3. Représentation schématique des zones R-X-R et KKXX

(Adapté de Shikano S. et al. PNAS, 2003, vol.100, n.10, 5783-5788) (202)

Ce modèle suppose cependant que la phosphorylation est homogène au niveau d'un trimère de Iip35. Or l'on sait que seulement 50% des molécules Iip35 au sein d'une cellule sont phosphorylées (118). Deux cas de figure se posent alors : tout d'abord, en absence de classe II, les trimères homogènes composés de Iip35 non phosphorylées ou phosphorylées seront respectivement retenus par β COP (boîte 10) ou par l'agrégation engendrée par 14-3-3 (boîte 4). Dans le cas où le trimère est hétérogène, les chaînes invariantes phosphorylées devraient entraîner une agrégation des trimères par l'intermédiaire de 14-3-3 empêchant ainsi la sortie du RE (boîte 4). Étant donné que le complexe n'atteint pas le Golgi, les molécules de Iip35 non phosphorylées au sein du trimère ne rencontreront jamais β COP. Ce modèle permettrait d'expliquer la liaison

mutuellement exclusive observée par O'Kelly (123). Lorsque les molécules de classe II se fixent à un trimère hétérogène, on aurait une désagrégation des trimères de Ii et une sortie du nonamères vers le Golgi. À ce niveau, β COP pourra alors se fixer aux chaînes non phosphorylées et ramener le complexe vers le RE, à moins qu'une seule molécule de 14-3-3 par trimère puisse empêcher la fixation de β COP. Par conséquent, en présence de classe II, la liaison de 14-3-3 et β COP au sein d'un trimère pourrait ne pas être mutuellement exclusive. Plusieurs études supplémentaires sont donc nécessaires afin de valider ce modèle.

5.1.3 La dérégulation de l'expression de Iip35 et les pathologies

Les mécanismes qui contrôlent le niveau d'expression de Iip35 par rapport à celui de Iip33 sont encore inconnus. On sait que la séquence de Kozak du premier codon ATG de la chaîne invariante n'est pas parfaite, ce qui entraîne une préférence pour celui de Iip33 (Figure 5.4). Cependant dans plusieurs cas de leucémies, on observe un débalancement de ces niveaux d'expression, entraînant une surexpression de la forme Iip35. Les causes exactes de cette dérégulation sont encore inconnues tout comme son effet sur la présentation antigénique par les molécules du CMH de classe II. Un niveau surelevé de Iip35 pourrait saturer et/ou ralentir la phosphorylation par les PKC de Iip35 entraînant une rétention des molécules de classe II au niveau du RE. Cette

diminution du niveau de classe II à la surface pourrait être responsable de l'évasion tumorale.

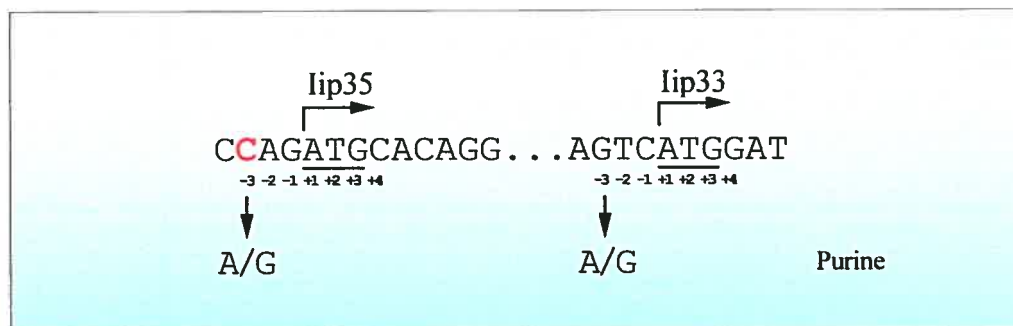


Figure 5.4. Séquence de Kozak des deux codons ATG de Iip35 et Iip33.

Une purine en position -3 est requise pour obtenir une séquence de Kozak optimale. La séquence consensus de Kozak est A/GxxATG. Le codon ATG de Iip35 ne possède pas cette purine mais plutôt une cystéine (représenté en rouge).

Récemment il a été démontré qu'une diminution du niveau d'expression de la forme Iip35 est responsable des défauts de présentation antigénique au niveau des lymphocytes B de jumeaux identiques dont un seul est atteint du diabète de type I (157). Les lymphocytes B du jumeau diabétique expriment un niveau plus élevé de CMH de classe II vides (ou SDS instables) à la surface cellulaire. De plus, les CMH de classe II nouvellement synthétisées atteignent rapidement la surface cellulaire mais y restent beaucoup moins longtemps. Lorsque le niveau de Iip35 est augmenté par transfection, la maturation des classe II et la présentation antigénique est rétablie. Le rôle de Iip35 dans cette dérégulation de la présentation antigénique reste encore nébuleux. Les auteurs suggèrent qu'en présence de Iip35, les complexes nonamériques sont maintenus plus longtemps

dans le RE ce qui permet une meilleure maturation des molécules de classe II (105). Les mécanismes responsables de cette baisse de Iip35 au niveau des lymphocytes B de ce patient sont encore inconnus et démontrent l'importance d'élucider les mécanismes de régulation de cette traduction alternative de l'ARNm.

La possibilité d'utiliser deux codons, dans un même cadre de lecture, lors de la traduction n'est pas unique à la chaîne invariante. C'est le cas d'une multitude de facteurs de transcription et d'oncogènes, comme par exemple le proto-oncogène *c-Myc*. La protéine *c-Myc* fait partie de la famille des proto-oncogènes *myc* qui possède un rôle crucial dans le contrôle de la croissance cellulaire et de la différenciation (203). Cette fonction est dramatiquement illustrée par la panoplie de tumeurs engendrées par une altération des gènes *myc* (204). Chez toutes les espèces de vertébrés, on retrouve deux principales formes de la protéine, *c-Myc 1* et *c-Myc 2* (205). Ces deux formes sont issues d'une initiation de la traduction au niveau de deux codons sur le même transcrit d'ARNm. Dans les cellules du lymphome de Burkitt, on observe une perte d'expression de *c-Myc 1* qui est due à un réarrangement du locus *c-Myc* ou une mutation ponctuelle (205). De plus, l'utilisation alternative de ces deux codons est régulée lors de la croissance cellulaire. La forme *c-Myc 2* est prédominante au niveau des cellules en division, tandis que la forme *c-Myc 1*, issue du codon en amont, n'est exprimée que lorsque les cellules arrêtent de se diviser (206;207). Finalement la présence de deux autres codons AUG en aval permet

de synthétiser les protéines c-Myc S qui sont responsables de l'inhibition de l'activité transactivatrice des protéines c-Myc (208).

Tout comme dans le cas de la chaîne invariante, un débalancement des niveaux d'expression de ces isoformes conduit à des effets néfastes. Il serait intéressant d'évaluer la régulation du niveau d'expression de Iip35 par rapport à l'isoforme p33 et ce en fonction de la division cellulaire. Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de la traduction alternative de la chaîne invariante permettrait l'élaboration de nouvelles stratégies pour contrôler le niveau d'expression de chaque isoforme.

5.1.4 Perspectives sur le rôle de Iip35 en association avec CD1d

Il a été démontré récemment que la chaîne invariante s'associe également avec CD1d et régule son ciblage vers les compartiments endosomaux (209). Le locus CD1 humain comporte 5 gènes (A à E), dont 4 produits ont été identifiés, CD1a-CD1d. Les molécules CD1 sont structurellement homologues des molécules du CMH de classe I (3 domaines, association à la β 2 microglobuline) mais avec une fente de liaison plus haute et plus étroite, très hydrophobe et fonctionnent de façon mixte en se chargeant de molécules lipidiques d'origine endogènes (par exemple ancrés glyco-phosphatidy-linositol) mais également exogènes dans différents compartiments endosomaux grâce à une endocytose

permanente de la surface vers ces compartiments internes (CD1a dans les endosomes précoces, CD1b et d dans les compartiments MIIC et lysosomal tardif) (210). La molécule CD1d est présente sur les monocytes, macrophages, les cellules épithéliales intestinales, les hépatocytes et faiblement sur les DC (211-213). La physiologie des lymphocytes T restreints par CD1 est encore mal connue. Ils peuvent être CD8⁺, CD4⁺ mais également CD4⁻CD8⁻. Il existe des lymphocytes T capables de reconnaître des antigènes microbiens lipidiques, particulièrement ceux des mycobactéries riches en lipides (acides mycoliques libres ou mycolates estérifiés par des sucres, lipoarabinomannanes). Dans le cas de CD1d, une population de lymphocytes T dénommés NKT, car fréquemment porteurs de marqueurs des cellules NK, a été identifiée (214-217). La plupart de ces cellules possèdent un répertoire de reconnaissance antigénique très restreint avec une chaîne α constitué d'un seul réarrangement VJ (V α 24J α 18). Il serait intéressant d'évaluer la capacité de CD1d à masquer le motif de rétention de la chaîne invariante Iip35 étant donné la présence d'une seule queue cytoplasmique due à l'association à la β 2 microglobuline. La présence de plusieurs charges positives au niveau de la queue cytoplasmique pourrait permettre le masquage du R-X-R de Iip35. Dans le cas contraire, une dérégulation du niveau de Iip35 entraînerait-elle un défaut de présentation antigénique par les molécules CD1d ou affecterait-elle la reconnaissance par les T CD1-restreint ?

5.1.5 Iip35 et la maturation des lymphocytes B

Plusieurs études ont démontré un rôle important de la chaîne invariante dans la maturation des lymphocytes B chez des souris déficientes en Ii (43;112-114;218;219). La maturation des lymphocytes B est une étape essentielle pour leur permettre de participer à la réponse immunitaire. La queue cytoplasmique de la chaîne invariante est responsable de cette maturation (114). En effet, il a été démontré qu'au niveau de cellules 293 transfectées, mais également dans des cellules B primaires, la portion cytoplasmique de Ii est libérée dans le cytoplasme par un clivage au niveau des résidus 42-44 de la région transmembranaire. Ce clivage est essentiel pour permettre l'activation de NF- κ B et la différenciation des lymphocytes B (113). Cette maturation des lymphocytes B a uniquement été étudiée chez la souris pour l'instant, et par conséquent en absence de Iip35. Est-ce que la queue cytoplasmique de Iip35 est capable de soutenir la maturation des lymphocytes B ? De plus, un des rôles des molécules 14-3-3 est de contrôler la localisation cellulaire de certaines protéines. Deux rôles opposés sont notamment attribuables à 14-3-3 selon la protéine cible. Elle possède la capacité de favoriser le ciblage d'une protéine vers le noyau (ex : la sous-unité catalytique de la télomérase (150)) mais également d'empêcher la localisation nucléaire de certaines protéines (telle la protéine pro-apoptotique BAD (150)). La forme Iip35 pourrait-elle engendrer une maturation plus rapide et/ou plus efficace des lymphocytes B ? Cette activation est-elle favorisée ou inhibée par la liaison de 14-3-3 ? Bien que

l'activation des lymphocytes B par la queue cytoplasmique de Ii ne semble pas être due à une relocalisation de Ii vers le noyau (112;113) ceci pourrait être différent pour Iip35 en présence de 14-3-3.

5.2 La régulation de la présentation antigénique par HLA-DO

Les lymphocytes B possèdent à la surface cellulaire des récepteurs Ig spécifiques pour un antigène donné. Lorsque ce récepteur reconnaît son ligand, il est internalisé entraînant alors la dégradation de l'antigène et sa présentation par les CMH de classe II. L'activation des lymphocytes B matures, conduisant à la production d'anticorps, nécessite une interaction avec des lymphocytes T spécifiques pour un antigène peptidique donné et présenté dans le contexte d'une molécule de CMH de classe II. Afin de réduire les interactions non spécifiques entre les lymphocytes T et B, ces derniers expriment la molécule non classique HLA-DO. Cette molécule régulatrice inhibe l'activité de HLA-DM au niveau des endosomes précoces et par conséquent prévient la présentation des antigènes internalisés par pinocytose. Ce rôle critique de HLA-DO sur le répertoire peptidique des molécules de classe II classiques suggère qu'une dérégulation du niveau d'expression de HLA-DO pourrait entraîner la présentation d'auto-antigènes cryptiques et par conséquent jouer un rôle dans des pathologies telles que l'auto-immunité. Il est par conséquent crucial de pouvoir mesurer les niveaux d'expressions de HLA-DO au niveau cellulaire dans l'espoir de comprendre les mécanismes de régulation de cette molécule.

Le second volet de ce travail avait donc pour but de mettre au point un nouvel outil permettant la détection des molécules HLA-DO β . Cet outil nous a alors permis de mieux comprendre les mécanismes de régulation de HLA-DO β en mettant en évidence que le transactivateur CIITA est capable d'induire une expression de HLA-DO β dans des cellules transfectées autres que les lymphocytes B.

5.2.1 Un nouvel outil pour la détection de HLA-DO β

Nous avons développé un anticorps monoclonal, HKC5, reconnaissant spécifiquement la queue cytoplasmique de la molécule HLA-DO β (Chapitre 4). Nos résultats ont permis de déterminer qu'une des leucines, ou les deux, du motif LL de ciblage vers les endosomes de HLA-DO fait partie de l'épitope reconnu par HKC5. Cet anticorps nous a permis de caractériser le niveau d'expression de HLA-DO dans des lignées cellulaires, des lymphocytes B primaires ainsi que des tumeurs. Nous avons entre autre comparer le niveau d'expression de HLA-DO β dans deux lignées cellulaires issues d'un lymphome de Burkitt (RaJi et BJA-B). Nos résultats ont permis d'observer une corrélation directe entre le niveau d'expression de HLA-DO β et la présence de CLIP à la surface cellulaire. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par le groupe de Roucard et al. (220). La différence d'expression entre ces deux lignées reflète probablement un état d'activation ou de maturation différent. En effet, les travaux de Jensen montrent que HLA-DO serait exprimé uniquement au

niveau des lymphocytes B matures tandis que HLA-DR et HLA-DM sont exprimés dès le stade pro-B (221).

5.2.2 La régulation de HLA-DO β

L'expression des molécules de classe II est contrôlée au niveau génétique par les séquences conservées X (aussi appelé S ou Z), X (X1 et X2) et Y de leur promoteur (222) (Figure 5.5). Dans le cas de DR α , un motif OCT est également en jeu (223). Le transactivateur des molécules de classe II (CIITA) est le principal régulateur de l'expression constitutive (224) et induite par l'IFN- γ (225;226) des molécules de classe II. La présence de CIITA est à la fois nécessaire et suffisante pour induire l'expression des gènes codant pour les molécules de classe II (227;228). La molécule CIITA ne se fixe pas directement à l'ADN, mais interagit plutôt avec des facteurs de transcription tel que NF-Y, NF-YC, RFXJ, RFXANK, CREB-1, p-TEFb, BP, PCF et TFIID (222). Ces interactions supportent un modèle où CIITA serait nécessaire à la formation d'un « Transcriptosome » formant un pont entre « l'enhanceosome » et la machinerie de transcription par ces multiples associations (229;230).

Contrairement aux autres gènes codant pour les molécules de classe II, le promoteur du gène de HLA-DO β est activé exclusivement au niveau des lymphocytes B et des cellules épithéliales du thymus malgré la présence des motifs W, X et Y ainsi qu'un motif OCT (221;231). L'expression de HLA-DO β a été caractérisée comme étant indépendante de CIITA étant donné sa présence

au niveau d'une lignée B déficiente en CIITA (RJ2.2.5) (195). Par contre il a également été démontré que la molécule CIITA s'associe avec le promoteur du gène de HLA-DO β *in vivo* suggérant que CIITA serait impliqué dans la régulation de ce gène. Le rôle exact de CIITA dans le contrôle de l'expression de HLA-DO β reste donc controversé.

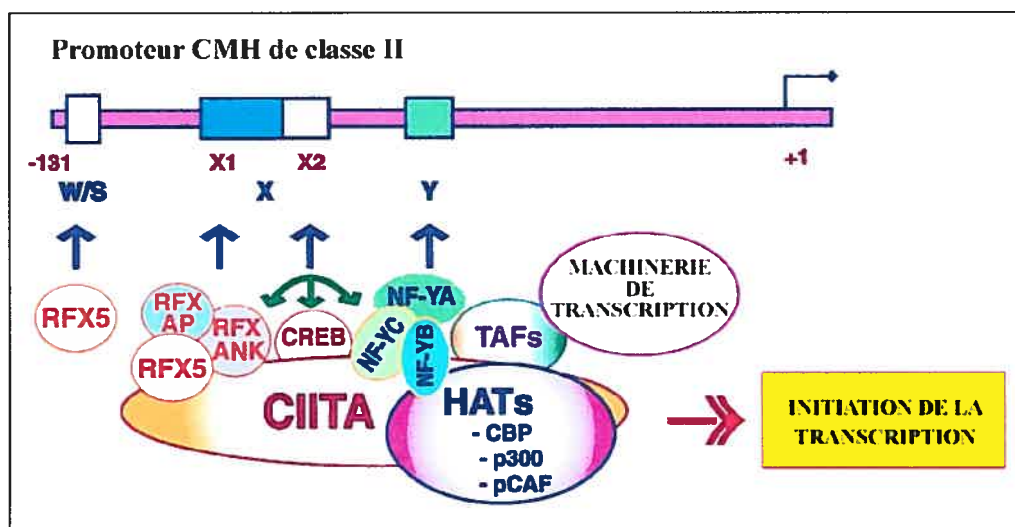


Figure 5.5. Représentation schématique du promoteur des CMH de classe II et du « transcriptosome ».

Le promoteur des CMH de classe II, les facteurs de liaison à l'ADN ainsi que le transactivateur CIITA sont représentés.

(Adapté de Ting, JP et al. *Cell*, 2002, 109, S21-S33) (222)

Lors de la caractérisation de l'anticorps HKC5, nous avons observé une expression de HLA-DO β au niveau des cellules HeLa transfectées avec la molécule CIITA. Cette expression n'est cependant pas du même ordre de grandeur que celle des gènes de classe II ou de la chaîne invariante. Récemment

le groupe de Nagarajan *et al.* a démontré que la présence de CIITA entraîne une augmentation de l'expression de HLA-DO β au niveau des lymphocytes B et postule qu'il existe un facteur de transcription spécifique aux cellules B (197). Nos résultats sont en désaccord avec cette hypothèse. Nous pensons plutôt que la molécule CIITA ainsi que ce facteur de transcription spécifique aux cellules B peuvent agir indépendamment pour induire l'expression de HLA-DO β . Par contre la présence des deux facteurs au sein des lymphocytes B est responsable d'un effet synergique responsable du niveau d'expression élevé observé dans les lymphocytes B. La nature de ce facteur de transcription est encore inconnue. Nous espérons pouvoir l'identifier à l'aide de l'anticorps HKC5 et d'une banque de cDNA de lymphocyte B transfectées dans des cellules HeLa.

L'expression de HLA-DO β que nous observons au niveau des cellules HeLa transfectées avec CIITA est probablement due à une saturation en CIITA au niveau des cellules. Tel que proposé récemment, CIITA aurait une faible affinité pour le promoteur de HLA-DO β qui pourrait être compensé par une surexpression du transactivateur (232). Ceci pourrait être dû à la différence d'espacement entre les motifs X2 et Y ou par la présence du motif OCT dans la région du promoteur de HLA-DO β . L'expression de HLA-DO β est donc possible dans la majorité des types cellulaires à condition que le niveau de CIITA soit suffisamment élevé. Par conséquent, le niveau de CIITA exprimé par une cellule pourrait directement modifier le répertoire peptidique présenté par les molécules de classe II. Cette notion est notamment importante à

considérer lors de l'élaboration de thérapies géniques visant à augmenter le niveau d'expression de CIITA chez certains patients cancéreux ou atteints du « Bare Lymphocyte Syndrome » (233).

CHAPITRE 6-CONCLUSION

La présentation antigénique par les molécules de classe II joue un rôle clef dans la défense immunitaire contre les pathogènes. La chaîne invariante et la molécule HLA-DO possèdent respectivement la capacité de réguler le niveau de classe II à la surface et le répertoire de peptides présentés par ces molécules. Ces deux protéines doivent être hautement régulées pour permettre une réponse immunitaire efficace allant de la sélection des lymphocytes T CD4⁺ dans le thymus, à l'activation de ces cellules en périphérie. La phosphorylation de Iip35, son association à β -COP et 14-3-3 ainsi que la rétention des trimères dans le RE en attendant la fixation des molécules de classe II sont des événements cruciaux pour une présentation antigénique efficace. Ils permettent de s'assurer que les molécules de classe II s'associent à des trimères de chaîne invariante dans le RE et que ces complexes nonamériques soient ciblés vers les compartiments endosomaux. Nos résultats ont permis de mieux comprendre les mécanismes de masquage du motif de rétention de Iip35 et ont permis d'ouvrir la voie à une panoplie d'étude ciblant le rôle des chaperons β -COP et 14-3-3. Dans le second volet de cette étude, nous avons déterminé que l'expression de la protéine HLA-DO β est induite par le transactivateur CIITA ce qui entraîne la formation de molécules HLA-DO fonctionnelles. La production de HLA-DO n'est donc pas restreinte aux lymphocytes B et doit donc être considérée lors des thérapies géniques visant à augmenter le niveau de classe II par l'expression

de CIITA. Une meilleure compréhension de cette voie de présentation antigénique est donc cruciale pour améliorer les vaccins et le traitement des maladies, mais également pour comprendre la progression des infections, cancers et maladies autoimmunes.

CHAPITRE 7-BIBLIOGRAPHIE

- 1 Klein, J. and Sato, A. 2000. The HLA system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343:702-709.
- 2 Delves, P. J. and Roitt, I. M. 2000. The immune system. First of two parts. *N.Engl.J Med.* 343:37-49.
- 3 Crump, A. L., Grusby, M. J., Glimcher, L. H., and Cantor, H. 1993. Thymocyte development in major histocompatibility complex-deficient mice: evidence for stochastic commitment to the CD4 and CD8 lineages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:10739-10743.
- 4 Cosgrove, D., Gray, D., Dierich, A., Kaufman, J., Lemeur, M., Benoist, C., and Mathis, D. 1991. Mice lacking MHC class II molecules. *Cell* 66:1051-1066.
- 5 Grusby, M. J., Johnson, R. S., Papaionnou, V. E., and Glimcher, L. H. 1991. Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Science* 253:1417-1420.
- 6 Grusby, M. J. and Glimcher, L. H. 1995. Immune responses in MHC class II-deficient mice. *Annu.Rev.Immunol.* 13:417-435.
- 7 Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. 1974. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 251:547-548.
- 8 Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39.
- 9 Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215-221.
- 10 Ghosh, P., Amaya, M., Mellins, E., and Wiley, D. C. 1995. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378:457-462.

- 11 Dessen, A., Lawrence, C. M., Cupo, S., Zaller, D. M., and Wiley, D. C. 1997. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity* 7:473-481.
- 12 Smith, K. J., Pyrdol, J., Gauthier, L., Wiley, D. C., and Wucherpfennig, K. W. 1998. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA*0101, DRB1*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J Exp.Med.* 188:1511-1520.
- 13 Fremont, D. H., Hendrickson, W. A., Marrack, P., and Kappler, J. 1996. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 272:1001-1004.
- 14 Fremont, D. H., Crawford, F., Marrack, P., Hendrickson, W. A., and Kappler, J. 1998. Crystal structure of mouse H2-M. *Immunity* 9:385-393.
- 15 Scott, C. A., Garcia, K. C., Stura, E. A., Peterson, P. A., Wilson, I. A., and Teyton, L. 1998. Engineering protein for X-ray crystallography: the murine Major Histocompatibility Complex class II molecule I-Ad. *Protein Sci.* 7:413-418.
- 16 Cresswell, P. 1992. Chemistry and functional role of the invariant chain. *Curr.Opin.Immunol.* 4:87-92.
- 17 Cresswell, P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84:505-507.
- 18 Roche, P. A., Marks, M. S., and Cresswell, P. 1991. Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein. *Nature* 354:392-394.
- 19 Bikoff, E. K., Huang, L.-Y., Episkopou, V., van Meerwijk, J., Germain, R. N., and Robertson, E. J. 1993. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J.Exp.Med.* 177:1699-1712.
- 20 Elliott, E. A., Drake, J. R., Amigorena, S., Elsemore, J., Webster, P., Mellman, I., and Flavell, R. A. 1994. The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J.Exp.Med.* 179:681-694.
- 21 Viville, S., Neeffjes, J. J., Lotteau, V., Dierich, A., Lemeur, M., Ploegh, H., Benoist, C., and Mathis, D. 1993. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72:635-648.

- 22 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. *J. Cell Biol.* 126:317-330.
- 23 Pieters, J., Bakke, O., and Dobberstein, B. 1993. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J. Cell. Sci.* 106:831-846.
- 24 Roche, P. A., Teletski, C. L., Karp, D. R., Pinet, V., Bakke, O., and Long, E. O. 1992. Stable surface expression of invariant chain prevents peptide presentation by HLA-DR. *EMBO J.* 11:2841-2847.
- 25 Teyton, L., O'Sullivan, D., Dickson, P. W., Lotteau, V., Sette, A., Fink, P., and Peterson, P. A. 1990. Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 348:39-44.
- 26 Sette, A., Southwood, S., Miller, J., and Appella, E. 1995. Binding of major histocompatibility complex class II to the invariant chain-derived peptide, CLIP, is regulated by allelic polymorphism in class II. *J. Exp. Med.* 181:677-683.
- 27 Roche, P. A. and Cresswell, P. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345:615-618.
- 28 Maric, M. A., Taylor, M. D., and Blum, J. S. 1994. Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91:2171-2175.
- 29 Roche, P. A. and Cresswell, P. 1991. Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3150-3154.
- 30 Nakagawa, T. Y. and Rudensky, A. Y. 1999. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol. Rev.* 172:121-129.
- 31 Riese, R. J., Wolf, P. R., Bromme, D., Natkin, L. R., Villadangos, J. A., Ploegh, H. L., and Chapman, H. A. 1996. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4:357-366.

- 32 Shi, G. P., Villadangos, J. A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K. J., Riese, R., Ploegh, H. L., and Chapman, H. A. 1999. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 10:197-206.
- 33 Riese, R. J., Mitchell, R. N., Villadangos, J. A., Shi, G. P., Palmer, J. T., Karp, E. R., De Sanctis, G. T., Ploegh, H. L., and Chapman, H. A. 1998. Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin. Invest* 101:2351-2363.
- 34 Kropshofer, H., Vogt, A. B., and Hammerling, G. J. 1995. Structural features of the invariant chain fragment CLIP controlling rapid release from HLA-DR molecules and inhibition of peptide binding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:8313-8317.
- 35 Morris, P., Shaman, J., Attaya, M., Amaya, M., Goodman, S., Bergman, C., Monaco, J. J., and Mellins, E. 1994. An essential role for the HLA-DM in antigen presentation by MHC class II major histocompatibility molecules. *Nature* 368:551-554.
- 36 Denzin, L. K., Sant'Angelo, D. B., Hammond, C., Surman, M. J., and Cresswell, P. 1997. Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 278:106-109.
- 37 Mosyak, L., Zaller, D. M., and Wiley, D. C. 1998. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* 9:377-383.
- 38 Pierre, P., Denzin, L. K., Hammond, C., Drake, J. R., Amigorena, S., Cresswell, P., and Mellman, I. 1996. HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. *Immunity* 4:229-239.
- 39 Brooks, A. G., Campbell, P. L., Reynolds, P., Gautam, A. M., and McCluskey, J. 1994. Antigen presentation and assembly by mouse I-A^k class II molecules in human APC containing deleted or mutated *HLA DM* genes. *J.Immunol.* 153:5382-5392.
- 40 Stebbins, C. C., Loss, G. E., Jr., Elias, C. G., Chervonsky, A., and Sant, A. J. 1995. The requirement for DM in class II-restricted antigen presentation and SDS-stable dimer formation is allele and species dependent. *J.Exp.Med.* 181:223-234.
- 41 Kropshofer, H., Hammerling, G. J., and Vogt, A. B. 1997. How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: survival of the fittest? *Immunol.Today* 18:77-82.

- 42 Kropshofer, H., Vogt, A. B., Moldenhauer, G., Hammer, J., Blum, J. S., and Hammerling, G. J. 1996. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J.* 15:6144-6154.
- 43 Matza, D., Kerem, A., and Shachar, I. 2003. Invariant chain, a chain of command. *Trends Immunol* 24:264-268.
- 44 Castellino, F., Zhong, G. M., and Germain, R. N. 1997. Antigen presentation by MHC class II molecules: Invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum.Immunol.* 54:159-169.
- 45 Pieters, J., Horstmann, H., Bakke, O., Griffiths, G., and Lipp, J. 1991. Intracellular transport and localization of major histocompatibility complex class II molecules and associated invariant chain. *J.Cell Biol.* 115:1213-1223.
- 46 Neefjes, J. 1999. CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading. *Eur.J Immunol* 29:1421-1425.
- 47 Amigorena, S., Drake, J. R., Webster, P., and Mellman, I. 1994. Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 369:113-120.
- 48 Tulp, A., Verwoerd, D., Dobberstein, B., Ploegh, H. L., and Pieters, J. 1994. Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature* 369:120-147.
- 49 Castellino, F. and Germain, R. N. 1995. Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity* 2:73-88.
- 50 Romagnoli, P., Layet, C., Yewdell, J., Bakke, O., and Germain, R. N. 1993. Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *J.Exp.Med.* 177:583-596.
- 51 Runnels, H. A., Weber, D. A., Moore, J. C., Westerman, L. E., and Jensen, P. E. 1997. Intact proteins can bind to class II histocompatibility molecules with high affinity. *Molec.Immunol.* 34:471-480.
- 52 Deng, H., Apple, R., Clare-Salzler, M., Trembleau, S., Mathis, D., Adorini, L., and Sercarz, E. 1993. Determinant capture as a possible mechanism of protection afforded by major histocompatibility complex class II molecules in autoimmune disease. *J Exp.Med.* 178:1675-1680.

- 53 Castellino, F., Zappacosta, F., Coligan, J. E., and Germain, R. N. 1998. Large protein fragments as substrates for endocytic antigen capture by MHC class II molecules. *J.Immunol.* 161:4048-4057.
- 54 Delvig, A. A. and Robinson, J. H. 1998. Two T cell epitopes from the M5 protein of viable *Streptococcus pyogenes* engage different pathways of bacterial antigen processing in mouse macrophages. *J.Immunol.* 160:5267-5272.
- 55 Momburg, F., Fuchs, S., Drexler, J., Busch, R., Post, M., Hammerling, G. J., and Adorini, L. 1993. Epitope-specific enhancement of antigen presentation by invariant chain. *J.Exp.Med.* 178:1453-1458.
- 56 Pieters, J. 1997. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr.Opin.Immunol.* 9:89-96.
- 57 Machamer, C. E. and Cresswell, P. 1982. Biosynthesis and glycosylation of the invariant chain associated with HLA-DR antigens. *J.Immunol.* 129:2564-2569.
- 58 Sung, E. and Jones, P. P. 1981. The invariant chain of murine Ia antigens: its glycosylation, abundance and subcellular localization. *Mol.Immunol.* 18:899-913.
- 59 Swiedler, S. J., Hart, G. W., and Freed, J. H. 1983. Characterization of the oligosaccharides from the invariant chain associated with murine Ia antigens. *J.Immunol.* 131:352-358.
- 60 O'Sullivan, D. M., Noonan, D., and Quaranta, V. 1987. Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternative splicing and alternate initiation of transcription/translation. *J.Exp.Med.* 166:444-450.
- 61 Strubin, M., Berte, C., and Mach, B. 1986. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* 5:3485-3488.
- 62 Lamb, C. A. and Cresswell, P. 1992. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J.Immunol.* 148:3478-3482.
- 63 Marks, M. S., Blum, J. S., and Cresswell, P. 1990. Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J.Cell Biol.* 111:839-855.

- 64 Arunachalam, B., Lamb, C. A., and Cresswell, P. 1994. Transport properties of free and MHC class II associated oligomers containing different isoforms of human invariant chain. *Int.Immunol.* 6:439-451.
- 65 Bijlmakers, M. E., Benaroch, P., and Ploegh, H. L. 1994. Mapping functional regions in the luminal domain of the class II-associated invariant chain. *J.Exp.Med.* 180:623-629.
- 66 Gedde-Dahl, M., Freisewinkel, I., Staschewski, M., Schenck, K., Koch, N., and Bakke, O. 1997. Exon 6 is essential for invariant chain trimerization and induction of large endosomal structures. *J.Biol.Chem.* 272:8281-8287.
- 67 Jasanoff, A., Park, S. J., and Wiley, D. C. 1995. Direct observation of disordered regions in the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92:9900-9904.
- 68 Jasanoff, A., Wagner, G., and Wiley, D. C. 1998. Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii. *EMBO J.* 17:6812-6818.
- 69 Park, S. J., Sadegh-Nasseri, S., and Wiley, D. C. 1995. Invariant chain made in *Escherichia coli* has an exposed N- terminal segment that blocks antigen binding to HLA-DR1 and a trimeric C-terminal segment that binds empty HLA-DR1. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92:11289-11293.
- 70 Newcomb, J. R., Carboy-Newcomb, C., and Cresswell, P. 1996. Trimeric interactions of the invariant chain and its association with major histocompatibility complex class II alpha beta dimers. *J.Biol.Chem.* 271:24249-24256.
- 71 Ashman, J. B. and Miller, J. 1999. A role for the transmembrane domain in the trimerization of the MHC class II-associated invariant chain. *J.Immunol.* 163:2704-2712.
- 72 Motta, A., Amodeo, P., Fucile, P., Castiglione Morelli, M., Bremnes, B., and Bakke, O. 1997. A new triple-stranded α -helical bundel in solution: the assembling of the cytosolic tail of MHC associated invariant chain. *Structure* 5:1453-1464.
- 73 Sant, A. J., Cullen, S. E., and Schwartz, B. D. 1985. Biosynthetic relationships of the chondroitin sulfate proteoglycan with Ia and invariant chain glycoproteins. *J.Immunol.* 135:416-422.

- 74 Sant, A. J., Cullen, S. E., Giacoletto, K. S., and Schwartz, B. D. 1985. Invariant chain is the core protein of the Ia-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *J Exp.Med.* 162:1916-1934.
- 75 Naujokas, M. F., Morin, M., Anderson, M. S., Peterson, M., and Miller, J. 1993. The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell* 74:257-268.
- 76 Simonis, S. and Cullen, S. E. 1986. Fatty acylation of murine Ia alpha, beta, and invariant chains. *J.Immunol.* 136:2962-2967.
- 77 Kukol, A., Torres, J., and Arkin, I. T. 2002. A structure for the trimeric MHC class II-associated invariant chain transmembrane domain. *J Mol.Biol.* 320:1109-1117.
- 78 Roche, P. A., Marks, M. S., and Cresswell, P. 1991. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354:392-394.
- 79 Glimcher, L. H., Polla, B. S., Poljak, A., Morton, C. C., and McKean, D. J. 1987. Murine class II (Ia) molecules associate with human invariant chain. *J.Immunol.* 138:1519-1523.
- 80 Riberdy, J. M. and Cresswell, P. 1992. The antigen-processing mutant T2 suggest a role for MHC-linked genes in class II antigen presentation. *J.Immunol.* 148:2586-2590.
- 81 Marks, M. S. and Cresswell, P. 1986. Invariant chain associates with HLA class II antigens via its extracytoplasmic region. *J.Immunol.* 136:2519-2525.
- 82 Jasanoff, A., Song, S., Dinner, A. R., Wagner, G., and Wiley, D. C. 1999. One of two unstructured domains of Ii becomes ordered in complexes with MHC class II molecules. *Immunity.* 10:761-768.
- 83 Bijlmakers, M.-J. E., Benaroch, P., and Ploegh, H. L. 1994. Assembly of HLA DR1 molecules translated *in vitro*: Binding of peptide in the endoplasmic reticulum precludes association with invariant chain. *EMBO J.* 13:2699-2707.
- 84 Freisewinkel, I. M., Schenck, K., and Koch, N. 1993. The segment of invariant chain that is critical for association with major histocompatibility complex class II molecules contains the sequence of a peptide eluted from class II polypeptides. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:9703-9706.

- 85 Bodmer, H., Viville, S., Benoist, C., and Mathis, D. 1994. Diversity of endogenous epitopes bound to MHC class II molecules limited by invariant chain. *Science* 263:1284-1286.
- 86 Busch, R., Vturina, I. Y., Drexler, J., Momburg, F., and Hammerling, G. J. 1995. Poor loading of major histocompatibility complex class II molecules with endogenously synthesized short peptides in the absence of invariant chain. *Eur.J.Immunol.* 25:48-53.
- 87 Long, E. O., LaVaute, T., Pinet, V., and Jaraquemada, D. 1994. Invariant chain prevents the HLA-DR-restricted presentation of a cytosolic peptide. *J.Immunol.* 153:1487-1494.
- 88 Anderson, M. S. and Miller, J. 1992. Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:2282-2286.
- 89 Layet, C. and Germain, R. N. 1991. Invariant chain promotes egress of poorly expressed, haplotype-mismatched class II major histocompatibility complex A α B β dimers from the endoplasmic reticulum/cis-Golgi compartment. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:2364-2350.
- 90 Romagnoli, P. and Germain, R. N. 1994. The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J.Exp.Med.* 180:1107-1113.
- 91 Anderson, K. S. and Cresswell, P. 1994. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J.* 13:675-682.
- 92 Bonnerot, C., Marks, M. S., Cosson, P., Robertson, E. J., Bikoff, E. K., Germain, R. N., and Bonifacino, J. S. 1994. Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *EMBO J.* 13:934-944.
- 93 Marks, M. S., Germain, R. N., and Bonifacino, J. S. 1995. Transient aggregation of major histocompatibility complex class II chains during assembly in normal spleen cells. *J Biol.Chem.* 270:10475-10481.
- 94 Schaiff, W. T., Hruska, K. A., Bono, C., Shuman, S., and Schwartz, B. D. 1991. Invariant chain influences post-translational processing of HLA- DR molecules. *J.Immunol.* 147:603-608.

- 95 Bikoff, E. K., Germain, R. N., and Robertson, E. J. 1995. Allelic differences affecting invariant chain dependency of MHC class II subunit assembly. *Immunity*. 2:301-310.
- 96 Neumann, J., Schach, N., and Koch, N. 2001. Glycosylation signals that separate the trimerization from the mhc class II-binding domain control intracellular degradation of invariant chain. *J Biol.Chem.* 276:13469-13475.
- 97 Kundra, R. and Kornfeld, S. 1999. Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J Biol.Chem.* 274:31039-31046.
- 98 Neefjes, J. J., Stollorz, V., Peters, P. J., Geuze, H. J., and Ploegh, H. L. 1990. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* 61:171-183.
- 99 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. *J Cell Sci.* 107 (Pt 7):2021-2032.
- 100 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. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:8581-8585.
- 101 Benaroch, P., Yilla, M., Raposo, G., Ito, K., Miwa, K., Geuze, H. J., and Ploegh, H. L. 1995. How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J.* 14:37-49.
- 102 Pond, L., Kuhn, L. A., Teyton, L., Schutze, M. P., Tainer, J. A., Jackson, M. R., and Peterson, P. A. 1995. A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J Biol.Chem.* 270:19989-19997.
- 103 Anderson, M. S., Swier, K., Arneson, L., and Miller, J. 1993. Enhanced antigen presentation in the absence of the invariant chain endosomal localization signal. *J.Exp.Med.* 178:1959-1969.
- 104 Bakke, O. and Dobberstein, B. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63:707-716.
- 105 Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S. L., Quaranta, V., and Peterson, P. A. 1990. Intracellular transport of

- class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348:600-605.
- 106 Nijenhuis, M., Calafat, J., Kuijpers, K. C., Janssen, H., de Haas, M., Nordeng, T. W., Bakke, O., and Neefjes, J. J. 1994. Targeting major histocompatibility complex class II molecules to the cell surface by invariant chain allows antigen presentation upon recycling. *Eur.J.Immunol.* 24:873-883.
- 107 Kang, S., Liang, L., Parker, C. D., and Collawn, J. F. 1998. Structural requirements for major histocompatibility complex class II invariant chain endocytosis and lysosomal targeting. *J Biol.Chem.* 273:20644-20652.
- 108 Arneson, L. S. and Miller, J. 1995. Efficient endosomal localization of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes requires multimerization of the invariant chain targeting sequence. *J.Cell Biol.* 129:1217-1228.
- 109 Bertolino, P., Staschewski, M., Trescol-Biémont, M.-C., Freisewinkel, I. M., Schenck, K., Chrétien, I., Forquet, F., Gerlier, D., Rabourdin-Combe, C., and Koch, N. 1995. Deletion of a C-terminal sequence of the class II-associated invariant chain abrogates invariant chains oligomer formation and class II antigen presentation. *J.Immunol.* 154:5620-5629.
- 110 Miller, J. and Germain, R. N. 1986. Efficient cell surface expression of class II MHC molecules in the absence of associated invariant chain. *J Exp.Med.* 164:1478-1489.
- 111 Sekaly, R.-P., Tonnelle, C., Strubin, M., Mach, B., and Long, E. O. 1986. Cell surface expression of class II histocompatibility antigens occurs in the absence of the invariant chain. *J.Exp.Med.* 164:1490-1504.
- 112 Matza, D., Wolstein, O., Dikstein, R., and Shachar, I. 2001. Invariant chain induces B cell maturation by activating a TAF(II)105-NF-kappaB-dependent transcription program. *J Biol.Chem.* 276:27203-27206.
- 113 Matza, D., Kerem, A., Medvedovsky, H., Lantner, F., and Shachar, I. 2002. Invariant chain-induced B cell differentiation requires intramembrane proteolytic release of the cytosolic domain. *Immunity.* 17:549-560.
- 114 Matza, D., Lantner, F., Bogoch, Y., Flaishon, L., HersHKoviz, R., and Shachar, I. 2002. Invariant chain induces B cell maturation in a process

- that is independent of its chaperonic activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:3018-3023.
- 115 Lipp, J. and Dobberstein, B. 1986. The membrane-spanning segment of invariant chain (I gamma) contains a potentially cleavable signal sequence. *Cell* 46:1103-1112.
 - 116 Schutze, M.-P., Peterson, P. A., and Jackson, M. R. 1994. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 13:1696-1705.
 - 117 Newcomb, J. R. and Cresswell, P. 1993. Structural analysis of proteolytic products of MHC class II-invariant chain complexes generated in vivo. *J.Immunol.* 151:4153-4163.
 - 118 Anderson, H. A., Bergstralh, D. T., Kawamura, T., Blauvelt, A., and Roche, P. A. 1999. Phosphorylation of the invariant chain by protein kinase C regulates MHC class II trafficking to antigen-processing compartments. *J.Immunol.* 163:5435-5443.
 - 119 Gregers, T. F., Nordeng, T. W., Birkeland, H. C., Sandlie, I., and Bakke, O. 2003. The cytoplasmic tail of invariant chain modulates antigen processing and presentation. *Eur.J Immunol* 33:277-286.
 - 120 Lagaudriere-Gesbert, C., Newmyer, S. L., Gregers, T. F., Bakke, O., and Ploegh, H. L. 2002. Uncoating ATPase Hsc70 is recruited by invariant chain and controls the size of endocytic compartments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:1515-1520.
 - 121 Nordeng, T. W., Gregers, T. F., Kongsvik, T. L., Meresse, S., Gorvel, J. P., Jourdan, F., Motta, A., and Bakke, O. 2002. The cytoplasmic tail of invariant chain regulates endosome fusion and morphology. *Mol.Biol.Cell* 13:1846-1856.
 - 122 Stang, E. and Bakke, O. 1997. MHC class II associated invariant chain induced enlarged endosomal structures. A morphological study. *Exptl.Cell Res.* 235:79-92.
 - 123 O'Kelly, I., Butler, M. H., Zilberberg, N., and Goldstein, S. A. 2002. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111:577-588.
 - 124 Nilsson, T., Jackson, M., and Peterson, P. A. 1989. Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 58:707-718.

- 125 Jackson, M. R., Nilsson, T., and Peterson, P. A. 1990. Identification of a consensus motif for the retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 9:3153-3162.
- 126 Itin, C., Schindler, R., and Hauri, H. P. 1995. Targeting of protein ERGIC-53 to the ER/ERGIC/cis-Golgi recycling pathway. *J. Cell Biol.* 131:57-67.
- 127 Letourneur, F., Hennecke, S., Demolliere, C., and Cosson, P. 1995. Steric masking of a dilysine endoplasmic reticulum retention motif during assembly of the human high affinity receptor for immunoglobulin E. *J. Cell Biol.* 129:971-978.
- 128 Gaynor, E. C., te, H. S., Graham, T. R., Aebi, M., and Emr, S. D. 1994. Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in yeast. *J Cell Biol.* 127:653-665.
- 129 Hill, K. J. and Stevens, T. H. 1994. Vma21p is a yeast membrane protein retained in the endoplasmic reticulum by a di-lysine motif and is required for the assembly of the vacuolar H(+)-ATPase complex. *Mol. Biol. Cell* 5:1039-1050.
- 130 Townsley, F. M. and Pelham, H. R. 1994. The KKXX signal mediates retrieval of membrane proteins from the Golgi to the ER in yeast. *Eur. J Cell Biol.* 64:211-216.
- 131 Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. 1999. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22:537-548.
- 132 Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. 2000. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27:97-106.
- 133 Standley, S., Roche, K. W., McCallum, J., Sans, N., and Wenthold, R. J. 2000. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28:887-898.
- 134 Cosson, P. and Letourneur, F. 1994. Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 263:1629-1631.
- 135 Cosson, P., Demolliere, C., Hennecke, S., Duden, R., and Letourneur, F. 1996. Delta- and zeta-COP, two coatamer subunits homologous to clathrin-associated proteins, are involved in ER retrieval. *EMBO J.* 15:1792-1798.

- 136 Yuan, H., Michelsen, K., and Schwappach, B. 2003. 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr.Biol.* 13:638-646.
- 137 Teasdale, R. D. and Jackson, M. R. 1996. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 12:27-54.
- 138 Scott, D. B., Blanpied, T. A., Swanson, G. T., Zhang, C., and Ehlers, M. D. 2001. An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J.Neurosci.* 21:3063-3072.
- 139 Rothman, J. E. and Wieland, F. T. 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272:227-234.
- 140 Schekman, R. and Orci, L. 1996. Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271:1526-1533.
- 141 Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S. D., Riezman, H., and Cosson, P. 1994. Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 79:1199-1207.
- 142 Gaynor, E. C., Graham, T. R., and Emr, S. D. 1998. COPI in ER/Golgi and intra-Golgi transport: do yeast COPI mutants point the way? *Biochim.Biophys.Acta* 1404:33-51.
- 143 Cosson, P., Lefkir, Y., Demolliere, C., and Letourneur, F. 1998. New COP1-binding motifs involved in ER retrieval. *EMBO J.* 17:6863-6870.
- 144 Lewis, M. J. and Pelham, H. R. 1992. Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* 68:353-364.
- 145 Munro, S. and Pelham, H. R. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48:899-907.
- 146 Orci, L., Starnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T. H., and Rothman, J. E. 1997. Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* 90:335-349.
- 147 Wilson, D. W., Lewis, M. J., and Pelham, H. R. 1993. pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J.Biol.Chem.* 268:7465-7468.
- 148 Girod, A., Storrie, B., Simpson, J. C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L. M., Lord, J. M., Nilsson, T., and Pepperkok, R. 1999. Evidence for a

- COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* 1:423-430.
- 149 White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B., and Stelzer, E. H. 1999. Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J. Cell Biol.* 147:743-760.
- 150 Muslin, A. J. and Xing, H. 2000. 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal.* 12:703-709.
- 151 Tzivion, G., Shen, Y. H., and Zhu, J. 2001. 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene* 20:6331-6338.
- 152 van Hemert, M. J., Steensma, H. Y., and van Heusden, G. P. 2001. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 23:936-946.
- 153 Yaffe, M. B. 2002. How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* 513:53-57.
- 154 Veenstra, H., Jacobs, P., and Dowdle, E. B. 1993. Processing of HLA-class II invariant chain and expression of the p35 form is different in malignant and transformed cells. *Blood* 82:2494-2500.
- 155 Veenstra, H., Jacobs, P., and Dowdle, E. B. 1996. Abnormal association between invariant chain and HLA class II alpha and beta chains in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Immunol.* 171:68-73.
- 156 Elliott, W. L., Lu, S., Nguyen, Q., Reisert, P. S., Sairenji, T., Sorli, C. H., Stille, C. J., Thomas, L. J., and Humphreys, R. E. 1987. Hyperexpressed hairy leukemic cell Ii might bind to the antigen-presenting site of class II MHC molecules. *Leukemia* 1:395-396.
- 157 Yan, G., Shi, L., Penforinis, A., and Faustman, D. L. 2003. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J. Immunol.* 170:620-627.
- 158 Avva, R. R. and Cresswell, P. 1994. In vivo and in vitro formation and dissociation of HLA-DR complexes with invariant chain derived peptides. *Immunity* 1:763-774.
- 159 Denzin, L. K., Hammond, C., and Cresswell, P. 1996. HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for

- HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J.Exp.Med.* 184:2153-2165.
- 160 Kropshofer, H., Hammerling, G. J., and Vogt, A. B. 1997. How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: Survival of the fittest? *Immunol.Today* 18:77-82.
- 161 Kelly, A. P., Monaco, J. J., Cho, S., and Trowsdale, J. 1991. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* 353:571-573.
- 162 Denzin, L. K., Robbins, N. F., Carboy-Newcomb, C., and Cresswell, P. 1994. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1:595-606.
- 163 Karlsson, L., Péléraux, A., Lindstedt, R., Liljedahl, M., and Peterson, P. A. 1994. Reconstitution of an operational MHC class II compartment in nonantigen-presenting cells. *Science* 266:1569-1573.
- 164 Lindstedt, R., Liljedahl, M., Peleraux, A., Peterson, P. A., and Karlsson, L. 1995. The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif. *Immunity* 3:561-572.
- 165 Kovats, S., Grubin, C. E., Eastman, S., DeRoos, P., Dongre, A., Van Kaer, L., and Rudensky, A. Y. 1998. Invariant chain-independent function of H-2M in the formation of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes in vivo. *J.Exp.Med.* 187:245-251.
- 166 Marks, M. S., Roche, P. A., van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P. J., and Bonifacino, J. S. 1995. A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the β chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J.Cell Biol.* 131:351-369.
- 167 Sanderson, F., Powis, S. H., Kelly, A. P., and Trowsdale, J. 1994. Limited polymorphism in HLA-DM does not involve the peptide binding groove. *Immunogenetics* 39:56-58.
- 168 Sanderson, F., Kleijmeer, M. J., Kelly, A., Verwoerd, D., Tulp, A., Neefjes, J. J., Geuze, H. J., and Trowsdale, J. 1994. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* 266:1566-1569.
- 169 Arndt, S. O., Vogt, A. B., Markovic-Plese, S., Martin, R., Moldenhauer, G., Wolpl, A., Sun, Y., Schadendorf, D., Hammerling, G. J., and

- Kropshofer, H. 2000. Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *EMBO J.* 19:1241-1251.
- 170 Ceman, S., Petersen, J. W., Pinet, V., and DeMars, R. 1994. Gene required for normal MHC class II expression and function is localized to approximately 45 kb of DNA in the class II region of the MHC. *J.Immunol.* 152:2865-2873.
- 171 Fling, S. P., Arp, B., and Pious, D. 1994. HLA-DM and -DMB genes are both required for complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* 368:554-558.
- 172 Denzin, L. K. and Cresswell, P. 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II $\alpha\beta$ dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82:155-165.
- 173 Sherman, M. A., Weber, D. A., and Jensen, P. E. 1995. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* 3:197-205.
- 174 Sloan, V. S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., and Zaller, D. M. 1995. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA- DR. *Nature* 375:802-806.
- 175 Van Ham, S. M., Grueneberg, U., Malcherek, G., Broeker, I., Melms, A., and Trowsdale, J. 1996. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs. *J.Exp.Med.* 184:2019-2024.
- 176 Weber, D. A., Evavold, B. D., and Jensen, P. E. 1996. Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* 274:618-620.
- 177 Karlsson, L., Surh, C. D., Sprent, J., and Peterson, P. A. 1991. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* 351:485-488.
- 178 Liljedahl, M., Kuwana, T., Fung-Leung, W. P., Jackson, M., Peterson, P. A., and Karlsson, L. 1996. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* 15:4817-4824.
- 179 Kropshofer, H., Hammerling, G. J., and Vogt, A. B. 1999. The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunol.Rev.* 172:267-278.

- 180 Larhammar, D., Hammerling, U., Rask, L., and Peterson, P. A. 1985. Sequence of Gene and cDNA Encoding Murine Major Histocompatibility Complex Class II Gene A β 2. *J.Biol.Chem.* 260:14111-14119.
- 181 Karlsson, L. and Peterson, P. A. 1992. The α chain of H-2O has an Unexpected Location in the Major Histocompatibility Complex. *J.Exp.Med.* 176:477-483.
- 182 Kropshofer, H., Vogt, A. B., They, C., Armandola, E. A., Li, B. C., Moldenhauer, G., Amigorena, S., and Hammerling, G. J. 1998. A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.* 17:2971-2981.
- 183 Van Ham, S. M., Tjin, E. P. M., Lillemeir, B. F., Gruneberg, U., Van Meijgaarden, K. E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D., Ottenhoff, T. H. M., Pappin, D. J. C., Trowsdale, J., and Neefjes, J. HLA-DO is a negative regulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Current Biology* 7, 950-957. 1997.
- Ref Type: Journal (Full)
- 184 Liljedahl, M., Winqvist, O., Surh, C. D., Wong, P., Ngo, K., Teyton, L., Peterson, P. A., Brunmark, A., Rudensky, A. Y., Fung-Leung, W. P., and Karlsson, L. 1998. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8:233-243.
- 185 van Ham, M., van Lith, M., Lillemeier, B., Tjin, E., Gruneberg, U., Rahman, D., Pastoors, L., van Meijgaarden, K., Roucard, C., Trowsdale, J., Ottenhoff, T., Pappin, D., and Neefjes, J. 2000. Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *J.Exp.Med.* 191:1127-1136.
- 186 Lanzavecchia, A. 1985. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 314:537-539.
- 187 Rock, K. L., Benacerraf, B., and Abbas, A. K. 1984. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes.I: Role of surface immunoglobulin receptors. *J.Exp.Med.* 160:1102-1125.
- 188 Simitsek, P. D., Campbell, D. G., Lanzavecchia, A., Fairweather, N., and Watts, C. 1995. Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J.Exp.Med.* 181:1957-1964.

- 189 Alfonso, C., Williams, G. S., Han, J. O., Westberg, J. A., Winqvist, O., and Karlsson, L. 2003. Analysis of H2-O influence on antigen presentation by B cells. *J.Immunol.* 171:2331-2337.
- 190 Glazier, K. S., Hake, S. B., Tobin, H. M., Chadburn, A., Schattner, E. J., and Denzin, L. K. 2002. Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. *J.Exp.Med.* 195:1063-1069.
- 191 Douek, D. C. and Altmann, D. M. 1997. HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *Int.Immunol.* 9:355-364.
- 192 Trowsdale, J. and Kelly, A. 1985. The Human HLA class II α chain DZ α is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions. *EMBO J.* 4:2231-2237.
- 193 Tonnelde, C., DeMars, R., and Long, E. O. 1985. DO β : a new β chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J.* 4:2839-2847.
- 194 Wake, C. T. and Flavell, R. A. 1985. Multiple Mechanisms Regulate the Expression of Murine Immune Response Genes. *Cell* 42:623-628.
- 195 Taxman, D. J., Cressman, D. E., and Ting, J. P. 2000. Identification of class II transcriptional activator-induced genes by representational difference analysis: discoordinate regulation of the DN alpha/DO beta heterodimer. *J.Immunol.* 165:1410-1416.
- 196 Ponzoni, M., Guarnaccia, F., Corrias, M. V., and Cornaglia-Ferraris, P. 1993. Uncoordinate induction and differential regulation of HLA class-I and class-II expression by gamma-interferon in differentiating human neuroblastoma cells. *Int.J.Cancer* 55:817-823.
- 197 Nagarajan, U. M., Lochamy, J., Chen, X., Beresford, G. W., Nilsen, R., Jensen, P. E., and Boss, J. M. 2002. Class II Transactivator Is Required for Maximal Expression of HLA-DOB in B Cells. *J.Immunol.* 168:1780-1786.
- 198 Walter, W., Scheuer, C., Lingnau, K., Reichert, T. E., Schmitt, E., Loos, M., and Maeurer, M. J. 2000. H2-M, a facilitator of MHC class II peptide loading, and its negative modulator H2-O are differentially expressed in response to proinflammatory cytokines. *Immunogenetics* 51:794-804.

- 199 Hammerling, G. J. and Moreno, J. 1990. The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol.Today* 11:337-340.
- 200 Khalil, H., Brunet, A., Saba, I., Terra, R., Sekaly, R. P., and Thibodeau, J. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int.Immunol.* 15:1249-1263.
- 201 Kuwana, T., Peterson, P. A., and Karlsson, L. 1998. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.* 95:1056-1061.
- 202 Shikano, S. and Li, M. 2003. Membrane receptor trafficking: evidence of proximal and distal zones conferred by two independent endoplasmic reticulum localization signals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 100:5783-5788.
- 203 Ryan, K. M. and Birnie, G. D. 1996. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem.J.* 314 (Pt 3):713-721.
- 204 Spencer, C. A. and Groudine, M. 1991. Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv.Cancer Res.* 56:1-48.
- 205 Hann, S. R., King, M. W., Bentley, D. L., Anderson, C. W., and Eisenman, R. N. 1988. A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell* 52:185-195.
- 206 Hann, S. R., Sloan-Brown, K., and Spotts, G. D. 1992. Translational activation of the non-AUG-initiated c-myc 1 protein at high cell densities due to methionine deprivation. *Genes Dev.* 6:1229-1240.
- 207 Hann, S. R. 1995. Methionine deprivation regulates the translation of functionally-distinct c-Myc proteins. *Adv.Exp.Med.Biol.* 375:107-116.
- 208 Spotts, G. D., Patel, S. V., Xiao, Q., and Hann, S. R. 1997. Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol.Cell Biol.* 17:1459-1468.
- 209 Jayawardena-Wolf, J., Benlagha, K., Chiu, Y. H., Mehr, R., and Bendelac, A. 2001. CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain. *Immunity.* 15:897-908.

- 210 Matsuda, J. L. and Kronenberg, M. 2001. Presentation of self and microbial lipids by CD1 molecules. *Curr.Opin.Immunol.* 13:19-25.
- 211 Blumberg, R. S., Terhorst, C., Bleicher, P., McDermott, F. V., Allan, C. H., Landau, S. B., Trier, J. S., and Balk, S. P. 1991. Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J.Immunol.* 147:2518-2524.
- 212 Brossay, L., Jullien, D., Cardell, S., Sydora, B. C., Burdin, N., Modlin, R. L., and Kronenberg, M. 1997. Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. *J.Immunol.* 159:1216-1224.
- 213 Spada, F. M., Borriello, F., Sugita, M., Watts, G. F., Koezuka, Y., and Porcelli, S. A. 2000. Low expression level but potent antigen presenting function of CD1d on monocyte lineage cells. *Eur.J.Immunol.* 30:3468-3477.
- 214 Gapin, L., Matsuda, J. L., Surh, C. D., and Kronenberg, M. 2001. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat.Immunol.* 2:971-978.
- 215 Lantz, O. and Bendelac, A. 1994. An invariant T cell receptor α chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4⁺ and CD4⁻ T cells in mice and humans. *J.Exp.Med.* 180:1097-1106.
- 216 Matsuda, J. L., Gapin, L., Fazilleau, N., Warren, K., Naidenko, O. V., and Kronenberg, M. 2001. Natural killer T cells reactive to a single glycolipid exhibit a highly diverse T cell receptor beta repertoire and small clone size. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:12636-12641.
- 217 Ronet, C., Mempel, M., Thieblemont, N., Lehuen, A., Kourilsky, P., and Gachelin, G. 2001. Role of the complementarity-determining region 3 (CDR3) of the TCR-beta chains associated with the V alpha 14 semi-invariant TCR alpha-chain in the selection of CD4⁺ NK T Cells. *J.Immunol.* 166:1755-1762.
- 218 Shachar, I., Elliott, E. A., Chasnoff, B., Grewal, I. S., and Flavell, R. A. 1995. Reconstitution of invariant chain function in transgenic mice in vivo by individual p31 and p41 isoforms. *Immunity* 3:373-383.
- 219 Shachar, I. and Flavell, R. A. 1996. Requirement for invariant chain in B cell maturation and function. *Science* 274:106-108.
- 220 Roucard, C., Thomas, C., Pasquier, M. A., Trowsdale, J., Sotto, J. J., Neefjes, J., and van Ham, M. 2001. In vivo and in vitro modulation of

- HLA-DM and HLA-DO is induced by B lymphocyte activation. *J.Immunol.* 167:6849-6858.
- 221 Chen, X., Laur, O., Kambayashi, T., Li, S., Bray, R. A., Weber, D. A., Karlsson, L., and Jensen, P. E. 2002. Regulated expression of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO during antigen-dependent and antigen-independent phases of B cell development. *J.Exp.Med.* 195:1053-1062.
- 222 Ting, J. P. and Trowsdale, J. 2002. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109 Suppl:S21-S33.
- 223 Zeleznik, L., Itoh-Lindstrom, Y., Clarke, J. B., Moore, T. L., and Ting, J. P. 1992. The B cell-specific nuclear factor OTF-2 positively regulates transcription of the human class II transplantation gene, DRA. *J Biol.Chem.* 267:7677-7682.
- 224 Steimle, V., Otten, L. A., Zufferey, M., and Mach, B. 1993. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 75:135-146.
- 225 Steimle, V., Siegrist, C.-A., Mottet, A., Lisowska-Grospierre, B., and Mach, B. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265:106-109.
- 226 Chang, C.-H., Fontes, J. D., Peterlin, M., and Flavell, R. A. 1994. Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *J.Exp.Med.* 180:1367-1374.
- 227 Chang, C.-H. and Flavell, R. A. 1995. Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation. *J.Exp.Med.* 181:765-767.
- 228 Kern, I., Steimle, V., Siegrist, C. A., and Mach, B. 1995. The two novel MHC class II transactivators RFX5 and CIITA both control expression of HLA-DM genes. *Int.Immunol.* 7:1295-1299.
- 229 Hake, S. B., Masternak, K., Kammerbauer, C., Janzen, C., Reith, W., and Steimle, V. 2000. CIITA leucine-rich repeats control nuclear localization, in vivo recruitment to the major histocompatibility complex (MHC) class II enhanceosome, and MHC class II gene transactivation. *Mol.Cell Biol.* 20:7716-7725.

- 230 Masternak, K., Muhlethaler-Mottet, A., Villard, J., Zufferey, M., Steimle, V., and Reith, W. 2000. CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev.* 14:1156-1166.
- 231 Alfonso, C. and Karlsson, L. 2000. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 18:113-142.
- 232 Hake, S. B., Tobin, H. M., Steimle, V., and Denzin, L. K. 2003. Comparison of the transcriptional regulation of classical and non-classical MHC class II genes. *Eur.J Immunol* 33:2361-2371.
- 233 Martin, B. K., Frelinger, J. G., and Ting, J. P. 1999. Combination gene therapy with CD86 and the MHC class II transactivator in the control of lung tumor growth. *J.Immunol.* 162:6663-6670.

