

Université de Montréal

Analyse structure-fonction de la molécule non classique
du CMH de classe II HLA-DO

Par
Francis Deshaies

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.

Mai, 2004

© Francis Deshaies, 2004



W

4

058

2004

v. 119

C

C

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 :
Analyse structure-fonction de la molécule non classique
du CMH de classe II HLA-DO

Présenté par
Francis Deshaies

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur	: <u>Dr. Guy Lemay</u>
Directeur de recherche	: <u>Dr. Jacques Thibodeau</u>
Membre du jury	: <u>Dr. Réjean Lapointe</u>
Examineur externe	: <u>Dr. Éric O. Long</u>
Représentante du doyen de la FES	: <u>Dr. Anne-Marie Mes-Masson</u>

Thèse accepté le : 23 Septembre 2004

RÉSUMÉ

La présentation antigénique aux lymphocytes T auxiliaires par les molécules de classe II est une étape cruciale permettant au système immunitaire de monter une réponse efficace face à un corps étranger. Ce processus implique la participation de plusieurs protéines accessoires qui serviront à assister les molécules de classe II dans la liaison de peptides antigéniques. A cet effet, HLA-DM catalyse l'échange peptidique et HLA-DO influence le type de peptides présentés puisqu'elle module l'activité de HLA-DM. Afin de caractériser ce système, nos premières études ont porté sur la caractérisation d'un signal de ciblage contenu dans la queue cytoplasmique de HLA-DO β et la régulation de l'expression de HLA-DO dans un système cellulaire autre que les cellules B. Une connaissance plus approfondie de cette molécule passe toutefois par des études structurales et fonctionnelles. La présente thèse portera donc principalement sur ces deux derniers aspects.

HLA-DO est toujours associée à HLA-DM dans la voie endocytaire et ne peut accéder aux autres compartiments sans l'aide de son partenaire. Dans un premier volet, nous avons étudié la rétention de HLA-DO dans le réticulum endoplasmique (RE) et avons tenté de découvrir la façon dont HLA-DM corrige cette situation. En analysant la région N-terminale de HLA-DO, nous avons découvert que cette région contient des acides aminés importants pour la conformation de la protéine. En effet, la modification d'une proline en position 11 de la chaîne α permet à la molécule HLA-DO de sortir par elle-même du RE et

d'atteindre les compartiments endosomaux ainsi que la surface cellulaire. De plus, cette molécule est détectée par un anticorps conformationnel qui reconnaît préférentiellement les complexes DO-DM. Ces résultats suggèrent donc que HLA-DO doit subir un changement conformationnel au niveau de son plancher peptidique afin de quitter le RE et que HLA-DM agisse comme chaperon en assistant HLA-DO dans le processus.

Dans le passé, des études ont suggéré un rôle inhibiteur de la molécule HLA-DO sur l'activité catalytique de HLA-DM. La deuxième partie de cette thèse porte donc sur l'analyse fonctionnelle de HLA-DO et la façon dont elle se lie à HLA-DM afin de moduler son activité. En utilisant des paires mixtes isotypiques permettant l'expression d'une seule chaîne de HLA-DO à la fois, nous avons démontré que DO α contenait une région importante (acides aminés 77 à 84) pour la liaison à HLA-DM. Un autre site de liaison situé sur la même interface (α E41) semble aussi affecter l'activité catalytique de HLA-DM. De façon intéressante, cet acide aminé est identique à une position de DR impliquée dans l'interaction avec DM. De plus, l'utilisation d'anticorps spécifiques à la chaîne alpha des paires mixtes entre en compétition avec HLA-DM pour l'accès à HLA-DO. Ces données suggèrent donc que l'interface d'interaction entre DO et DM soit différente de DR-DM en impliquant majoritairement la chaîne DO α et que cette association puisse affecter l'activité catalytique de HLA-DM en interférant avec sa liaison à HLA-DR.

LISTE DES MOTS CLÉS

Présentation antigénique

CMH de classe II

HLA-DO

HLA-DM

Inhibition

Chaperon moléculaire

Conformation

Rétention

Structure

Ciblage cellulaire

Régulation génique

SUMMARY

Antigen presentation by MHC class II molecules to helper T lymphocytes is a crucial event in triggering the immune system against foreign bodies. This process involves the participation of many accessory molecules which assist the class II molecules in the loading of antigenic peptides. HLA-DM plays an important role in catalyzing the peptide exchange and HLA-DO influences the repertoire of peptides by negatively modulating the activity of HLA-DM. As a first step in the characterization of this system, we analyzed a functional dileucine sorting signal encoded in the cytoplasmic tail of HLA-DO β and we looked at the regulation of HLA-DO in a non B cell system. However, to better understand the role of HLA-DO in antigen presentation, it is crucial to define the structure and the function of this molecule. For this reason, the present work is focusing mainly on these two aspects.

HLA-DO is always found with HLA-DM in the endocytic pathway and cannot gain access to other compartments without this interaction. In the first part of the thesis, we focused on endoplasmic reticulum (ER) retention of HLA-DO and tried to find answers on how HLA-DM can overcome this retention. By analyzing the N-terminal region of HLA-DO, we discovered that this domain contains important residues that are critical for the proper conformation of the protein. Indeed, the modification of a proline in position DO α 11 allowed HLA-DO to egress ER on its own and gain access to endosomal compartments as well

as the cell surface. Moreover, a conformational antibody that preferentially recognizes DO-DM complexes over DO alone reacts with the modified HLA-DO molecule. Altogether, these results suggest that HLA-DO must undergo conformational changes in its N-terminal region in order to leave the ER and that HLA-DM acts as a chaperone by assisting HLA-DO in this process.

Early evidence suggested that HLA-DO was an inhibitor of peptide loading by interfering with HLA-DM's catalytic activity. To this respect, the second part of the thesis deals with the function of HLA-DO and how it binds to HLA-DM to modulate its activity. By expressing one chain of HLA-DO at a time in the context of mixed isotypic pairs, we showed that DO α contains an important region (amino acids 77 to 84) for the binding to HLA-DM. Moreover, another residue in the same lateral face of DO α (α E41) influences the DO-DM association as well as the accumulation of class II-CLIP complexes. This residue is identical to the one found in DR which participates to the interaction with DM. A tight contact between DM and this lateral face of DO α was further confirmed by using alpha chain-specific antibodies that compete with DM to have access to DO. Altogether, these results suggest that the interface of interaction between DO and DM is distinct from the one described for DR by involving an important participation of the α chain and that this interface may inhibit DM's catalytic activity by interfering with DR binding.

KEYWORD LISTING

Antigen presentation

MHC class II

HLA-DO

HLA-DM

Inhibition

Molecular chaperone

Conformation

Retention

Structure

Cell trafficking

Gene regulation

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
LISTE DES MOTS CLÉS.....	v
SUMMARY	vi
KEYWORD LISTING	viii
TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTE DES FIGURES	xiv
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xvii
REMERCIEMENTS	xix
CHAPITRE 1 – REVUE DE LITTÉRATURE	1
1.1 Introduction	1
1.1.1 Présentation antigénique et initiation de la réponse immunitaire	1
1.1.2 Le complexe majeur d’histocompatibilité.....	5
1.1.1.2 Locus du CMH.....	6
1.2 CMH de classe I : Un aperçu.....	8
1.3 CMH de classe II classique.....	9
1.3.1 Distribution cellulaire.....	10
1.3.2 Régulation génique	12
1.3.3 Présentation antigénique par les molécules de classe II.....	13
1.3.3.1 Biosynthèse et ciblage	13

1.3.3.2 Rôle chaperon de la chaîne invariante.....	15
1.3.3.3 Nature des compartiments de présentation MIIC	16
1.3.3.4 Rôle des protéases au niveau des MIIC.....	18
1.3.4 Structure des molécules de classe II	19
1.3.5 Liaison CMH/Peptide.....	21
1.3.6 Formation des hétérodimères de classe II	25
1.3.7 Formation de paires mixtes inter-isotypes.....	28
1.4 CMH de classe II non classique.....	29
1.5 HLA-DM	31
1.5.1 Transport et ciblage intracellulaire	33
1.5.2 Rôle physiologique de HLA-DM.....	34
1.5.2.1 HLA-DM comme catalyseur de l'échange peptidique.....	34
1.5.2.2 HLA-DM comme chaperon moléculaire.....	36
1.5.2.3 HLA-DM comme éditeur de peptides.....	37
1.5.3 Structure de HLA-DM	38
1.5.4 Association entre DR et DM	39
1.5.4.1 Changements conformationnels induits par l'interaction DR-DM....	40
1.5.4.2 Interaction DR-DM : Interface de DR impliquée	41
1.5.4.3 Interaction DR-DM : Interface de DM impliquée	42
1.5.5 Modèle de relâche peptidique par DM.....	44
1.6 HLA-DO.....	47
1.6.1 Généralités.....	47
1.6.2 Distribution cellulaire.....	49

1.6.2 Régulation génique	50
1.6.3 Transport intracellulaire	51
1.6.4 Ciblage intracellulaire	53
1.6.5 Fonction modulatrice de HLA-DO	54
1.6.6 Rôle physiologique de DO dans les cellules B.....	56
1.6.6.1 Rôle de DO dans les centres germinatifs.....	59
1.6.6.2 Rôle de DO dans la sélection d'anticorps de haute affinité.....	59
1.7 Objectifs de travail.....	60
CHAPITRE 2 – ARTICLE	62
Mutation of the membrane-distal region of HLA-DO abrogates DM- dependency for ER egress	63
2.1 RÉSUMÉ.....	64
2.2 ABSTRACT	66
2.3 INTRODUCTION	67
2.4 MATERIALS AND METHODS	69
2.5 RESULTS.....	75
2.6 DISCUSSION.....	83
2.7 ACKNOWLEDGMENTS.....	89
2.8 ABBREVIATIONS	90
2.9 REFERENCES	91
2.10 FIGURES	95

CHAPITRE 3 – ARTICLE 111

Determination of the HLA-DM interaction interface on HLA-DO molecule
 112

3.1 RÉSUMÉ..... 113

3.2 ABSTRACT 114

3.3 INTRODUCTION 115

3.4 MATERIALS AND METHODS 117

3.5 RESULTS..... 121

3.6 DISCUSSION..... 131

3.7 ACKNOWLEDGEMENTS 136

3.8 ABBREVIATIONS 137

3.9 REFERENCES 138

3.10 FIGURES 142

CHAPITRE 4 – DISCUSSION 156

4.1 Régulation de l'expression de HLA-DO..... 156

4.2 Importance du ciblage pour la modulation de HLA-DO 157

4.3 Analyse structurale de HLA-DO 159

4.3.1 Formation de l'hétérodimère HLA-DO $\alpha\beta$ 159

4.3.1.1 Règles d'association entre la chaîne DO α et DO β 160

4.3.1.2 Importance des régions transmembranaires..... 163

4.3.2	Structure tridimensionnelle de HLA-DO	164
4.3.3	Changements conformationnels de DO	165
4.3.3.1	Implication des chaperons du RE dans la rétention	166
4.3.3.2	Correction de la conformation de HLA-DO par DM.....	167
4.4	Analyse fonctionnelle de HLA-DO.....	169
4.4.1	Modèle d'interaction entre DM et DO	169
4.4.2	Modèle d'inhibition de DM par DO	173
4.4.2.1	Modulation par compétition entre DR et DO	173
4.4.2.2	Modulation simple	175
4.4.3	Engagement des complexes DO-DM avec DR	176
4.4.4	Conclusions	179
4.5	Rôle de HLA-DO au niveau des cellules B.....	180
4.5.1	Prévention des maladies autoimmunitaires?	182
4.5.2	Impact de DO dans l'évasion tumorale?	182
CHAPITRE 5 – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....		185
CHAPITRE 6 – RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		187
CHAPITRE 7 - ANNEXES		204

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1.1 La présentation antigénique par les molécules du CMH-II.	2
Figure 1.2 Structure générale des molécules du CMH classe I/II.....	3
Figure 1.3 Voies de présentation des molécules du CMH de classe I et II.	4
Figure 1.4 Locus du complexe majeur d'histocompatibilité.	7
Figure 1.5 Promoteur des CMH de classe II et complexe transcriptionnel.	13
Figure 1.6 Modèle du trimère de Ii et du complexe CMH-II / Ii.....	14
Figure 1.7 Voie endosomale et route des molécules du CMH-II.....	17
Figure 1.8 Structure tridimensionnelle d'une molécule du CMH de classe II (HLA-DR1).....	20
Figure 1.9 Orientation du peptide dans la niche peptidique du classe II.....	23
Figure 1.10 Interaction entre le peptide et la niche du classe II.....	25
Figure 1.11 Les molécules de classe II non classiques HLA-DO et HLA-DM ne peuvent lier de peptides.	31
Figure 1.12 Rôles de HLA-DM sur le chargement peptidique des molécules de classe II.....	36
Figure 1.13 Comparaison de la niche peptidique de HLA-DM et HLA-DR1.....	38
Figure 1.14 Mutations sur DR affectant l'interaction avec DM.	42
Figure 1.15 Modèle d'interaction entre DM et DR.....	43
Figure 1.16 Mécanisme proposé pour l'action de DM sur la relâche peptidique.	45
Figure 1.17 Alignement de séquence entre DO/DR et DO/DM	48
Figure 1.18 DM facilite le transport intracellulaire de DO.....	53
Figure 1.19 Modèle de DO favorisant la présentation de peptides internalisés par les immunoglobulines de surface.....	57

Chapitre 2

Figure 1. Chimerical DR/DO molecules	95
Figure 2. A DM-induced conformational change on HLA-DO occurs early after protein synthesis in the ER.	97
Figure 3. cDO molecule successfully egress the ER to reach cell surface and lysosomal compartment in transfected HeLa cells.	99
Figure 4. Efficient association between cDO and DM in transfected HeLa cells.	101
Figure 5. Mutation of the membrane-distal region of HLA-DO α chain abrogates ER retention and allows cell surface expression of HLA-DO.....	103
Figure 6. DOP11V molecule successfully egress the ER to reach Golgi apparatus and lysosomal compartments in transiently transfected HEK293T cells.	105
Figure 7. DM binds strongly to DOP11V without enhancing its overall conformation.....	107
Figure 8. DOP11V is not impaired in its capacity to inhibits the catalytic activity of HLA-DM	109

Chapitre 3

Figure 1. DO α chain is sufficient to mediate the strong interaction with HLA-DM	142
Figure 2. A mixed pair including the DO α chain reach the endocytic pathway in a DM- dependent manner.....	144

Figure 3. The mutation of a DR-conserved residue on HLA-DO affects its interaction with DM and the cell surface accumulation of class II-CLIP complexes.	146
Figure 4. A critical region located in the C-terminal end of the alpha helix of DO α allows strong binding to DM.	148
Figure 5. A second residue on the same lateral interface of HLA-DO α contributes to the interaction with HLA-DM.	150
Figure 6. HLA-DM competes with α -specific antibodies to have access to the DO interface.	152
Figure 7. Proposed model of interaction between HLA-DM and HLA-DO.....	154

Chapitre 4

Figure 4.1 Homologie retrouvée entre DO α et DQ α au niveau des régions N-terminales.....	161
Figure 4.2 Correction de la conformation de HLA-DO par DM	168
Figure 4.3 Acides aminés de DO impliqués dans l'interaction avec DM	169
Figure 4.4 Modèles d'interaction entre DM et DO	172
Figure 4.5 Les résidus de DR impliqués dans l'interaction avec DM sont conservés chez HLA-DO.....	174
Figure 4.6 Complexes tri-moléculaires DO-DM-DR.....	178
Figure 4.7 Variation d'expression des molécules non classiques de classe II dans des lignées cellulaires et cellules leucémique primaires	184

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ABC : “*ATP-binding cassette*”

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANS : “*8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid*”

β 2-m : β 2 microglobuline

BCR : “*B cell receptor*”

CPA : Cellule présentatrice d’antigènes

CLIP : “*Class II associated invariant Chain peptide*”

CIITA : “*Class II transactivator*”

CMH : Complexe majeur d’histocompatibilité

CMH-I : CMH de classe I

CMH-II : CMH de classe II

DM : HLA-DM

DO : HLA-DO

DP : HLA-DP

DQ : HLA-DQ

DR : HLA-DR

EBV : “*Epstein bar virus*”

FcR : Récepteur du fragment Fc

GILT : “*Gamma-interferon-Inducible Lysosomal Thiol reductase*”

HA: Hémagglutinine

HLA : “*Human leukocyte antigen*”

Ii : Chaîne invariante

IFN- γ : Interferon gamma

kDa : Kilodaltons

MBP : "*myelin basic protein*"

MIIC : "*Major histocompatibility-complex class II compartments*"

MHC : "*Major histocompatibility complex*"

PMA : "*Phorbol myristyl acetate*"

RE : Réticulum endoplasmique

RTG : Réseau trans-golgien

TCR : "*T cell receptor*"

TNF α : "*Tumor Necrosis Factor α* "

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr. Jacques Thibodeau, mon directeur de recherche, pour son soutien tout au long de ma formation et pour m'avoir permis de développer un esprit scientifique ainsi qu'un sens critique rigoureux. Merci à tous mes collègues de travail, Alexandre, Georges, Jessy, Angélique, Nathalie, Julie, Catherine et Marie-Hélène qui m'ont supporté et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Un merci tout particulier à Alexandre pour m'avoir aidé à terminer mon travail et pour ta grande amitié.

Merci infiniment à mes parents Louise et André pour tout le support et l'amour qu'ils m'ont témoigné, et ce depuis toujours. Je tiens également à remercier les autres membres de ma famille, Nicolas et Solène, pour leurs aides et encouragements ainsi que leur présence continue. Enfin, je remercie particulièrement ma conjointe Mélanie pour toute la confiance qu'elle m'a portée et pour m'avoir appuyé, enduré et donné l'énergie nécessaire afin de mener à terme mes projets.

Je veux également souligner le support accordé par l'organisme des Fonds FCAR, qui m'a assuré un soutien financier durant une partie de ma formation.

CHAPITRE 1 – REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Introduction

1.1.1 Présentation antigénique et initiation de la réponse immunitaire

Une des capacités extraordinaires du système immunitaire est de pouvoir détecter la présence de corps étrangers et de pouvoir initier une réponse spécifique face à un éventuel envahisseur. La reconnaissance du corps étranger (considéré comme un antigène par l'organisme) est donc une étape cruciale et repose notamment sur la participation de deux types de récepteurs qui possèdent une très grande variabilité, cette variabilité permettant au système de répondre à un large éventail d'antigènes.

Le premier récepteur est retrouvé à la surface des cellules B et constitue les immunoglobulines de surface (anticorps) qui reconnaîtront directement des éléments antigéniques rencontrés. Pour sa part, le deuxième type de récepteur est exprimé à la surface des cellules T et se nomme TCR (*T Cell Receptor*). Ces molécules ne reconnaissent pas directement les antigènes mais plutôt des éléments antigéniques (peptides antigéniques) qui sont liés à des molécules codées par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les molécules du CMH ont donc une importance capitale dans l'initiation de la réponse immunitaire puisqu'elles serviront de déclencheurs des cellules T (1) (voir figure 1.1).

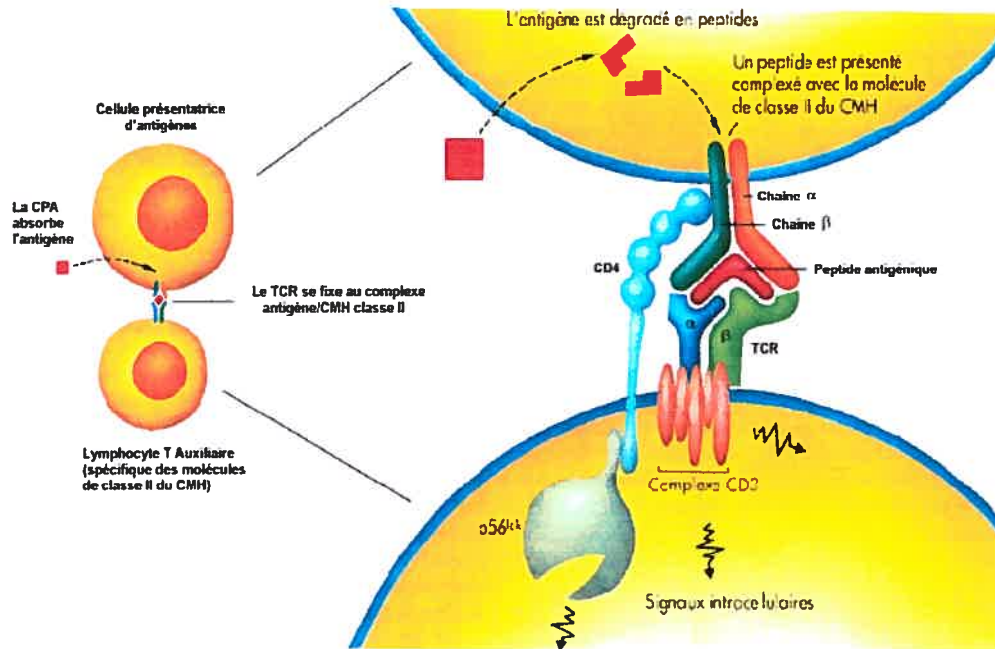


Figure 1.1 La présentation antigénique par les molécules du CMH-II.

Une cellule présentatrice d'antigène internalise, apprête et présente un peptide issu de la dégradation d'un antigène par l'intermédiaire des molécules du CMH de classe II. Le complexe CMH-II / peptide est reconnu par un récepteur (TCR) à la surface des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (Adapté de De Boeck-Wesmael (2)).

Ces cellules pourront, selon le cas, mener à la destruction de cellules infectées ou contribuer à l'activation des autres cellules immunitaires et ainsi orchestrer une réponse cellulaire complète face à un envahisseur (bactérie, virus, parasite, etc.) ou un élément perturbateur comme les cellules cancéreuses. Il existe principalement deux types de molécules du CMH, soient les molécules de classe I et les molécules de classe II. Ces deux variantes possèdent une fonction similaire qui est de présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T.

De plus, ces glycoprotéines possèdent des structures très semblables constituées de deux domaines apparentés à la super famille des immunoglobulines, d'une niche pouvant accueillir des peptides ainsi qu'une région transmembranaire leur permettant d'être ancrées à la membrane.

(voir figure 1.2).

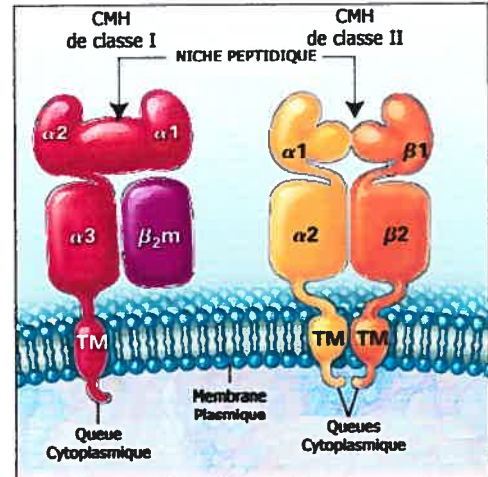


Figure 1.2 Structure générale des molécules du CMH classe I/II.
Traduit de Klein *et al.*, 2000 (1).

En revanche, il existe des différences majeures au niveau des voies de présentation des molécules classe I et de classe II (voir figure 1.3). Premièrement, les molécules de classe I lient des peptides d'origine endogène, c'est-à-dire qui proviennent de l'intérieur de la cellule. Le meilleur exemple survient lorsqu'une cellule est infectée par un virus, puisque les produits viraux sont synthétisés par la cellule même. Pour leur part, les molécules de classe II se lient à des peptides de source exogène, donc qui proviennent de l'extérieur de la cellule comme des bactéries, toxines bactériennes et débris de cellules cancéreuses. Une deuxième différence entre les molécules du CMH réside dans le type de lymphocyte T qu'elles stimulent. En effet, les molécules de classe I activent les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques (ce qui mène à la mort cellulaire de la cellule présentatrice) alors que les molécules de classe II activent plutôt les cellules T $CD4^+$ auxiliaires qui auront le rôle d'aider la réponse immunitaire par la sécrétion de cytokines.

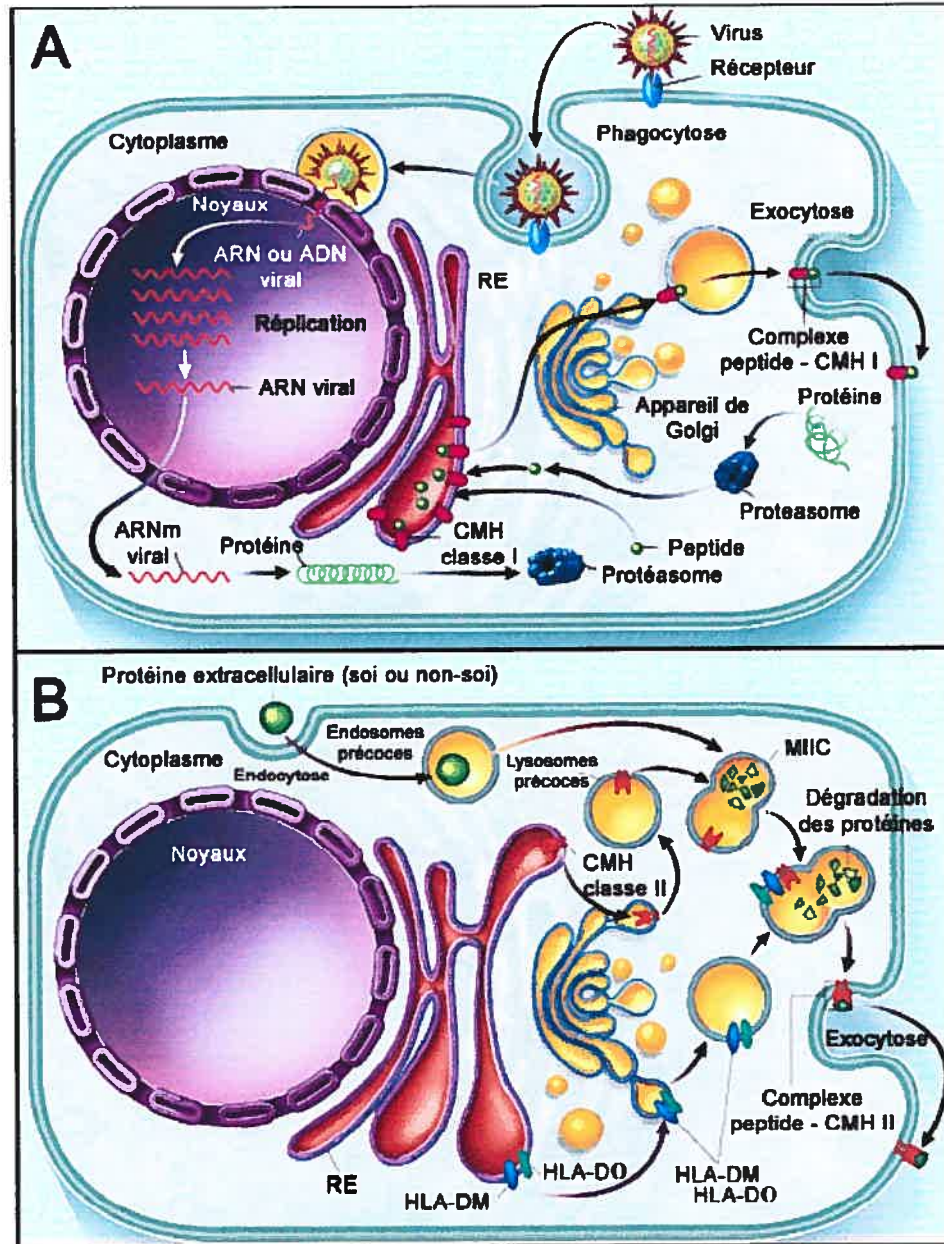


Figure 1.3 Voies de présentation des molécules du CMH de classe I et II.

(A) Voie de présentation endogène destinée aux molécules de classe I. Les protéines endogènes sont transformées par le protéasome en peptides, dirigées vers le RE et alors fixées à la niche des molécules de classe I. Ces complexes CMH I / peptide seront ensuite présentés à la surface aux lymphocytes T $CD8^+$. (B) Voie de présentation exogène destinée aux molécules de classe II. Des protéines extracellulaires sont internalisées par endocytose (ou phagocytose) et dégradées dans les endosomes au niveau des MIIC. Le fragment CLIP sur les molécules de classe II sera échangé pour un peptide antigénique grâce à la molécule HLA-DM. Les complexes CMH-II/peptide seront alors présentés à la surface aux lymphocytes T $CD4^+$ (Traduit de Klein *et al.*, 2000 (1)).

1.1.2 Le complexe majeur d'histocompatibilité

Le système immunitaire a évolué de façon à reconnaître le soi du non soi, ce qui lui permet de réagir rapidement face à des éléments étrangers. Cette capacité devient toutefois problématique lorsqu'il est question de transplantation d'organes ou de tissus. En effet, lorsque les tissus d'un donneur sont greffés à un receveur, plusieurs éléments antigéniques seront reconnus par le receveur et détermineront si ces tissus sont histocompatibles. Ces antigènes sont codés par plusieurs loci (plus de 40 chez la souris) et chaque espèce contient une région majeure impliquée de façon plus importante dans ce processus que l'on nomme « **Complexe Majeur d'Histocompatibilité** » (3).

Puisque ces antigènes sont présents sur les leucocytes humains, les produits encodés par le CMH sont appelés HLA (*Human leukocyte antigens*) alors que chez la souris les molécules équivalentes se nomment H-2 (*Histocompatibility-2*). Le rejet de greffe est causé en grande partie par l'activation des cellules T CD4⁺ chez l'hôte par les molécules du CMH de classe II du donneur. En temps normal, le rôle de ces molécules est de présenter des fragments d'antigènes, sous forme de peptides, aux lymphocytes T du système immunitaire et d'activer spécifiquement des réponses face au peptide antigénique. Lors du rejet, il semble que les molécules du CMH soient reconnues comme un complexe CMH/peptide antigénique, ce qui mène à l'activation des cellules T et éventuellement une réponse immunitaire contre le tissu (3).

La définition stricte du CMH est donc définie comme la région chromosomique où se situent les gènes contrôlant la structure et l'expression des molécules présentatrices de l'antigène. De façon fonctionnelle, il se définit comme l'ensemble des molécules impliquées dans l'apprêtement et la présentation de peptides aux lymphocytes T. Ces molécules peuvent donc présenter directement l'antigène ou simplement contribuer à la présentation antigénique.

1.1.1.2 Locus du CMH

Les gènes codant pour les molécules du CMH sont situés sur le chromosome 6 chez l'humain et sur le chromosome 17 chez la souris (voir figure 1.4). Sur plus de 200 gènes encodés dans cette région, seulement une quarantaine code pour le système HLA qui inclue les gènes de classe I et de classe II. Alors que les autres gènes peuvent être reliés fonctionnellement à l'apprêtement antigénique (Ex : TAP1-TAP2), une grande quantité de gènes n'ont aucune relation avec la fonction immunitaire. Il existe également certaines gènes qui ne sont pas encodés dans ce locus mais qui jouent un rôle structural (ex : $\beta 2m$) ou fonctionnel (ex : chaîne invariante) dans la présentation par les molécules du CMH. C'est au milieu des années 80 que les trois gènes classiques du CMH de classe II (HLA-DR, -DP et -DQ) ont été découverts, notamment à cause de leur capacité à stimuler des lymphocytes T allogéniques. Grâce à leur ressemblance aux molécules classiques du CMH, deux autres gènes ont par la suite été repêchés par hybridation à basse stringence, soit les gènes *DZA* (renommé *DNA* et éventuellement *DOA* [HLA-DO α]) et *DOB* [HLA-DO β] (4-7). A l'opposé des

chaînes α et β des molécules de classe II classiques qui sont codés en paire sur le locus, les gènes *DOA* et *DOB* sont situés à plus de 200kb l'un de l'autre avec la présence de plusieurs gènes intercalés, notamment les gènes *TAP1/TAP2* et *LMP2/LMP7* (8). Pour sa part, *HLA-DM* n'a pas été isolé par hybridation mais il a plutôt été découvert par séquençage (9). Les gènes codant pour les chaînes $DM\alpha$ et $DM\beta$ sont situés à proximité au niveau du centromère.

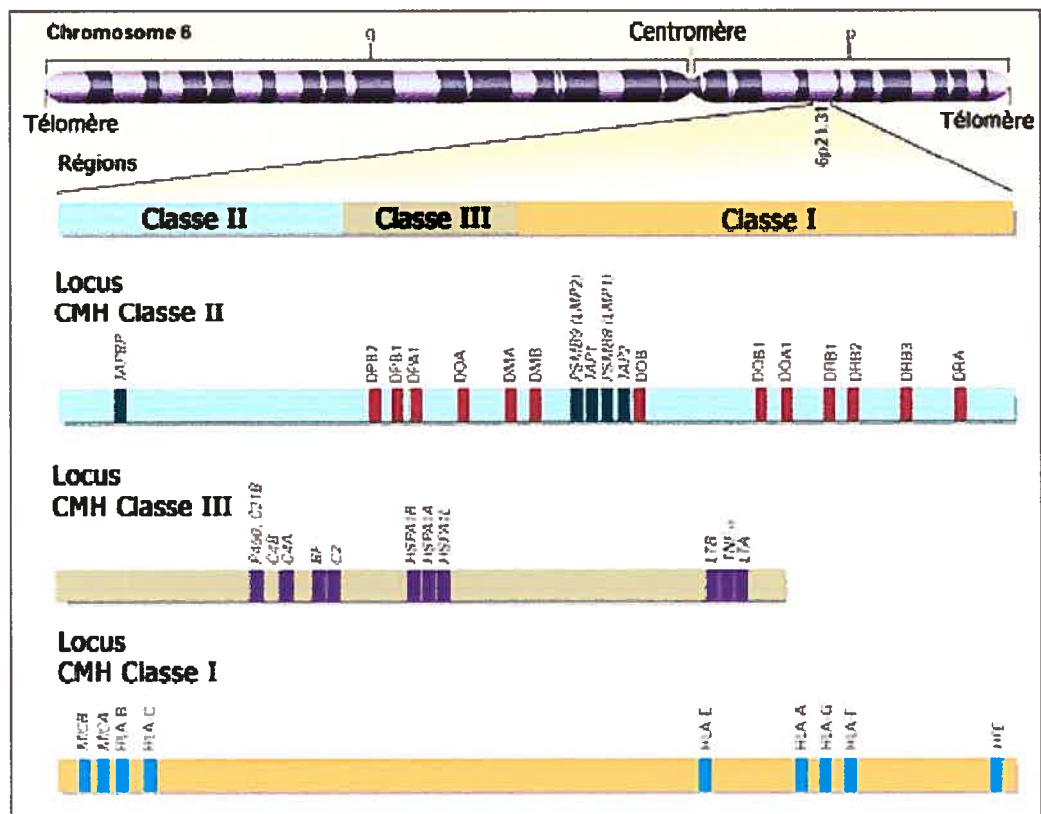


Figure 1.4 Locus du complexe majeur d'histocompatibilité.

Le locus du CMH est positionné sur le bras court du chromosome 6 chez l'humain. Le complexe génétique représente environ le millième du génome humain, soit $3,5 \times 10^3$ kb (Traduit de Klein *et al.*, 2000 (1)).

1.2 CMH de classe I : Un aperçu

Pour palier à l'infection de cellules par des virus ou autres pathogènes intracellulaires, le système immunitaire a développé une stratégie visant à se débarrasser de ces cellules devenues une source potentielle de danger. En effet, l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ permet à l'organisme de détruire des cellules infectées en reconnaissant des antigènes d'origine intracellulaire liés aux molécules de classe I. Pour des raisons de contrôle, la majorité des cellules nucléées de l'organisme expriment donc des molécules de classe I, dans l'éventualité où l'organisme devrait rapidement se départir de ces cellules.

Au niveau de l'organisation génique, les molécules de classe I sont encodées au niveau de trois loci polymorphes du complexe majeur d'histocompatibilité: HLA-A,-B et C. Chaque gène code pour une chaîne lourde glycoprotéique d'environ 275 acides aminés. Une fois synthétisée dans le réticulum endoplasmique, cette chaîne devra s'associer avec une deuxième structure, la chaîne β 2m (β ₂ microglobuline), afin de former une molécule de classe I complète. Cette étape nécessite la calnexine, une protéine chaperonne qui assiste la chaîne lourde jusqu'à la rencontre de la chaîne β 2m. L'association à la β 2m coïncide avec le remplacement de la calnexine par la calréticuline ainsi que la participation de ERp57, la tapasine et le complexe TAP constitué de TAPI et TAPII (voir York et Rock, 1996 (10) pour une revue complète sur la voie des molécules de classe I).

Les molécules TAP font partie de la famille des ABC transporteurs (*ATP-binding cassette*) et permettent le transfert de peptides (générés surtout grâce à l'action du protéasome) du cytosol au réticulum endoplasmique. La liaison du peptide à la niche complète la maturation de la molécule de classe I qui peut alors sortir du RE pour accéder à la surface cellulaire. Pour sa part, la tapasine favorise le chargement de peptides en guidant la molécule de classe I au complexe TAP. Elle agirait également comme chaperon en préservant la capacité des molécules de classe I à lier des peptides (11). La tapasine jouerait donc un rôle similaire à celui de HLA-DM (voir section 1.5) qui est retrouvé au niveau de la voie de présentation des molécules de classe II.

1.3 CMH de classe II classique

Le rôle des molécules de classe II classiques est de présenter des peptides antigéniques de source extracellulaire aux lymphocytes T CD4⁺ afin de soutenir la réponse immunitaire. Il existe trois isotypes chez l'humain (HLA-DP, -DQ, -DR) et deux chez la souris (IA [gène H2-A] et IE [gène H2-E]). Ces molécules sont des glycoprotéines transmembranaires de 55-60 kDa, composées de deux chaînes associées de façon non-covalente et forment un hétérodimère: une chaîne α d'environ 31-34 kDa et une chaîne β de 26-29 kDa (12). Les deux chaînes sont glycosylées au niveau de résidus asparagine grâce à la présence de motifs consensus Asn-X-Ser/Thr, à raison de deux modifications pour la chaîne α et de une modification pour la chaîne β . Chacune des chaînes est composée de deux

domaines extracellulaires N-terminaux ($\alpha 1/\alpha 2$ et $\beta 1/\beta 2$) d'environ 90 résidus chacun, un domaine transmembranaire hydrophobe et un domaine C-terminal intra-cytoplasmique (voir figure 1.2). Chaque domaine correspond également à un exon du gène, à l'exception de la région transmembranaire et du domaine cytoplasmique de la chaîne α qui partagent le même exon (12).

D'autre part, le niveau de polymorphisme retrouvé chez les molécules de classe II classiques est assez impressionnant. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'il est difficile d'effectuer des greffes de tissus sans rejet. Ce polymorphisme peut dériver de chacune des chaînes α et β , mais ceci dépend de l'isotype. Pour HLA-DR, la chaîne DR α exprime seulement 2 allèles et pratiquement tout le polymorphisme est retrouvé au niveau de la chaîne β . Le gène HLA-DRB1 est le plus polymorphe de tous les gènes de classe II avec plus de 221 allèles (12). Pour HLA-DP et HLA-DQ, on observe du polymorphisme au niveau des deux chaînes, mais avec une variation plus prononcée pour la chaîne β .

1.3.1 Distribution cellulaire

À la différence des molécules de classe I qui sont exprimées à la surface de toutes les cellules possédant un noyau, les molécules du CMH de classe II sont exprimées à la surface d'un type limité de cellules dites cellules présentatrices d'antigènes (CPA). On retrouve donc des molécules de classe II principalement au niveau des lymphocytes B, des macrophages et des cellules dendritiques. Ces cellules ont toutes la capacité d'internaliser des protéines d'origine extracellulaire

et de les dégrader en peptides au niveau de leurs compartiments intracellulaires. La méthode d'internalisation peut différer pour chaque type cellulaire. Alors que les cellules dendritiques scrutent le milieu ambiant en absorbant les protéines par endocytose, les macrophages préfèrent utiliser des récepteurs comme les récepteurs Fc- γ (FcR γ) qui reconnaissent des complexes anticorps-antigène ou bien d'autres récepteurs qui reconnaissent les composantes bactériennes. Pour leur part, les cellules B sont capables d'internaliser efficacement des antigènes liés par leurs immunoglobulines de surface. Elles peuvent toutefois absorber des antigènes non spécifiques par endocytose, surtout lorsque les doses antigéniques sont élevées.

L'expression des molécules du CMH-II dépend de l'état de différenciation et d'activation des cellules. Par exemple, seules les cellules B matures expriment les molécules de CMH-II, contrairement aux cellules immatures et aux plasmocytes qui n'en expriment pas. Pour leur part, les cellules dendritiques semblent être soumises à une régulation plus complexe. En effet, une cellule immature exprime un faible niveau d'expression de surface des molécules de classe II. Après une exposition à des produits bactériens ou stimuli inflammatoires, les cellules enclenchent un processus de maturation qui mène à une forte expression de surface des molécules de classe II accompagnée d'une endocytose réduite (revu par Thery *et al.* (13)). Dans le thymus, les molécules CMH-II sont exprimées sur les cellules épithéliales du cortex et de la médula ainsi que sur les cellules dendritiques d'origine hématopoïétique. Enfin, des tissus non

lymphoïdes comme certains endothéliums expriment également des produits de classe II de façon constitutive alors que beaucoup de tissus peuvent exprimer des molécules de classe II sous l'influence de l'IFN- γ (revu par Boehm *et al.*, 1997 (14)).

1.3.2 Régulation génique

Au niveau transcriptionnel, l'expression des molécules de classe II est contrôlée par des séquences conservées situées au niveau des promoteurs: les boîtes W, X (X1 et X2) et Y. Ces motifs servent d'attache à de nombreux facteurs de transcription comme NF-Y, RFX5, RFXANK, CREB-1 (voir figure 1.5). La seule présence de ces facteurs n'est pas suffisante pour stimuler l'expression des molécules de classe II. En effet, le transactivateur CIITA (*class II transactivator*) est l'élément clé permettant une régulation constitutive (15) ou inductible à l'interféron- γ des molécules de classe II (16, 17).

CIITA est essentiel afin de permettre la transcription de tous les gènes qui codent pour les molécules de classe II (18). Contrairement aux autres facteurs décrits précédemment, CIITA ne lie pas directement l'ADN. Il interagit plutôt avec des facteurs déjà présents (voir figure 1.5) au niveau des régions promotrices des gènes de classe II (19). Ces interactions multiples permettent la formation d'un complexe transcriptionnel efficace qui conduira à l'expression des molécules de classe II.

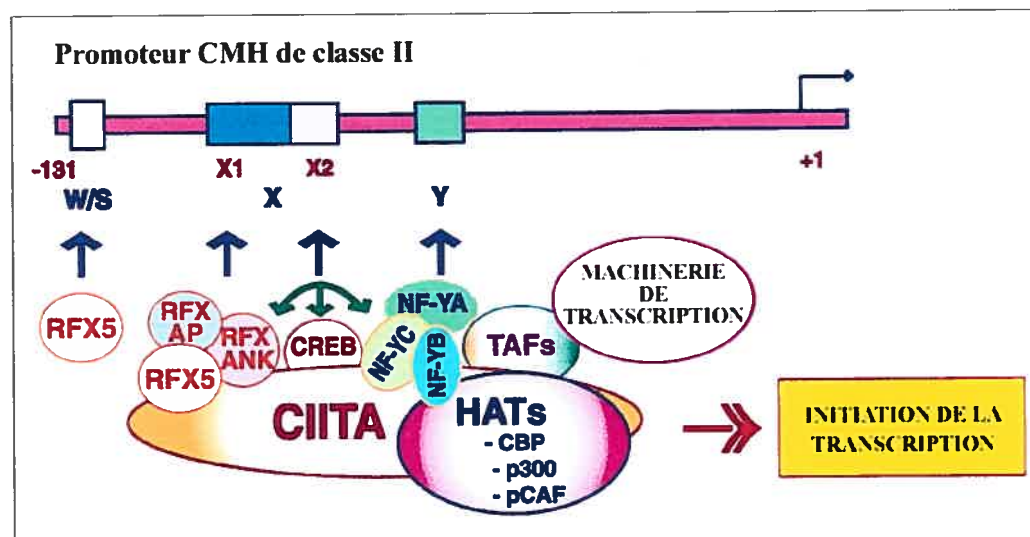


Figure 1.5 Promoteur des CMH de classe II et complexe transcriptionnel.

Représentation du promoteur typique des gènes du CMH de classe II ainsi que les facteurs de liaison à l'ADN permettant au transactivateur CIITA de réguler l'expression des molécules de classe II (Adapté de Ting *et al.*, 2002 (19)).

1.3.3 Présentation antigénique par les molécules de classe II

1.3.3.1 Biosynthèse et ciblage

Rapidement après leur synthèse dans le réticulum endoplasmique, les chaînes α et β des molécules de classe II s'associent avec la chaîne invariante (Ii) pour former des complexes nonamériques. Ces complexes sont constitués de trois chaînes invariantes centrales entourées de trois hétérodimères de classe II (voir figure 1.6). La chaîne invariante interagit essentiellement avec la niche peptidique de la molécule de classe II, empêchant par le fait même la liaison de peptides du soi retrouvés au niveau du réticulum endoplasmique (20). Ii joue également un rôle important au niveau du ciblage du complexe. En effet, elle contient deux signaux de type dileucine encodés dans sa queue cytoplasmique (21) qui

permettent d'une part au complexe de se diriger vers les compartiments endosomaux majeurs où s'effectue le chargement peptidique sur les molécules de classe II (22), et permettent également d'y être retenu.

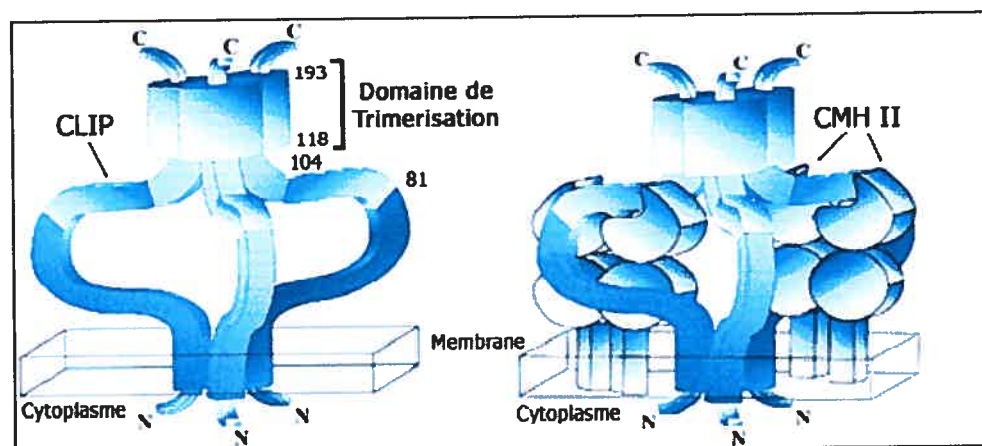


Figure 1.6 Modèle du trimère de Ii et du complexe CMH-II / Ii

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 (Traduit de Cresswell, P., 1996 (23)).

La façon dont les complexes CMH-II/Ii accèdent au système endosomal n'est pas encore bien défini (voir figure 1.7). Plusieurs études morphologiques et biochimiques ont suggéré une voie directe du réseau trans-golgien vers les compartiments endosomaux (24, 25). Toutefois, une certaine quantité de complexes CMH-II/Ii ont été retrouvés à la surface cellulaire. Cette observation suggère donc qu'une partie des molécules de classe II fraîchement synthétisées puissent transiter vers la surface avant d'atteindre les compartiments lysosomaux (26, 27). Une fois rendue dans ces compartiments, la chaîne invariante est progressivement dégradée par des protéases comme la cathepsine L et S (28, 29). Cette dégradation n'est pas complète puisqu'un fragment restera associé avec la

niche peptidique de la molécule de classe II. En effet, le CLIP (*class II-associated invariant chain peptides*) est protégé de la dégradation et restera dans la niche jusqu'à ce qu'un autre peptide occupe la place. La dissociation de CLIP peut se faire spontanément chez certaines molécules de classe II, mais il a été démontré qu'en général cette étape requiert la présence de HLA-DM, une molécule qui catalyse la relâche de CLIP et favorise le chargement de nouveaux peptides. HLA-DM peut être influencé par une autre molécule de classe II, HLA-DO, qui semble moduler son activité. Ces deux dernières molécules vont être décrites plus en détail à partir de la section 1.4.

1.3.3.2 Rôle chaperon de la chaîne invariante

En plus de cibler les molécules de classe II dans les bons compartiments de présentation, la chaîne invariante agirait aussi comme chaperon moléculaire. En effet, une absence de Ii démontre une agrégation prématurée des molécules de classe II dans le RE (30). De plus, il a été démontré que la chaîne invariante peut corriger l'agrégation de ces molécules (31). La chaîne invariante n'est pas obligatoire afin d'exprimer des molécules de classe II en surface (32). Toutefois, l'expression de surface des molécules de classe II est significativement réduite en absence de Ii (33-35).

Ii agirait également afin de stabiliser les molécules de classe II. En effet, l'absence de Ii démontre une réduction d'efficacité de chargement peptidique sur les molécules de classe II (34). Par sa liaison à la niche peptidique, Ii permettrait

également d'assister la molécule de classe II au niveau de son repliement et favoriserait ainsi sa sortie du RE (36). Cette fonction rappelle le rôle des peptides antigéniques pour les molécules de classe I, où la liaison peptidique permet le transport des complexes vers la surface cellulaire. La chaîne invariante peut donc être considérée comme un substrat temporaire qui agit comme chaperon envers les molécules de classe II fraîchement synthétisées.

1.3.3.3 Nature des compartiments de présentation MIIC

Plusieurs études ont tenté de définir le type de compartiments endosomaux/lysosomaux où les molécules de classe II acquièrent leurs peptides. Par microscopie électronique, les premières expériences ont démontré que la majorité des molécules de classe II étaient localisées dans des structures lysosomales multilamellaires nommées MIIC (*MHC class II compartments*) (24, 37). Par la suite, plusieurs groupes ont décrit d'autres types de compartiments de présentation possédant des caractéristiques propres aux endosomes et aux lysosomes (38-41). Le terme MIIC a donc été élargi afin d'inclure tout compartiment (de nature endosomale ou lysosomale) contenant des molécules de classe II (voir figure 1.7)

Il n'y a pas de réponses claires quant à la nature exacte des compartiments où le chargement peptidique aurait lieu. En effet, une des premières études propose que les molécules de CMH-II soient directement dirigées dans un compartiment pré-lysosomal non classique (MIIC) où elles s'accumuleraient et où

s'effectueraient le chargement des peptides antigéniques (37). Toutefois, la présence de complexes CMHII-Ii ainsi que le chargement de peptides antigéniques ont été observées dans de multiples sous-compartiments endosomaux classiques (27, 42). De plus, la molécule HLA-DM (catalyseur de l'échange de CLIP) est retrouvée tout le long de la voie endosomale tardive dans des organelles non distinguables des endosomes conventionnels (43).

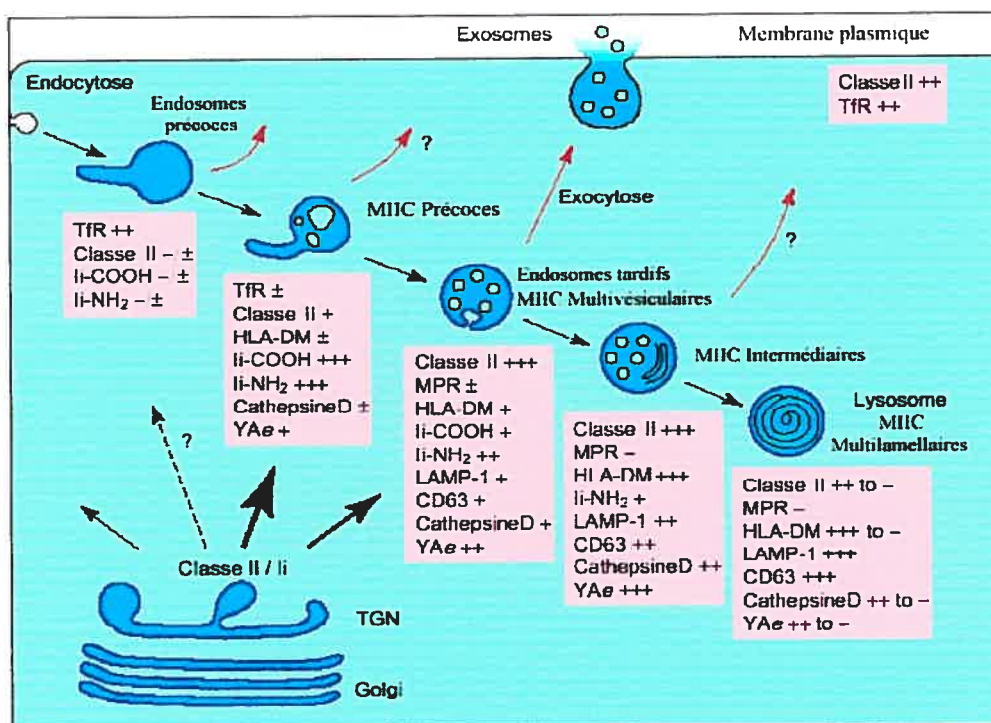


Figure 1.7 Voie endosomale et route des molécules du CMH-II.

Après leur passage dans le réseau trans-golgien (RTG), les molécules de classe II passent par la voie endosomale pour atteindre les lysosomes. Une fraction se rend directement en surface pour être ensuite endocytée alors qu'une grosse portion est dirigée directement aux MIIC précoces ou aux endosomes tardifs (flèches noires). Les complexes CMHII-peptides quitteraient la voie endosomale de plusieurs façons (flèches rouges). La liste des marqueurs est indiquée pour chaque compartiment. *Abréviations : Ii = chaîne invariante, LAMP-1 = lysosome-associated membrane protein, MIIC = MHC class II compartment, MPR = mannose 6-phosphate receptor, TfR = transferrin receptor.* (Traduit de Geuze, 1998 (44)).

La présence de classe II dans différents compartiments permettrait l'accès à un plus large éventail d'antigènes qui sont potentiellement présents tout le long de la voie endocytaire. Cette possibilité est en accord avec des expériences démontrant que les molécules de classe II peuvent lier des peptides non seulement dans les lysosomes, mais également au niveau des endosomes précoces (27).

1.3.3.4 Rôle des protéases au niveau des MIIC

Après leur internalisation par les cellules présentatrices d'antigènes, les antigènes de source exogènes vont transiter le long de la voie endocytaire et rencontrer une série d'enzymes permettant de les couper, de les modifier et de les apprêter afin que ces derniers puissent être présentés par les molécules de classe II du CMH. Cette dégradation est partielle et ne doit pas être complète afin d'obtenir des polypeptides capables d'interagir avec les molécules du CMH. Il existe une quantité impressionnante d'enzymes protéolytiques exprimées dans les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme la cathepsine de type « *aspartic proteases* » CatD, les cathepsines de type « *cystein proteases* » CatB,F,H,L,S,Z ainsi que l'AEP (*asparaginyl endopeptidase*). Ces enzymes sont synthétisées sous forme de proenzyme dans le RE et restent inactives jusqu'à leur maturation dans la voie endosomale. Cette maturation s'effectue par phénomène d'autocatalyse ou bien par l'action d'autres protéases et permet ainsi leur pleine activité protéolytique (45).

L'exposition des antigènes aux environnements acides constitue une première étape dans l'apprêtement antigénique. En effet, ce changement de pH permet d'une part d'initier le relâchement structural des protéines mais également de favoriser la réduction des ponts disulfures. Malgré des connaissances limitées dans ce domaine, l'enzyme GILT (*Gamma-interferon-Inducible Lysosomal Thiol reductase*) semble être une candidate impliquée dans ce processus puisqu'elle est capable de réduire les ponts disulfures à pH acide. Elle est aussi exprimée de façon constitutive dans les CPA professionnelles en plus d'être induite par l'interferon gamma dans les autres tissus. Enfin, cette dernière est présente dans les mêmes compartiments tardifs où se retrouvent les molécules de classe II (46, 47). Par ailleurs, d'autres éléments peuvent également influencer l'accessibilité des protéases comme le niveau de glycosylation des protéines, la liaison des antigènes avec leur récepteur durant l'internalisation (ex : liaison au BCR) ainsi que la liaison précoce des antigènes avec les molécules de classe II (48, 49).

1.3.4 Structure des molécules de classe II

Depuis une dizaine d'années, plusieurs groupes ont pu résoudre par cristallographie à rayons X la structure en trois dimensions de certaines molécules de classe II chez l'humain (50-57) ainsi que chez la souris (58-62). Comme on peut le constater à la lumière de ces résultats, les régions $\alpha 1$ et $\beta 1$ de la molécule s'assemblent pour former la niche peptidique (voir figure 1.8a). Les premiers acides aminés de chaque chaîne (région N-terminale) forment le plancher de la niche en se repliant sous forme de feuillets beta antiparallèles. Cette région N-

terminale est en grande partie responsable de la bonne interaction entre les chaînes α et β . En effet, comme on peut le voir à la figure 1.8b, de nombreux ponts hydrogènes permettent au premier feuillet de chaque chaîne d'interagir. De plus, avant même la résolution des cristaux de classe II, des études d'interaction entre différents allèles du CMH avait révélé que la région N-terminale du classe II (surtout la chaîne beta) était essentielle à la bonne conformation des hétérodimères et au transport éventuel de ces molécules vers la surface cellulaire (63-65).

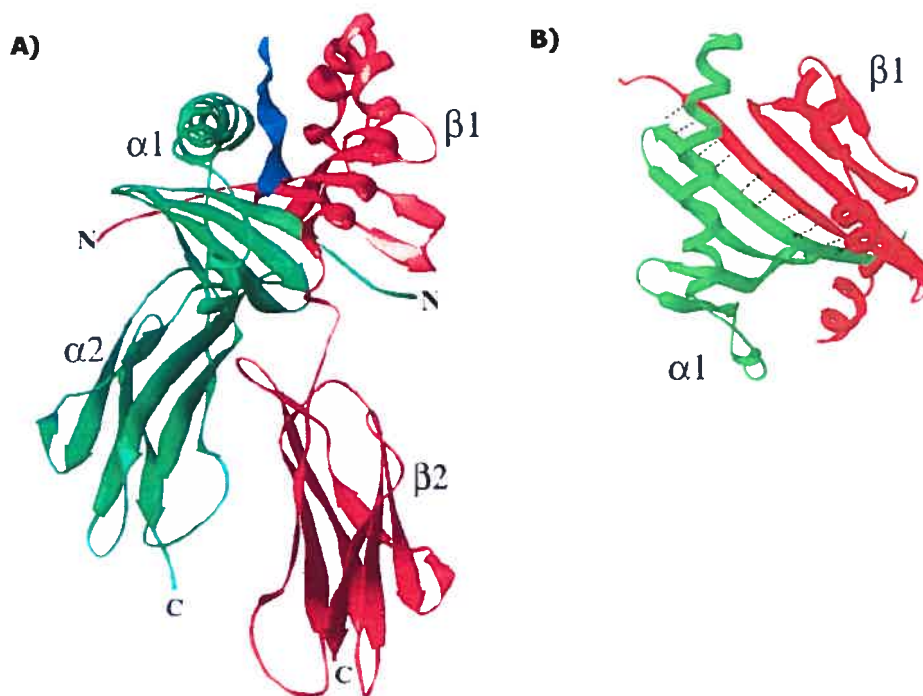


Figure 1.8 Structure tridimensionnelle d'une molécule du CMH de classe II (HLA-DR1).

(A) La chaîne α (verte) et la chaîne β (rouge) interagissent avec un peptide (bleu) pour former la molécule de classe II complète. Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ forment la niche peptidique alors que les régions $\alpha 2/\beta 2$ se replient en domaines Ig. (B) Vue aérienne de la niche peptidique des molécules de classe II classiques. Les premiers feuillets de chaque chaîne α/β s'associent de façon non covalente par de nombreux ponts hydrogènes (lignes pointillées noires) (Adapté de Batalia et Collins, 1997 (66)).

Deux hélices alpha (une sur chaque chaîne) forment ensuite la partie latérale de la niche qui est ouverte à chaque extrémité, ce qui laisse place à de plus longs peptides que ceux retrouvés sur les molécules de classe I. Cette niche peptidique repose sur les domaines $\alpha 2$ et $\beta 2$, qui ont une structure apparentée à celle de la superfamille des immunoglobulines. Une région transmembranaire, formée également des deux chaînes, permet ensuite d'ancrer la molécule dans la membrane plasmique. Enfin, la région C-terminale de l'hétérodimère est formé de queues cytoplasmiques pouvant encoder certains signaux de ciblage.

1.3.5 Liaison CMH/Peptide

Contrairement aux molécules de classe I qui peuvent lier des peptides d'une longueur d'environ 8 à 10 acides aminés, les molécules de classe II peuvent accommoder un plus large éventail de peptides. En effet, même si la longueur moyenne de ces peptides se situe entre 13 et 17 acides aminés, certaines études ont démontré que la molécule de classe II pouvait lier de plus gros peptides (67), allant même jusqu'à la liaison de protéines pleine longueur (68). Cette polyvalence est due à la forme de la niche peptidique qui n'est pas refermée à son extrémité comme c'est le cas chez les molécules de classe I. Il est donc probable que la dégradation de l'antigène et sa capture par les molécules du CMH-II ne soient pas des phénomènes indépendants. En effet, l'antigène en cours de dégradation pourrait être capturé sous forme de longs fragments peptidiques. Sa dégradation se poursuivrait par digestion autour de la région protégée par la molécule du CMH (69).

Malgré une grande variabilité au niveau de la longueur des peptides, la séquence protéique formant un contact avec la niche peptidique est en général de 9 acides aminés. Ce contact dépend de plusieurs facteurs, mais il est surtout dicté par le niveau de polymorphisme de la molécule de classe II. En effet, la majorité du polymorphisme rencontré chez les molécules de classe II est constitué de résidus pointant vers l'intérieur de la niche peptidique qui formeront un contact avec les peptides (70). Ces résidus sont surtout retrouvés au niveau des hélices alpha de la région $\alpha 1/\beta 1$ ainsi que le plancher peptidique formé des feuilletts beta. Un niveau limité de polymorphisme existe aussi dans des régions externes à la niche peptidique.

Les études de cristallographie ont permis de mieux comprendre la façon dont les peptides forment un contact avec la niche peptidique des molécules de classe II. En effet, l'une des premières études clés à décrire cette liaison a été effectuée par le groupe de Don Wiley en utilisant le peptide HA (306-318) associé à la molécule HLA-DR1 (51). L'étude, ainsi que plusieurs autres par la suite (54, 58), démontre que le peptide adopte une conformation hélicoïdale de type polyproline-II (voir figure 1.9a). Il est intéressant de noter que tous les peptides, malgré leur séquence distincte, vont adopter le même genre de conformation (voir figure 1.9b). Cette structure secondaire fait en sorte que le peptide aura certains points d'ancrage dans la niche peptidique alors que d'autres résidus pourront pointer à la surface du complexe MHC/peptide afin de pouvoir faire contact avec le TCR. Le peptide est également orienté dans le même sens que l'hélice de la

chaîne alpha, donc la portion N-terminale du peptide est situé à proximité de la région N-terminale de cette même hélice (voir figure 1.9a).

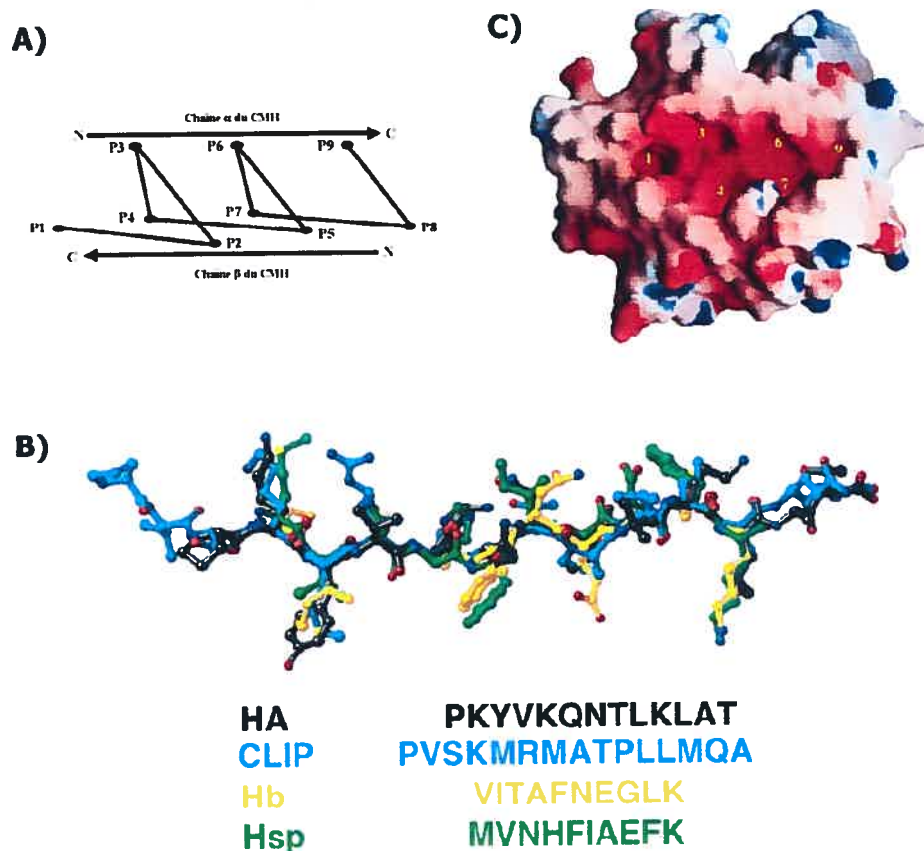


Figure 1.9 Orientation du peptide dans la niche peptidique du classe II.

(A) Schéma de la conformation en hélice polyproline de type II (ppII) des peptides occupant la niche peptidique des classe II. Les résidus du peptide sont identifiés dans l'ordre, de P1 à P9. (B) Alignement de quatre peptides liés aux molécules de classe II. Chaque peptide adopte une structure hélicoïdale ppII et sont pratiquement superposables. (C) Représentation de la niche peptidique d'une molécule HLA-DR1. Les pochettes pouvant accueillir les chaînes latérales des peptides sont indiquées par des numéros. Ces numéros correspondent à la position des résidus du peptide pouvant occuper la pochette (Adapté de Batalia et Collins, 1997 (66)).

De façon plus détaillée, il a été démontré qu'une série de liens hydrogènes permettent de relier les chaînes α et β de la molécule de classe II au peptide antigénique (voir figure 1.10). Il existe 11 ponts hydrogènes conservés impliquant des résidus retrouvés chez la plupart des molécules de classe II (71). Ces liaisons n'impliquent pas les chaînes latérales des peptides antigéniques et pourraient donc servir à lier tous les peptides d'une façon générale. En revanche, l'intérieur de la niche peptidique des molécules de classe II possèdent des cavités permettant de lier les chaînes latérales des peptides (voir figure 1.9c). Ces cavités ou pochettes sont formés de résidus polymorphes et sont ainsi responsables de la variation de reconnaissance des peptides entre les différentes molécules de classe II. Il existe 6 pochettes nommées respectivement P1,P3,P4,P6,P7 et P9, le numéro correspondant à la position des acides aminés du peptide qui occupera chaque cavité. La première poche (P1) peut accommoder des chaînes latérales hydrophobes et est composée de résidus qui sont généralement conservés alors que les pochettes P4 et P6 constituent les régions les plus polymorphes.

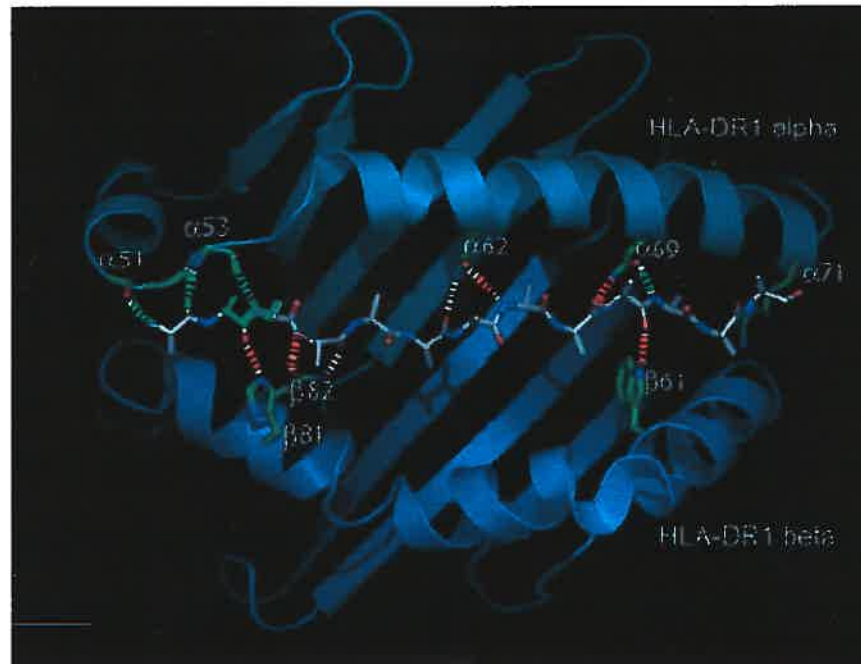


Figure 1.10 Interaction entre le peptide et la niche du classe II.

Représentation de la niche peptidique d'une molécule HLA-DR1 liant un peptide HA. Une série de ponts hydrogènes conservés (lignes pointillées) permettent le contact entre la niche de la molécule de classe II et le peptide (Adapté de Stratikos et al., 2004 (72)).

1.3.6 Formation des hétérodimères de classe II

L'expression des molécules de classe II à la surface des cellules demande une association préalable des chaînes α et β dans le réticulum endoplasmique, et de façon générale, seules les chaînes d'un même isotype peuvent s'associer de façon efficace. DRalpha, qui exprime majoritairement un seul allèle, peut s'associer avec n'importe quel des allèles de la chaîne DRbeta. En revanche, il existe plusieurs allèles différents pour chacune des chaînes α et β des gènes DP et DQ. Certains groupes ont donc vérifié si l'expression efficace des molécules de classe II en surface pouvait dépendre du type d'allèle rencontré. Plusieurs

expériences ont montré que les paires α/β provenant d'haplotypes « correspondants » (chaînes encodées en cis sur le même chromosome) démontrent une expression forte et uniforme des molécules de classe II. Pour leur part, les combinaisons d'haplotypes « non-correspondants » (chaînes exprimées en *trans* sur des chromosomes différents) démontrent des variations d'efficacité qui vont d'une expression normale à une expression complètement déficiente (73-75).

L'utilisation d'un système de transfection dans des cellules exemptes de molécules de classe II endogènes a également permis de confirmer cette variabilité au niveau de l'expression de diverses combinaisons de chaînes α/β (63, 65, 76). En effet, ces études ont démontré que la variabilité est surtout due à du polymorphisme retrouvées au niveau de la région N-terminale des chaînes β . Des expériences plus poussées ont même permis de conclure que les sites d'incompatibilité menant à l'expression déficiente ou très faible de certaines combinaisons α/β étaient situées principalement au niveau de l'interaction des feuilletts beta ainsi qu'une région secondaire située à la fin des hélices alpha (63, 64, 77, 78).

Le groupe de Ronald Germain a tenté de définir biochimiquement la cause de ces différents phénotypes d'expression (79). Alors que la formation des hétérodimères semblait normale dans tous les cas observés, des expériences de digestion à l'endoglycosidase H ont démontré une incapacité de certaines combinaisons à progresser vers l'appareil de Golgi. Cette rétention explique la

faible expression de surface de ces hétérodimères et suggère qu'une conformation inadéquate causée par un mauvais appariement des domaines N-terminaux puisse mener à un transport intracellulaire déficient des molécules de classe II. Toutefois, il semble que les domaines N-terminaux ne soient pas les seules régions à influencer la formation des hétérodimères. En effet, des expériences effectuées avec différents allèles de DQ ont permis de conclure que le domaine $\beta 1$ de DQ β (résidus polymorphes 60 à 90 correspondants à l'hélice α) contenait des éléments affectant l'expression stable des hétérodimères (80). De plus, il a été démontré que les régions transmembranaires de chacune des chaînes α et β occupaient également un rôle dans la formation des hétérodimères de classe II puisque la mutation de plusieurs résidus dans ces domaines provoque la rétention du complexe dans le RE (81).

D'autre part, il existe un autre mécanisme indépendant de la conformation qui peut influencer l'expression des molécules de classe II en surface. Dans les cellules qui expriment plus d'une combinaison α/β , une compétition peut survenir entre les précurseurs des chaînes synthétisées. En effet, des hétérodimères de classe II exprimés modérément lorsqu'une seule chaîne α et β est présente deviennent indétectables si certains partenaires privilégiés (provenant du même haplotype par exemple) de l'une ou l'autre des chaînes sont co-synthétisés (82, 83).

1.3.7 Formation de paires mixtes inter-isotypes

Pour un même isotype (ex : HLA-DQ), de nombreuses études ont démontré que la chaîne α ou β d'un haplotype donné pouvait s'associer avec une chaîne complémentaire d'un autre haplotype. Mais de façon surprenante, certains groupes ont également noté qu'il était possible de former des paires inter-isotypiques, c'est-à-dire d'associer une chaîne alpha provenant d'un isotype (ex : DR α) avec une chaîne beta provenant d'un autre isotype (ex : DQ β). En effet, l'expérience la plus directe prouvant l'assemblage et l'expression de surface de paires isotypique hybrides de molécules de classe II a été effectuée par le groupe de Dominique Charron. Dans cette étude, l'analyse par gel électrophorèse à deux dimensions révèle la présence surprenante d'un complexe DR α -DQ β dans les cellules PGF, une lignée B humaine transformée par EBV (84).

Toutefois, bien que cette lignée exprime les paires normales DR $\alpha\beta$ et DQ $\alpha\beta$, elle n'exprime pas la combinaison DQ α -DR β . Chez la souris, des systèmes de transfections ont également permis de former ce type de paires mixtes à la surface cellulaire en utilisant les gènes $E^{a/k}_\alpha$ (homologue de DR α) et A^d_β (homologue de DQ β) (85, 86). Selon ces dernières études, un hybridome T (AODH-7.1) pouvait même être stimulé par ce type d'hétérodimère en présence d'antigènes alors qu'un autre groupe identifiait un lymphome B (2PK3) qui exprimait la paire mixte isotypique E^d_α - A^d_β comme élément majeur à sa surface cellulaire (87).

D'autre part, il est possible d'utiliser des systèmes de paires mixtes isotypiques afin d'étudier la formation des hétérodimères de classe II. En effet, l'utilisation d'une chaîne β chimérique contenant différentes séquences de DP et DR a permis de montrer que ces deux isotypes avaient des exigences structurales différentes afin de former des hétérodimères stables (88). Par exemple, une chimère contenant les 22 premiers acides aminés de DR β est capable de former une paire stable avec DR α . En revanche, les 22 premiers acides aminés de DP β ne sont pas suffisants afin de former un complexe stable avec DP α . Cette paire mixte exige plutôt la participation des 43 premiers acides aminés.

En s'inspirant sur ce type de chimère, il a par la suite été démontré qu'il était possible de former de nouvelles paires mixtes isotypiques entre la chaîne DR α et la chaîne β d'une molécule de classe II non classique HLA-DO (89). En effet, la substitution des 18 premiers acides aminés de la chaîne DO β par DR β (DR β_{18} /DO β) est suffisante afin de former des paires mixtes stables entre DR α et DO β . Ce système a été utilisé abondamment par notre groupe et sera traité plus en détail dans les prochains chapitres.

1.4 CMH de classe II non classique

La présentation antigénique demande la participation de molécules accessoires qui serviront à moduler le type de peptides présentés par les molécules classiques du CMH de classe II. Nous avons décrit précédemment la

chaîne invariante qui joue un rôle important dans ces processus. Il existe toutefois d'autres molécules accessoires qui appartiennent à la catégorie des molécules de classe II dites non classiques et qu'on retrouve sous deux isotypes : HLA-DO et HLA-DM (H2-O et H2-M chez la souris). Ces molécules sont très similaires en séquence ou en structure aux autres molécules de classe II. De plus, ils sont situés dans le locus du CMH à proximité des molécules de classe II classiques. Pour ces raisons, elles appartiennent à la famille des molécules du CMH de classe II. Toutefois, ces molécules sont peu polymorphes. Elles sont donc considérées comme des molécules non classiques.

Ces molécules possèdent également des caractéristiques qui les distinguent des autres. En effet, à la différence des molécules classiques qui vont être exprimées à la surface des cellules afin de présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T, les molécules non classiques sont très peu exprimées en surface et vont plutôt être concentrées à l'intérieur des compartiments lysosomiaux (90, 91). De plus, ces molécules sont incapables de lier des peptides dans leur niche (voir figure 1.11). Elles ne peuvent donc pas jouer de rôles directs dans la présentation aux lymphocytes T. Une autre caractéristique qui les distingue concerne le faible niveau de polymorphisme rencontré et le haut niveau de conservation inter-espèces (6, 92). En effet, les chaînes α et β de DM et DO comptent très peu d'allèles (entre 3 et 8 allèles) alors qu'on retrouve facilement plus de 220 allèles différents chez certains isotypes de classe II classiques comme le gène DR β 1 (12).

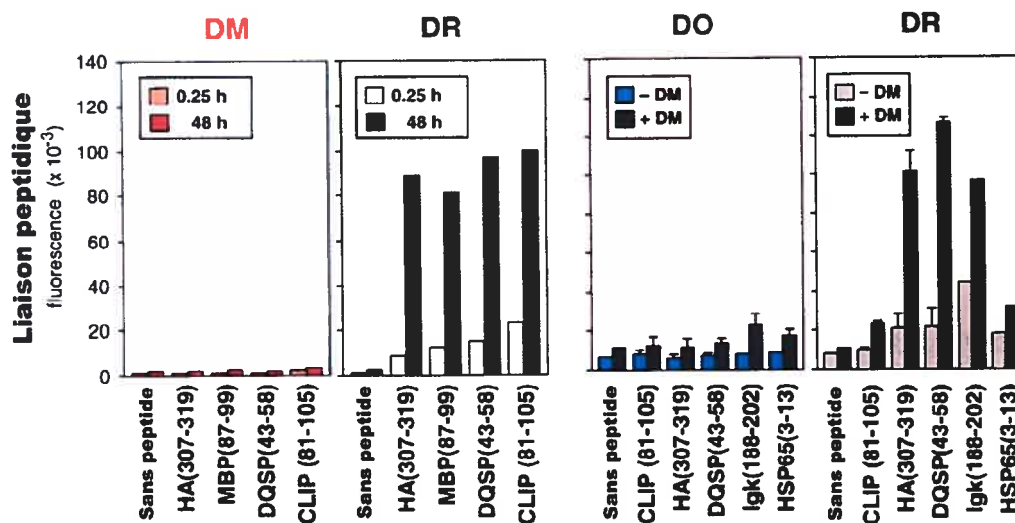


Figure 1.11 Les molécules de classe II non classiques HLA-DO et HLA-DM ne peuvent lier de peptides.

Des molécules purifiées de DM ne peuvent lier de peptides, même après 48 heures d'incubation (premier panneau). HLA-DO ne peut non plus lier de peptides, même en présence de DM (troisième panneau). En comparaison, HLA-DR lie très bien tous les peptides utilisés (deuxième panneau) et cette liaison est améliorée par la présence de DM (dernier panneau) (Traduit de Kropshofer *et al.*, 1999 (93)).

Par ailleurs, un autre gène de classe II non classique retrouvé seulement chez la souris été caractérisé: le gène H2-Eb2 (94). Il est induit de la même façon que le gène H2-Ob et il est retrouvé au niveau des cellules B. Toutefois, aucune chaîne α correspondante n'a été identifiée jusqu'à maintenant et on ne sait si E β 2 fait partie d'une protéine fonctionnelle.

1.5 HLA-DM

Il est possible de former des complexes CMH/peptides en incubant des peptides antigéniques avec des molécules de classe II purifiées ou exprimées à la

surface des cellules, mais ce processus est lent et demande d'être catalysé (95). La première évidence qu'une telle activité devait être régulée s'est présentée lors de l'analyse de lignées cellulaires mutantes qui comportaient des défauts majeurs au niveau de la présentation antigénique aux lymphocytes T CD4⁺, et ce malgré la présence normale de molécules de classe II classiques (96). En analysant ces molécules de classe II de plus près, on remarque qu'elles sont plus sensibles au SDS et que la niche peptidique n'est pas vide, mais accumule plutôt un éventail limité de peptides (CLIP) qui sont en majorité dérivés de la chaîne invariante (97, 98). Le rôle de DM a été clarifié lors d'études ultérieures qui ont démontré, par analyse génétique, que le défaut était imputable à une région du CMH (99, 100) et qu'il pouvait être corrigé par la transfection des gènes codant pour HLA-DM (101, 102).

L'analyse des souris « *knock out* » pour H2-M a également confirmé certaines de ces observations (103-105). En effet, les molécules de classe II semblent être associées en majorité avec CLIP et les splénocytes ne peuvent présenter efficacement des antigènes aux lymphocytes T. Au niveau de la sélection thymique, un nombre réduit de cellule T CD4⁺ matures est produit, probablement à cause d'une présence exagérée du peptide CLIP à la surface des molécules de classe II. Malgré la présence d'un répertoire de cellules T normal, une analyse détaillée a démontré que certains récepteurs T ne pouvaient être sélectionnés positivement (106-108) et que les récepteurs qui étaient sélectionnés possédaient une diversité limitée (109). De plus, la sélection négative semble

anormale puisque les cellules T réagissent fortement face à des CPA provenant de souris compatibles au niveau du CMH. Cette réactivité est due à l'absence de peptides du soi autre que le CLIP au niveau de la région médullaire du thymus (endroit où s'effectue la sélection négative). Les clones T autoréactifs ne peuvent donc pas être effacés du répertoire.

1.5.1 Transport et ciblage intracellulaire

Contrairement aux molécules classiques de classe II qui nécessitent l'aide de la chaîne invariante pour progresser vers d'autres compartiments, les hétérodimères $DM\alpha/\beta$ nouvellement synthétisés ne semblent pas s'associer fortement à Ii (110). En effet, dès l'association de $DM\alpha$ (26 kDa) et de $DM\beta$ (27 kDa), le complexe peut transiter vers l'appareil de Golgi afin de compléter sa maturation. A cet endroit, la chaîne beta acquiert 1 nouveau groupement glycosylé alors que la chaîne alpha en acquiert 2, conférant un poids respectif de 30-31 kDa et de 33-35 kDa.

Des études ont démontré que peu de DM était exprimé en surface cellulaire et que la majorité de DM était plutôt présent dans le système endosomal/lysosomal, plus particulièrement dans les compartiments MIIC (43, 90) pour un ratio DM:DR d'environ 1:5 (111). L'enrichissement de DM au niveau de ces compartiments est dû à un signal de ciblage de type tyrosine (YTPL) encodé par la queue cytoplasmique de la chaîne β (112, 113). Peu d'études ont tenté d'expliquer la façon dont DM atteint les compartiments endosomaux, mais

l'utilisation de dominants négatifs de clathrine suggère que DM et Ii empruntent des compartiments vésiculaires distincts afin d'atteindre la voie endosomale (114). En effet, DM semble dépendant des vésicules enrobées de clathrine pour son transport du réseau trans-golgien à la voie endocytaire alors que la chaîne invariante n'est pas dépendante de ces vésicules de clathrine. Malgré une connaissance incomplète à ce sujet, il semble toutefois admis que les molécules de classe II classiques ainsi que Ii et DM sont généralement présents dans les mêmes compartiments (43).

D'autre part, des études plus récentes ont permis la détection de DM à la surface des cellules de Langerhans (115) ainsi que les cellules dendritiques et les cellules B (116). Dans ces études, il a été suggéré que la présence de DM en surface puisse faciliter le chargement de peptides à cet endroit ainsi que dans les compartiments de recyclage des endosomes précoces.

1.5.2 Rôle physiologique de HLA-DM

1.5.2.1 HLA-DM comme catalyseur de l'échange peptidique

Grâce à l'utilisation de DM et de DR purifiés, des études de chargement peptidique sur les molécules de classe II ont permis d'arriver à la conclusion suivante: DM facilite la relâche de CLIP sur les molécules de classe II et DM favorise à la fois la cinétique ainsi que l'efficacité du chargement de nouveaux peptides antigéniques de façon dose dépendante (117-119). De plus, l'échange

peptidique suit les règles de Michaelis-Menten, ce qui suggère un rôle catalytique à la molécule HLA-DM malgré le fait que cette dernière ne soit pas une enzyme à proprement parler (120). Cette activité catalytique explique d'ailleurs pourquoi un test *in vitro* de chargement sans DM prend plus de 12 heures à s'effectuer alors que dans les conditions *in vivo*, cet échange survient en moins d'une heure.

De façon plus détaillée, l'activité catalytique du chargement peptidique est causée par l'accélération de la relâche du CLIP, ce qui permet à plus de molécules de classe II libres de lier de nouveaux peptides (117-119) (voir figure 1.12a). En effet, HLA-DM n'agit pas directement en transférant les peptides puisqu'il est incapable de lier ces peptides dans sa niche. D'autre part, l'activité catalytique optimale de DM se situe à pH acide (pH 4.5-5.5), ce qui concorde avec le pH retrouvé au niveau des compartiments lysosomiaux acides où s'effectue le plus d'échanges peptidiques. DM est aussi capable de catalyser l'échange peptidique à pH neutre (de façon moins efficace toutefois), ce qui suggère que DM puisse agir tout le long de la voie endocytaire.

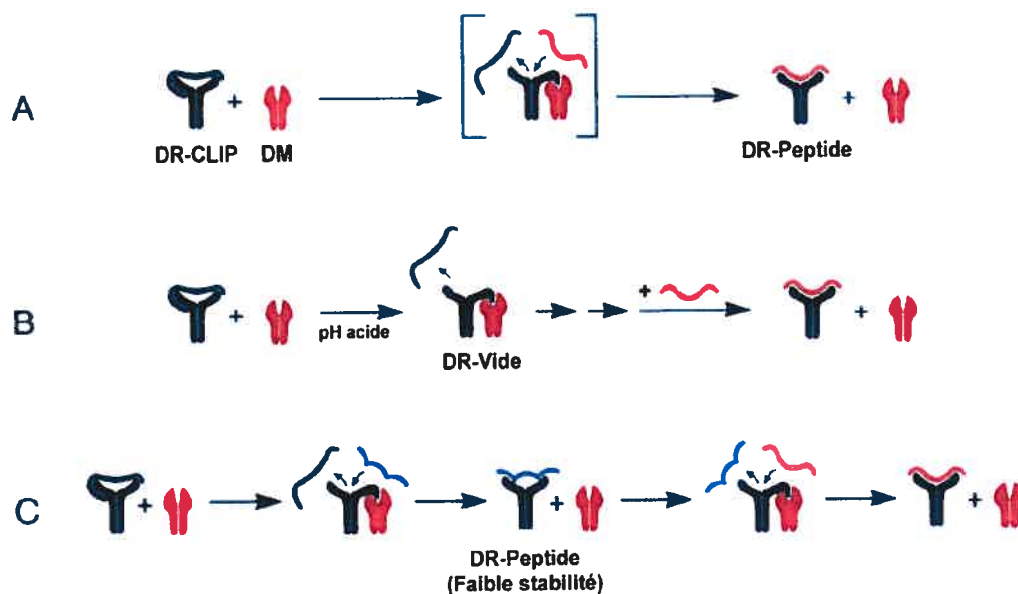


Figure 1.12 Rôles de HLA-DM sur le chargement peptidique des molécules de classe II

(A) Catalyse de l'échange peptidique par DM. En se liant à DR, DM permet la relâche du peptide CLIP et permet la liaison d'un peptide de plus forte affinité (rouge). (B) Stabilisation du classe II par DM. Dans l'éventualité où la molécule de classe II ne trouverait pas de peptides à lier dans sa niche (DR-vide), DM agit comme chaperon en évitant son agrégation. (C) Édition de peptides par DM. Dans l'éventualité où CLIP serait échangé pour un peptide instable (bleu), DM peut réengager la molécule de classe II afin d'échanger ce peptide pour un peptide de haute stabilité (Adapté de Kropshofer *et al.*, 1999 (93)).

1.5.2.2 HLA-DM comme chaperon moléculaire

Les molécules de classe II vides (exemptes de peptides) ont tendance à l'agrégation et à la dénaturation, spécialement en milieu acide (121-123). Cette instabilité serait due à l'exposition de résidus hydrophobes contenus dans la niche peptidique qui sont normalement protégés par le peptide. Certaines évidences ont démontré que DM pouvait préserver la stabilité des molécules de classe II vides (voir figure 1.12b). En absence de peptides et à pH acide, les complexes DR

conservaient leur capacité de liaison peptidique en présence de DM alors qu'en absence de DM, ces complexes ne pouvaient plus lier de peptides (124, 125) et commençaient à agréger (125). Selon cette dernière étude, des complexes DM-DR vides purifiés à partir de compartiments lysosomaux pouvaient également être chargés facilement avec des peptides.

1.5.2.3 HLA-DM comme éditeur de peptides

En plus de permettre la relâche du CLIP sur les molécules de classe II, DM permet aussi de libérer certains peptides comme celui dérivé de la « *myelin basic protein* » (MBP 90-102). Il est toutefois incapable de catalyser la relâche d'autres peptides comme l'épitope HA 307-319 (117). DM agit donc comme un éditeur puisqu'il influence la qualité des peptides qui sont liés à la niche peptidique des molécules de classe II (voir figure 1.12c). De plus, des expériences *in vitro* ont confirmé que DM pouvait échanger des peptides autres que le CLIP (125). Dans cette dernière étude, un mélange de six complexes DR1:peptide était incubés en présence ou en absence de DM. Alors que cinq complexes sur six restaient intacts en absence de DM, seulement deux complexes semblaient réfractaires à l'action de DM. De plus, des expériences *in vivo* ont également permis de suggérer un rôle éditeur à HLA-DM puisqu'une variété de peptides du soi liés à HLA-DR étaient sensibles à l'action de DM (126). Enfin, des analyses effectuées par spectroscopie de masse sur des cellules DM⁺ par rapport à des cellules DM⁻ ont démontré des différences marquées au niveau du répertoire peptidique (127).

1.5.3 Structure de HLA-DM

Malgré une faible homologie au niveau de leur séquence primaire, les analyses de cristallographie ont démontré que la structure de HLA-DM était très similaire à celle des molécules du CMH de classe II classique (128, 129). En effet, les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ composés de 8 feuillets beta flanqués de 2 hélices alpha présentent une structure semblable à la niche peptidique des autres molécules de classe II. Mais contrairement à ces dernières, les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ de DM forment un niche peptidique fermée qui ne possède pas de cavités spécifiques et qui ne peut donc pas lier de peptides antigéniques (voir figure 1.13). Cette structure particulière est due à des contacts répétés tout le long des hélices alpha et est stabilisée par la présence de ponts disulfures qui ne sont pas présents chez les molécules de classe II classiques.

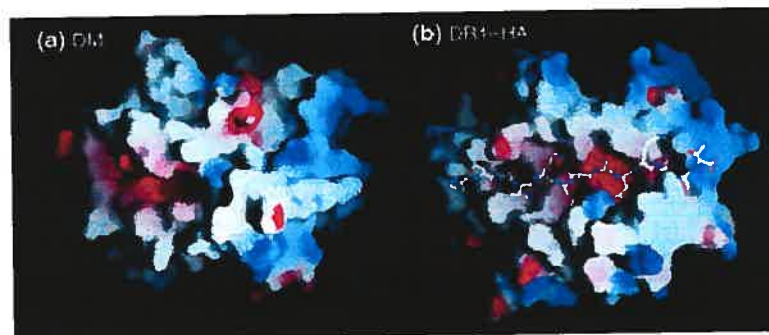


Figure 1.13 Comparaison de la niche peptidique de HLA-DM et HLA-DR1.

(A) La niche peptidique de HLA-DM est refermée sur elle-même et ne permet pas l'association de peptides. **(B)** Au niveau des molécules de classe II, la niche peptidique est dotée de plusieurs poches permettant la liaison peptidique. Les champs électrostatiques négatifs sont représentés en rouge et les champs positifs en bleu. Le peptide HA est représenté dans la niche de la molécule HLA-DR1. (Tiré de Kropshofer *et al.*, 1997 (130)).

HLA-DM diffère également des autres molécules de classe II par la présence de nombreux résidus cystéine. Pas moins de 7 cystéines supplémentaires sont retrouvées au niveau de la chaîne DM β alors que la chaîne DM α en compte 2 de plus. Il est probable que ces résidus influencent grandement la conformation de DM. En effet, il a été démontré que la mutation de la cystéine β 79 mène à un repliement inapproprié de la chaîne DM β en formant des hétérodimères DM $\alpha\beta$ aberrants ainsi que des homodimères DM $\beta\beta$ retenus dans le reticulum endoplasmique (131).

1.5.4 Association entre DR et DM

Les premières évidences d'une association directe entre HLA-DM et HLA-DR viennent d'expériences *in vitro* utilisant des protéines purifiées DR et DM ainsi que des peptides synthétiques (117). Des expériences de co-immunoprécipitation ont également démontré la formation du complexe *in vivo*. Cette association s'effectue préférentiellement à pH acide, ce qui est compatible avec le niveau d'acidification retrouvé dans les compartiments MIIC. De plus, l'interaction est faible puisqu'elle n'est maintenue qu'en présence de détergents doux et moins dénaturants comme l'agent zwitterionique CHAPS (132). Il semble également que les molécules DM et DR doivent être complètes afin d'observer une activité catalytique optimale de HLA-DM. En effet, une étude récente a démontré que les régions transmembranaires de chaque molécule étaient

importantes pour la colocalisation de DM et DR au niveau des mêmes membranes (133).

1.5.4.1 Changements conformationnels induits par l'interaction DR-DM

Des expériences de co-immunoprécipitation ont démontré que DM lie préférentiellement les molécules HLA-DR exemptes de peptides (124) ou occupant des peptides de faible stabilité comme CLIP (120, 125). Ces résultats suggèrent donc que la reconnaissance des molécules HLA-DR par DM dépend d'une conformation de la molécule de classe II qui est dictée par la force des liens peptidiques. Certaines expériences démontrent également que DM a la capacité d'altérer la conformation de DR. En effet, les molécules DR3-CLIP qui ne sont pas reconnues par l'anticorps 16.23 en absence de DM deviennent 16.23⁺ lorsque DM interagit pour enlever le CLIP (134). Cette réactivité est conservée même lorsque d'autres peptides se lient à la niche peptidique. De plus, le CLIP peut s'enlever spontanément chez certains allèles en absence de DM par un phénomène d'auto relâche (127), mais même dans cette situation les complexes DR3-peptides demeurent 16.23⁻. Cette conformation imposée par DM semble aussi être importante pour la reconnaissance par les cellules T car ces dernières peuvent faire la distinction entre les complexes DR3-peptides 16.23⁺ et 16.23⁻ (134).

D'autre part, l'utilisation d'ANS (8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid), un agent permettant de détecter les surfaces hydrophobes, a permis de démontrer que

les molécules de classe II ainsi que HLA-DM changeaient de conformation selon le pH (135). En effet, ces molécules exposent plus de groupements non polaires à pH lysosomal. En revanche, le mélange de DM et DR mène à une diminution de la fluorescence provoquée par l'ANS. Cette baisse de fluorescence suggère donc que l'interface utilisée implique la participation de résidus hydrophobes.

1.5.4.2 Interaction DR-DM : Interface de DR impliquée

Depuis les dernières années, plusieurs études ont permis de mieux préciser les sites d'interaction de DM sur DR. En effet, une première étude de mutagenèse sur DR a mené à l'identification de 6 positions critiques pour l'interaction avec DM (136) (voir figure 1.14). Ces résidus sont tous situés sur une même interface et leur mutagenèse cause une accumulation de CLIP due à une perte d'interaction avec DM. En analysant la région d'interaction plus en détail, on remarque que les résidus de DR se situent sur la même face qu'occupe la portion N-terminale du peptide de la niche (voir figure 1.14). Cette caractéristique est en accord avec certaines études précédentes qui démontrent que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de CLIP interfère avec la relâche du peptide par DM (118) et que la création d'un mutant de DR à la position $\alpha 94$ empêche l'interaction avec DM (117, 137). De plus, ces résidus sont exposés et de nature acide ou hydrophobe, ce qui est compatible avec les études par ANS suggérant que l'interface utilisée par DR implique la participation de résidus hydrophobes (135, 138, 139).

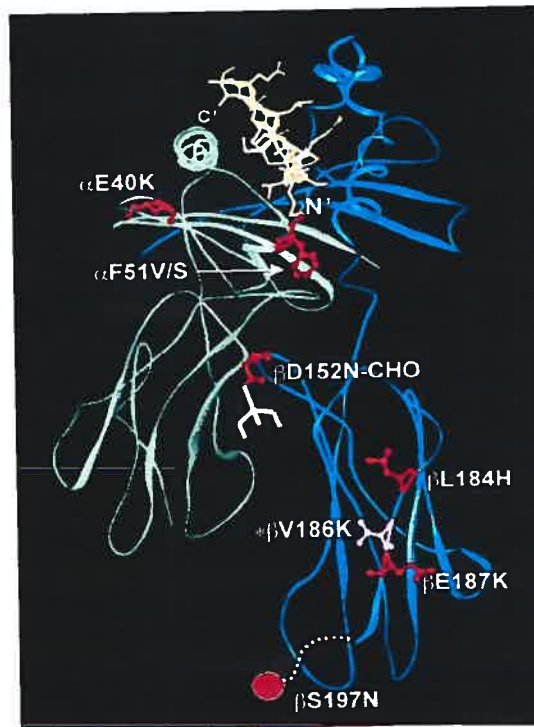


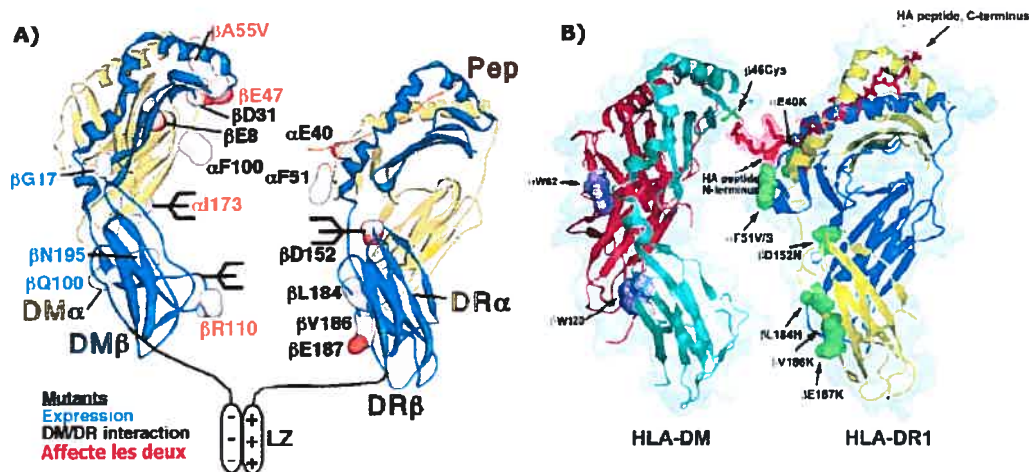
Figure 1.14 Mutations sur DR affectant l'interaction avec DM.

Représentation du cristal de DR3-CLIP. La chaîne α est représentée en vert, la chaîne β en bleu et le CLIP en jaune. Les mutations qui affectent l'interaction avec DM sont indiquées en rouge avec les substitutions correspondantes. La position D152N correspond à un nouveau site de glycosylation représenté par une fourche (Tiré de Doebele *et al.*, 2000 (136)).

1.5.4.3 Interaction DR-DM : Interface de DM impliquée

Après la résolution des cristaux de DM, certains groupes ont proposé des modèles d'interaction avec DR (128, 129). Un de ces modèles suggérait la participation des tryptophanes $\alpha 62$ et $\beta 120$ (résidus hydrophobes) situés sur une même interface de DM. Une étude subséquente effectuée par notre groupe a toutefois démontré que la mutation de ces résidus n'affectait pas l'interaction avec DR (140). De plus, une autre étude a proposé de façon convaincante que l'interface opposée sur DM semble être impliquée dans l'interaction. En effet, les

auteurs utilisent des peptides modifiés en région NH₂ ou COOH terminale dans le but de créer des ponts disulfures avec la cystéine exposée retrouvée en position β 46 sur DM (141). Lorsque le pont formé est du côté N-terminal du peptide, DM est capable de catalyser l'échange peptidique rapidement. En revanche, un pont formé à l'opposé du peptide ne démontre aucune activité catalytique. Cette étude suggère donc que la face latérale de DM possédant la cystéine β 46 soit impliquée dans l'interaction avec les molécules de classe II (voir figure 1.15a).



Une deuxième étude plus récente a permis de raffiner cette interface potentielle. Par des expériences de mutagenèse aléatoire sur DM, le groupe de Elizabeth Mellins a découvert 10 résidus importants pour la fonction de DM (142) (voir figure 1.15b). Sept de ces résidus sont orientés dans la même face latérale de DM et 3 positions (α F100, β E8 et β D31) seraient impliquées directement dans l'interaction avec DR puisque leur mutation n'affecte pas le niveau d'expression de DM. A la lumière de ces résultats, les auteurs suggèrent un modèle d'interaction impliquant la partie concave de DM qui interagirait avec la partie convexe de la molécule de classe II (voir figure 1.15b). Ce modèle est compatible avec l'autre modèle suggéré par Stratikos *et al.* impliquant la cystéine β 46. Il est également supporté par l'expression de molécules solubles de DM et DR fusionnées par des « leucines zippers » via leur chaîne β . Cette fusion, qui recrée le type d'orientation escompté entre DM et DR, s'est avérée stable et démontre une relâche peptidique rapide (voir figure 1.15a).

1.5.5 Modèle de relâche peptidique par DM

Plusieurs modèles ont été proposés afin d'expliquer le mode d'action de DM sur l'échange peptidique. D'une part, certains groupes ont proposé que DM interagisse préférentiellement avec une conformation « ouverte » de DR qui favorise la relâche rapide du peptide (124, 125, 143). Une stabilisation par DM de ce type de conformation expliquerait à la fois la capacité catalytique de DM sur l'échange peptidique ainsi que la possibilité de ce dernier à préserver l'intégrité des molécules de classe II vides. D'autre part, il a été proposé que DM favorise la

relâche peptidique en déstabilisant le réseau de ponts hydrogènes entre le peptide et la niche de la molécule de classe II (143, 144). Cette déstabilisation ne se ferait pas par contact direct puisque aucun des résidus de DR impliqués dans l'interaction avec DM n'est engagé dans le réseau de ponts hydrogènes (136). L'affaiblissement des ponts hydrogènes se ferait plutôt de façon indirecte en impliquant les résidus α F51 et α E40 qui sont situés à proximité de la pochette P1. Ces résidus agiraient comme un levier par lequel DM viendrait s'appuyer afin de briser les ponts hydrogènes formés entre les résidus α 51-53 du classe II et le corps du peptide (voir figure 1.16a).

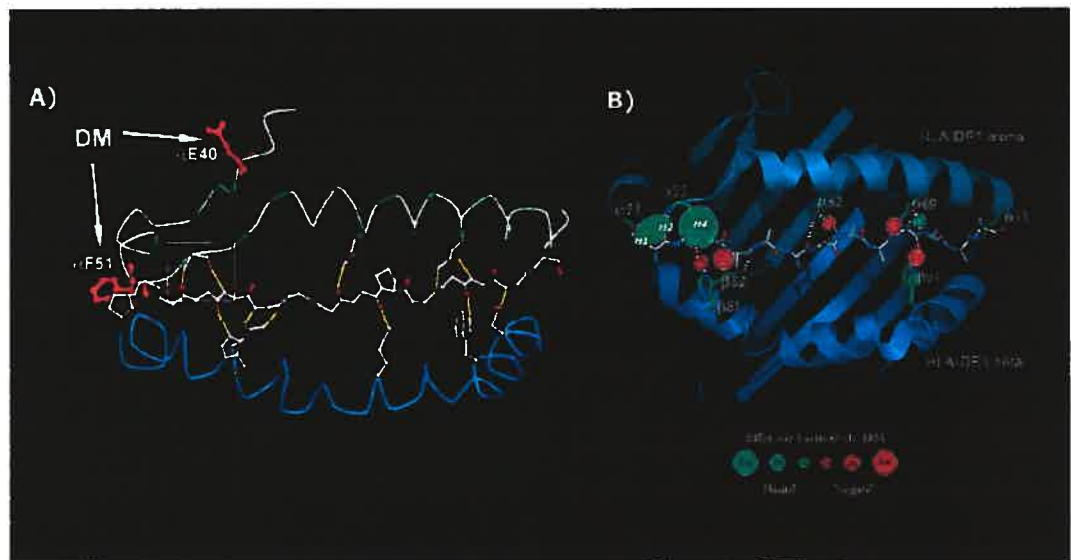


Figure 1.16 Mécanisme proposé pour l'action de DM sur la relâche peptidique.

(A) Niche peptidique vue par le TCR. Les résidus DR α F51 et α E40 permettraient la déstabilisation des ponts hydrogènes impliqués entre le résidu critique α S53 et le peptide (Tiré de Doebele *et al.*, 2000 (136)). (B) L'effet des ponts hydrogènes sur l'activité de DM. Les cercles verts indiquent les ponts qui ont un effet plus marqué sur DM alors que les cercles rouges indiquent les ponts moins marquants. Les trois liens hydrogènes les plus importants sont indiqués par les lettres H1, H2 et H4 (Adapté de Stratikos *et al.*, 2004 (72)).

Ce modèle est renforcé par une étude récente qui démontre que la disruption des ponts hydrogènes (H1, H2 et H4) formés entre les résidus α 51-53 de la molécule de classe II et le peptide de la niche favorise grandement l'activité catalytique de DM (72) (voir figure 1.16b). Cette région est également à proximité de la poche P1 qui jouerait un rôle important au niveau de la conformation « ouverte » ou « fermée » de la molécule de classe II (145, 146). Il a donc été suggéré que DM reconnaisse préférentiellement une conformation ouverte intermédiaire de DR causée par la présence d'un peptide mal ancré en région N-terminale. DM viendrait accentuer cette ouverture, ce qui mènerait à la relâche accélérée du peptide. La molécule de classe II vide resterait alors stable grâce à l'activité chaperon de DM.

Malgré une connaissance limitée sur la façon dont DM décroche des molécules de classe II, il est possible que la liaison d'un peptide stable (présumé bien ancré à la poche P1) permettent de redonner une conformation « fermée » à la molécule de classe II, empêchant par le fait même une action par HLA-DM. Par ailleurs, une autre possibilité impliquerait plutôt le relâchement de DM induit par un changement de pH lors du transport vers la surface ou par un ciblage différentiel. En effet, certaines études ont démontré que DM pouvait lier des molécules de classe II contenant des peptides stables (124, 132), ce qui entre en contradiction avec la première hypothèse.

1.6 HLA-DO

1.6.1 Généralités

Les gènes codant pour la chaîne DO α et DO β sont séparés l'un de l'autre dans le locus du CMH, contrairement aux autres gènes du CMH de classe II qui sont localisés en paires. De plus, le gène DOB n'est pas induit par l'interferon- γ alors que tous les autres gènes de classe II (y compris DOA) le sont. Pour ces raisons, on a longtemps pensé que ces deux produits ne pouvaient former un hétérodimère. Ce n'est qu'à partir de 1996 que des expériences ont démontré la formation d'un complexe DO α / β *in vivo* (91). Ces études démontraient également que DO peut se lier fortement à DM et que ces molécules restent associées durant leur transport dans la voie endosomale. De plus, HLA-DO ne lie pas de peptides et il est peu polymorphe comme DM, ce qui laisse suggérer un rôle de modulation plutôt que de présentation directe d'antigènes.

Par ailleurs, en comparant les séquences protéiques, HLA-DO ressemble beaucoup plus aux molécules de classe II classiques qu'à HLA-DM (4, 6, 7) (voir figure 1.17). La ressemblance frappante avec HLA-DR/DQ laisse donc supposer une structure similaire. Toutefois, ce n'est qu'avec la résolution de la structure tridimensionnelle de DO qu'il sera possible de déterminer si la niche peptidique de DO est fermée comme DM ou bien si elle peut lier des éléments de nature non peptidique comme des lipides.

A)

```

DO α : TKADMGSYGPAF---SYGAGQTHEFEEQLSIVLKKSEAW---GFRFDPEGLAGIA : 66
DR α : IEEV-IIQAE-LNPDQSEEMFDGDEIHTMAKRTVIESSRRESSEAWAANAV : 65

DO α : ISEHDLVE---RSRAI---R---PKR---GQ---I---IVNIF---I---I---Q---T---E : 132
DR α : D---NE---MTK---YTPIT---E---TN---P---RE---V---FI---KFT---V---V---K---P---T : 131

DO α : VAQSEYSQF---R---R---V---A---R---Q---E---R---A---R---LQVIEPEDAMTL : 198
DR α : SEV---LPRE---R---R---L---I---P---R---R---R---E---K---K---F---D---A---S---L---E---T---T---N---V : 197

DO α : AIF---FLV---VL---M---TYV---SVPR----- : 225
DR α : TV---I---I---I---I---F---K---V---R---K---W---A---A---E---R---R---G---E---L : 229

DO β : TSPEDVIADYFTN---R---K---Q---V---V---R---F---F---L---Y---E---S---M---F---V---L---K---Q---D---Q---Q---R---L : 66
DR β : GTRPRLWLLFEHFF---R---R---L---L---E---C---Y---Q---S---S---S---S---S---E---Y---R---V---E---R---R---Y---Y---Q---K : 66

DO β : ---R---S---Q---G---V---R---L---A---P---G---K---Q---E---R---E---R---P---L---H---Q---E---E---T---D---K---I---K : 132
DR β : ---S---Q---R---A---T---Y---E---G---V---E---S---Q---R---E---K---V---S---K---Q---P---Q---E---V---V---S---S---S---E---V---R : 132

DO β : L---P---R---M---P---R---S---U---T---S---V---E---M---T---E---L---H---L---L---D---S---L---L---V---S---Q---Y---S---W---R : 198
DR β : R---Q---E---K---S---V---E---L---Q---E---R---E---L---S---H---T---V---R---S---E---N---A---T---Q---E---P---V---T---E---L---T---E---R---S---A---Q---S : 198

DO β : ---I---A---L---I---L---V---I---V---Q---L---A---Y---V---R---T---M---S---N---E---V---R---A---V---L---L---P---Q---S : 247
DR β : ---V---G---G---V---L---L---G---A---L---F---Y---F---N---H---S---G---L---P---T---E---L---L----- : 237

```

B)

```

DO α : TKADMGSYGPAF---SYGAGQTHEFEEQLSIVLKKSEAW---GFRFDPEGLAGIA : 65
DM α : DLQNE--TFLHTV---D---G---S---E---V---G---L---S---E---A---Y---E---L---L---E---F---F---S---Q---N---T---R---E---P---A---W---Q---E---D---A---P---A---L : 62

DO α : AIHAHLDILVERSNRRAINV-----RVTLPKSRVLLQSIILIIDIIIVINITLRNG : 126
DM α : FDEFCWMIQQIGPKLDGKIIVORGFIAEFTLKLPLTKKLTIVFQQLSMLTVNMQIIIG : 120

DO α : QT---T---VAQ---S---Y---Q---F---H---R---K---H---P---V---S---A---E---V---Y---D---Q---E---W---G---L---A---P---L---L---R---H---E---L---Q---V---I---P---P---A : 190
DM α : VP---E---F---G---E---V---A---V---G---S---E---Q---A---S---N---T---E---P---S---I---F---S---I---T---E---I---R---Y---T---A---I---A---Y---V---P---R---N---A---L---S---L : 190

DO α : M---T---L---V---A---L---G---L---A---I---L---V---E---L---T---M---G---T---Y---V---S---V---P---R : 225
DM α : L---N---V---L---G---V---A---F---G---L---V---L---I---I---I---I---Y---F---R---K---P---C---G---D--- : 224

DO β : TDSPEDEIQAKADYFTN---E---V---Q---V---V---R---F---L---E---E---Y---V---R---F---S---D---V---G---V---A---N---T---K---G---Q---P---D---A---E---Q : 60
DM β : CTGAGGVAHVESTLLDDA---P---D---T---Y---C---I---S---K---D---L---L---T---C---W---P---E---E---N---K---A---P---C---E---G---V---N---S---A---N---V---L---S---Q---H : 65

DO β : WSRRLDLEISQAVDGVCRNYRLGAPFVGVKQETTYPERL-LHQHNLHST---G : 125
DM β : LQKDTMQLLNGLQNCATTPQFWGSLN---T---R---E---S---Q---A---K---T---F---N---T---R---E---P---V---M---A---Y---W---S---A : 129

DO β : DIKIKFLQ--EERAGVMSG---R---R---S---R---F---V---V---M---E---M---E---L---H---V---L---L---D---S---L---L---V---S---V---E : 188
DM β : EVT---T---R---K---K---L---V---M---P---H---S---A---H---K---I---A---Q---S---I---D---Y---E---L---H---A---L---S---Y---D---T---V---E---I---C---A---P---E---I---L---R---D : 193

DO β : R---A---Q---E---Y---S---W---R---M---L---S---G---I---A---A---F---L---E---L---L---V---I---V---I---Q---L---E---Q---K---G---V---R---Q---M---S---N---E---V---R---A---V---L---L---P---Q---S : 247
DM β : T---P---G---I---P---M---Q---T---I---V---S---V---S---A---V---T---I---G---T---F---S---I---V---T---S---W---R---G---H---S---S---P---I---P---S---N---Y---E---G---W---H---T---S--- : 249

```

Figure 1.17 Alignement de séquence entre DO/DR et DO/DM

(A) Alignement de séquence protéique entre DO et DR. (B) Alignement de séquence protéique entre DO et DM. Les acides aminés identiques sont encadrés en noir. Il existe plus de 50% d'identité entre DR α et DO α , plus de 60% d'identité entre DR β et DO β , et seulement 28% d'identité entre DM $\alpha\beta$ et DO $\alpha\beta$ (6, 147).

1.6.2 Distribution cellulaire

A l'opposé des autres molécules de classe II classiques qui sont exprimées dans la majorité des cellules présentatrices, HLA-DO est presque exclusivement retrouvé au niveau des cellules B et des cellules épithéliales thymiques, malgré certaines études démontrant sa présence dans les cellules dendritiques et des lignées cellulaires de mélanome (148). En effet, l'expression de DO dans les cellules dendritiques semble être un phénomène non généralisé et il est possible que des sous-populations de cellules expriment des niveaux variables de cette molécule (149). Pour ce qui est du thymus, l'expression de DO a été rapportée dans la région médullaire et corticale des cellules épithéliales thymiques alors que chez la souris, seule la région médullaire démontre une expression prédominante de H2-O (150). De façon surprenante, la présence de H2-O β a même été détectée dans les cellules thymiques qui n'expriment pas la chaîne alpha (151).

Plus récemment, des études ont analysé l'expression de DO dans les cellules B provenant des centres germinatifs (CG) (152, 153). Ces études démontrent une baisse significative de DO dans les CG alors que l'expression semble se rétablir au niveau de cellules B mémoires (154). De plus, le niveau d'activation des cellules B semble également affecter l'expression de DO. En effet, des cellules activées par le PMA ou via les récepteurs de surface (BCR) démontrent une réduction d'expression de DO (155). Cette baisse d'expression a été observée par d'autres études qui établissent une corrélation entre le faible niveau de DO (hausse de DM) et la présentation efficace des cellules B activées

(156). Enfin, il est intéressant de constater que les cellules B changent aussi leur ratio DM :DO dans le même sens en présence de cytokines pro-inflammatoires (157).

1.6.2 Régulation génique

Alors que la chaîne alpha de DO semble être régulée de la même façon que les autres gènes du classe II (quoique l'expression est moins élevée (4)), la transcription de la chaîne beta est significativement différente. En effet, l'expression de DO β ne peut être stimulée par l'interferon- γ dans la plupart des types cellulaires et son expression est très faiblement induite par CIITA (6, 158, 159). DO β semble donc être influencé par des facteurs de régulation distincts. Pour appuyer cette idée, les premières études de caractérisation ont démontré qu'au niveau de lymphocytes B déficients pour CIITA (RJ2.2.5), l'ARNm de HLA-DO β était détectable bien que certains gènes de classe II classiques comme de HLA-DR β ne soit pas activé (6). Malgré des efforts en ce sens, on ne connaît pas encore la nature de ces facteurs qui seraient spécifiques aux cellules B.

Par contraste, une étude récente démontre que CIITA est requis afin de permettre une expression maximale de DO β dans les cellules B (160). De plus, une expression modérée de DO β a été détectée dans les cellules HeLa qui sont transfectées avec CIITA ((161) article #1 annexé à cette thèse). Cette induction demande toutefois une très forte expression de CIITA pour avoir lieu. La faible réponse du gène DO β face à CIITA serait explicable par certains manques au

niveau de son promoteur. Malgré une bonne conservation des boîtes W, X et Y au niveau du promoteur de DO β , il semble que la boîte Z (sous-section de la boîte W) soit en partie responsable du manque de réponse. En effet, la substitution systématique d'éléments du promoteur de DR α par des éléments équivalents de DO β a permis d'arriver à cette conclusion (162). De plus, la distance entre les boîtes X2 et Y du promoteur de DO β est de 13 nucléotides comparativement à 14 ou 15 nucléotides pour les autres promoteurs des gènes de classe II (7). Cette différence pourrait expliquer la faible réponse du promoteur de DO β .

Plus récemment, une étude a démontré que le promoteur de DO β contient un motif potentiel OCT qui permettrait de recruter le facteur Oct-2. Cet élément est retrouvé entre les boîtes X2 et Y à un endroit inhabituel. En effet, le promoteur de DR α contient également un motif OCT, mais il est plutôt situé à une quinzaine de nucléotides en aval de la boîte Y. Le recrutement de facteurs à cet endroit inhabituel du promoteur de DO β pourrait donc empêcher le recrutement normal d'autres éléments essentiels à la liaison de CIITA (163).

1.6.3 Transport intracellulaire

Après leur translocation dans le réticulum endoplasmique, les chaînes α et β de DO s'assemblent pour former un hétérodimère. Les protéines encodées par DO sont structurellement similaires aux autres molécules de classe II, avec une chaîne alpha de 25kDa et une chaîne beta de 28kDa. L'addition de 2 sucres sur DO α et de 1 sur DO β mène à la formation de chaînes matures de 34kDa et de

32kDa respectivement (91, 92). Il a été démontré que l'hétérodimère DO α/β ne peut transiter hors du réticulum endoplasmique par lui-même. En effet, dans un système de transfection utilisant des cellules HeLa, il a été démontré par microscopie que DO était concentrée dans le RE et n'était pas localisée dans les compartiments lysosomaux habituels (91). Des analyses de *pulse chase* semblent également démontrer une mobilité réduite sur gel, signe d'une incapacité à transiter vers l'appareil de Golgi et à acquérir des sucres complexes (91) (voir figure 1.18). De plus, contrairement aux molécules de classe II classique qui nécessitent la présence de la chaîne invariante pour un transport intracellulaire efficace, HLA-DO ne semble pas dépendre de ce type de chaperon puisque la cotransfection de cet élément n'améliore que marginalement sa sortie du RE.

Pour un transit efficace vers les autres compartiments, HLA-DO nécessite plutôt la présence de HLA-DM. En effet, la coexpression de DO et DM dans une cellule HeLa résulte en la formation de complexes DM-DO qui sortent efficacement du RE pour se retrouver dans les compartiments lysosomaux (91). Chez la souris, les résultats ont aussi été confirmés puisqu'une absence de H2-M résulte en une incapacité de sortie de H2-O ainsi qu'une dégradation prématurée de ce dernier (91). D'autre part, l'analyse des cellules B a confirmé que cette interaction n'était pas due à un artéfact et qu'elle pouvait s'effectuer dans des cellules qui expriment ces molécules de façon endogène (91, 158, 164, 165).

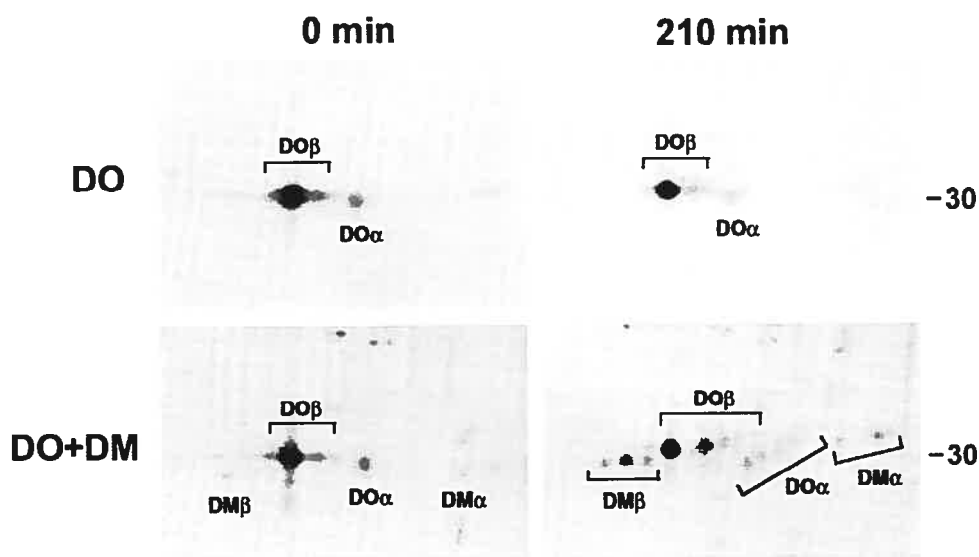


Figure 1.18 DM facilite le transport intracellulaire de DO

Des cellules HeLa transfectées avec DO (panneaux du haut) ou DO et DM (panneaux du bas) ont été marquées au ^{35}S pour 30 minutes, immunoprécipitées avec un sérum anti-DO β et analysées immédiatement (0 min) ou après deux heures (120 min) sur gel à deux dimensions. Le poids moléculaire est indiqué à la droite de la figure. DO acquiert des sucres complexes lorsque DM est présent, signe d'un passage vers l'appareil de Golgi (Adapté de Liljedahl *et al.*, 1996 (91)).

1.6.4 Ciblage intracellulaire

Malgré une étude récente de Neefjes démontrant que DO peut être exprimé en surface grâce à une interaction avec la chaîne lourde des molécules de classe I (166), plusieurs études ont démontré que les complexes DM-DO étaient présents en majorité dans les compartiments lysosomaux (91, 158, 164, 165). DO β possède un signal dileucine qui pourrait influencer sa localisation dans la voie endosomale. A cet égard, certaines études démontrent que le motif dileucine retrouvé dans la queue cytoplasmique de DO β n'est pas essentiel au ciblage des complexes DM-DO vers les compartiments lysosomaux (167) ((168) article #2

annexé à cette thèse). Quant à savoir si la nature des compartiments en est modifiée, des études plus poussées devront être complétées. Un rôle plus spécifique du signal encodé par DO β a récemment été suggéré dans une étude effectuée par le groupe de Neefjes (167). Selon cette étude, le signal dileucine permet la redistribution des molécules de classe II ainsi que les complexes DM-DO de la membrane interne vers la membrane « limitante » des compartiments MIIC multivésiculaires. Cette distribution permettrait d'augmenter la performance d'échange peptidique en favorisant une interaction latérale plus efficace entre les molécules de classe II et les complexes DM-DO. Cette hypothèse pourrait expliquer partiellement comment DO influence le répertoire peptidique (voir prochaine section).

1.6.5 Fonction modulatrice de HLA-DO

Dans les cellules B, il a été démontré qu'une majorité du DM se retrouve associé avec HLA-DO (164). De plus, nous avons décrit précédemment que DO dépend de DM pour son transport intracellulaire et que leur interaction est très forte (résistante au Triton X-100). Cette association particulière ne laisse aucun doute quant au rôle potentiel de DO dans la modulation de la fonction de HLA-DM. Cette modulation peut agir positivement en augmentant la fonction catalytique de DM ou agir négativement en inhibant son activité. Après analyse plus poussée, il semble que ces possibilités ne soient pas mutuellement exclusives puisqu'il existe des résultats en faveur de chacune d'elles (151, 158, 164, 165).

En effet, les premières expériences ont suggéré un rôle inhibiteur de DO à cause d'une accumulation de CLIP à la surface des cellules dans un système où DO était surexprimée (158, 165). De plus, l'utilisation de complexes DM-DO purifiés a démontré une capacité réduite à favoriser l'échange de peptides sur DR en comparaison à DM seul (151, 169). Cette inhibition ne semblait toutefois pas irréversible puisque avec le temps, la quantité de complexes classe II-peptide atteignait le même niveau qu'avec DM seul. D'autre part, l'influence de DO sur l'activité catalytique de DM semble être dépendante du pH. En effet, HLA-DO réduit la liaison de peptides à pH basique (6.0-6.5) alors qu'à pH acide (4.5-5), l'efficacité d'échange n'est pas affectée (151, 169). De plus, il a été décrit que les complexes DO-DM (ainsi que DO seul) subissent d'importantes modifications de conformation en milieu acide. Ces changements pourraient expliquer la différence d'activité inhibitrice de DO selon le niveau d'acidification (151). En revanche, aucun résultat ne démontre si la hausse d'activité associée à la baisse de pH est due à un regain d'activité catalytique de DM.

Paradoxalement, une autre étude démontre que HLA-DO agirait comme stabilisateur de DM en augmentant l'interaction des complexes DM-DO avec les molécules de classe II, favorisant ainsi la formation de complexes CMH-peptide stables au SDS (164). Une interaction plus soutenue signifierait une plus grande chance pour les molécules de classe II de lier des peptides de haute affinité puisqu'il augmenterait le temps d'action de DM sur l'échange peptidique. Par des

technique de co-immunoprécipitations successives, cette même étude démontre également la présence d'un complexe tri-moléculaire DR-DM-DO. Il demeure difficile de déterminer si ces trois molécules interagissent directement ensemble ou si elles font partie d'un même complexe protéique associé à la molécule tétraspane CD82 (170).

De plus, l'activité inhibitrice de DO dans le système murin semble moins évidente à prouver. En effet, la délétion de H2-O chez la souris ne démontre pas de différences significatives au niveau de l'expression de molécules classe II-CLIP en surface (151, 171). En revanche, une expérience récente utilise des ribozymes antisenses spécifiques à H2-O et montre une amélioration de la présentation antigénique (172). Les souris H2-O⁻ affichent également un répertoire de peptides différent des souris normales, ce qui suggère un rôle modulateur de DO sur la présentation antigénique (151, 169). Cette variabilité a aussi été démontrée en comparant des cellules DO-négatives avec les mêmes cellules transfectées avec DO (164, 165).

1.6.6 Rôle physiologique de DO dans les cellules B

Il est peu probable que la fonction de DO touche la présentation antigéniques en générale puisqu'il est retrouvé majoritairement au niveau des cellules B. Plusieurs groupes ont donc tenté de déterminer le rôle physiologique de DO dans ces cellules. Les premières études permettant d'y répondre ont été effectuées dans des souris *Knock out* n'exprimant plus de H2-O (151). En effet,

ces études ont démontré que DO défavorisait la présentation d'antigènes internalisés par endocytose non spécifique. Toutefois, la présentation de certains antigènes internalisés par les immunoglobulines de surface (BCR) était améliorée en présence de DO (voir figure 1.19).

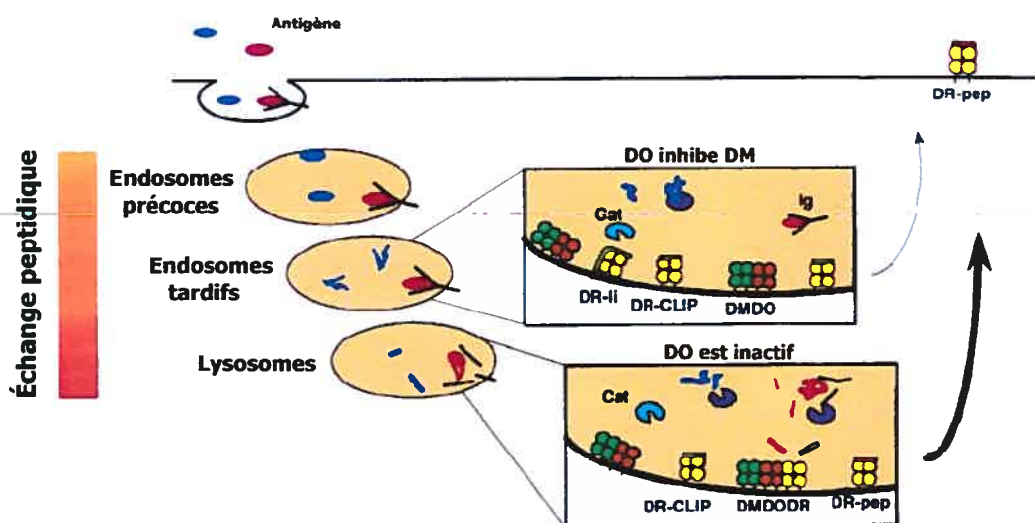


Figure 1.19 Modèle de DO favorisant la présentation de peptides internalisés par les immunoglobulines de surface

Des antigènes sont internalisés par pinocytose (bleu) ou via les Igs de surface (bourgogne) et entrent dans la voie endosomale. Les peptides générés dans les endosomes ne sont pas favorisés à cause de l'inhibition de DM par DO à ce type de pH. Les antigènes liés aux anticorps de surface sont protégés de la dégradation jusqu'aux lysosomes. A cet endroit, le potentiel inhibiteur de DO est diminué à cause du pH et la génération de peptides devient efficace, ce qui favorise la présentation de peptides dans ces compartiments et le transport ultérieur à la surface cellulaire (Adapté de Alfonso et Karlsson, 2000 (149)).

Cette différence peut être expliquée par la façon dont les antigènes vont être dégradés dans la cellule. En effet, la liaison des immunoglobulines de surface (BCR) avec les antigènes stabilise les domaines protéiques impliqués (173). Le

pH des endosomes n'est pas adéquat afin de dissocier les interactions anticorps:antigènes de forte affinité, ce qui protège l'antigène de la dégradation. En revanche, le pH acide retrouvé dans les lysosomes permet de dissocier les complexes et éventuellement de dégrader l'antigène afin de charger des peptides sur les molécules de classe II. Pour leur part, les antigènes internalisés par endocytose ou liants faiblement les immunoglobulines de surface peuvent être dégradés précocement dans la voie endocyttaire. Étant donné que DO inhibe DM à pH neutre ou légèrement acide (endosomes précoces), ces antigènes auraient peu de chances d'être chargés sur les molécules de classe II. Cette particularité de DO est supportée par certaines études chez la souris qui démontrent que l'utilisation de chloroquine (abaisse le pH des endosomes tardifs/lysosomes) diminue la présentation antigénique de façon plus prononcée dans les cellules exprimant du H2-O (169, 172).

L'activité de DO favoriserait donc la présentation de peptides générés dans les lysosomes et par le fait même les peptides spécifiques provenant d'antigènes liés fortement au BCR. Mais avant d'accepter cette hypothèse comme mécanisme d'action principal de DO, d'autres expériences devront être complétées. En effet, le groupe de Lars Karlsson a récemment obtenu certains résultats contradictoires à ce sujet (174). Lors de cette étude, la présentation de certains épitopes pouvait être diminuée en présence de H2-O lorsque l'antigène était internalisé par les immunoglobulines de surface. De plus, de façon surprenante, certains épitopes d'un même antigène ne démontraient pas la même dépendance envers H2-O.

1.6.6.1 Rôle de DO dans les centres germinatifs

Les travaux de Jensen montrent que HLA-DO est exprimé uniquement au niveau des lymphocytes B matures tandis que HLA-DR et HLA-DM sont exprimés dès le stade pro-B (152). Par ailleurs, il a été démontré que l'expression de DO est grandement réduite au niveau des cellules B retrouvées dans les centres germinatifs (CG) (152, 153, 175). Cette baisse pourrait expliquer en partie le rôle de DO dans les cellules B. En effet, le CG est un environnement limité en antigènes exogènes. De plus, les cellules B des CG ont déjà été sélectionnées pour leur affinité à un antigène. Il est donc probable que dans cet environnement contrôlé, il n'y ait plus la nécessité de freiner la présentation antigénique par DO. D'autre part, les BCR de surface des lymphocytes B sont présents en moins grande quantité dans les CG, ce qui réduit le potentiel d'internalisation via ce type de récepteur. Il est donc possible que la diminution de DO compense pour cette baisse de l'apprêtement antigénique.

1.6.6.2 Rôle de DO dans la sélection d'anticorps de haute affinité

Avec le temps, les souris H2-O⁻ accumulent une plus grande quantité d'IgG1 dans leur sérum. Cette hausse d'anticorps pourrait être due à une activité accrue de la présentation antigénique par les lymphocytes B. Une plus grande présentation suggère qu'un plus large éventail de peptides soit utilisé, ce qui implique donc une spécificité moindre. La présence de DO pourrait donc servir à

augmenter la spécificité des interactions cellules B-cellules T en favorisant la présentation d'antigènes spécifiques internalisés par les récepteurs de surface. Cette spécificité permettrait au système immunitaire de cibler efficacement les éléments antigéniques rencontrés tout en évitant l'activation de cellules inadéquates.

1.7 Objectifs de travail

La caractérisation du rôle de HLA-DO est un événement récent puisque ce n'est qu'à partir de 1996 que des études significatives ont permis de démontrer sa relation avec HLA-DM et son rôle modulateur dans la présentation antigénique. Par conséquent, peu d'études se sont attardées à la façon dont ces deux molécules peuvent s'influencer afin d'accéder aux différents compartiments endosomaux. Afin de répondre à cette question, nous avons effectué la caractérisation d'un signal dileucine fonctionnel contenu dans la queue cytoplasmique de HLA-DO β (voir article #2 an annexe). La régulation de DO β étant différente des autres molécules de classe II, nous avons également étudié la régulation de l'expression de HLA-DO dans un système cellulaire autre que les cellules B (voir article #1 an annexe). Ces deux études ne font toutefois pas l'objet d'une analyse en profondeur dans cette thèse qui se concentrera plutôt sur les aspects fonctionnels et structuraux de la molécule HLA-DO, pour lesquels il reste encore beaucoup de réponses à fournir.

Les répertoires de peptides sont à la base de la sélection thymique et du développement des maladies auto-immunitaires. L'étude d'un modulateur naturel de la présentation antigénique comme HLA-DO est donc importante afin de mieux comprendre la façon dont le répertoire peptidique est constitué. En utilisant un système cellulaire qui n'exprime aucune molécule de classe II (cellules HeLa ou 293T), il nous est permis de reconstituer en tout ou en partie la machinerie de présentation en transfectant nos molécules d'intérêt et ainsi étudier plus spécifiquement la structure et la fonction du complexe DO-DM. La façon dont l'hétérodimère HLA-DO $\alpha\beta$ se forme dans le réticulum endoplasmique, sa rétention dans le RE en absence de DM ainsi que les sites d'interaction entre DO et DM sont autant d'aspects pour lesquels nos études tentent d'amener des réponses. Avec l'aide des techniques de biologie moléculaire (ex : mutagenèse dirigée), de cytométrie en flux, de microscopie confocale et de biochimie nous avons pu analyser la structure de HLA-DO et la nature de sa fonction inhibitrice. La première étude de cette thèse porte donc principalement sur les contraintes structurales de HLA-DO qui induisent sa rétention dans le RE en absence de DM alors que la deuxième étude se concentre sur l'interface d'interaction DO/DM et tente d'amener des réponses concernant la fonction inhibitrice de HLA-DO.

CHAPITRE 2 – ARTICLE

**Mutation of the membrane-distal region of HLA-DO abrogates
DM-dependency for ER egress**

Francis Deshaies*, Alexandre Brunet*, Lisa Denzin# and Jacques Thibodeau**

* Laboratoire d'immunologie moléculaire, Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Québec, Canada.

Immunology Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Weill Graduate School of Medical Sciences of Cornell University, New York, USA.

Running title: HLA-DM modify HLA-DO's conformation

Keywords: Antigen Presentation, Cell Trafficking, MHC, FACS (sorting or staining)

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

2.1 RÉSUMÉ

HLA-DO est une molécule de classe II non classique qui module la fonction de HLA-DM pour le chargement de peptides sur les molécules de classe II classique comme HLA-DR. Dans les cellules B, la majorité des molécules HLA-DO sont associées avec HLA-DM et il a été suggéré que cette association permette à HLA-DO d'obtenir une conformation adéquate afin de progresser vers d'autres compartiments endosomaux. En analysant la région N-terminale de la molécule HLA-DO, nous avons découvert que ce domaine était critique afin de conférer une conformation appropriée à la protéine. En effet, nous avons développé une molécule chimérique où les 18 premiers acides aminés de chacune des chaînes α et β de HLA-DO ont été remplacés par une portion équivalente de HLA-DR. Nos résultats démontrent que cette nouvelle chimère est maintenant détectée dans les compartiments lysosomaux et à la surface cellulaire alors que la molécule sauvage est incapable de transiter hors du RE. Une analyse plus détaillée de la région N-terminale révèle qu'une simple substitution de la proline située en position DO α 11 était suffisante afin de corriger les défauts de rétention de la molécule dans le RE. Les changements conformationnels induits par la mutation seraient à l'origine de cette sortie. A cet effet, nous avons utilisé un anticorps conformationnel qui reconnaît préférentiellement la molécule HLA-DO lorsqu'elle est co-exprimée avec HLA-DM. Cet anticorps reconnaît également très bien le mutant HLA-DO P-V en surface des cellules. Nos résultats suggèrent donc que HLA-DO doit subir un changement conformationnel dans sa région N-terminale afin de sortir du

RE et que HLA-DM agit comme un chaperon en assistant le repliement et la maturation de la molécule HLA-DO.

2.2 ABSTRACT

HLA-DO is a non-classical class II molecule which modulates the function of HLA-DM and the loading of antigenic peptides on molecules such as HLA-DR. In B lymphocytes, the majority of HLA-DO was found associated with HLA-DM and it is speculated that this association allows HLA-DO to gain a proper conformation and to egress to endocytic compartments. By analyzing the N-terminal region of HLA-DO, we discovered that this domain contains important residues that may affect the proper conformation of the protein. Indeed, we designed a chimeric molecule in which the 18 first amino acids of each α and β chain of HLA-DO were replaced by the ones of HLA-DR1. Our results show that while wild-type HLA-DO remained in the ER, the chimera was now detected in the lysosomes and at the cell surface. Further investigation of the membrane-distal region revealed that substitution of the proline at position DO α 11 was sufficient to rescue DO from ER retention. Conformational change is likely to explain how the chimerical molecule or the mutated DO can egress the ER. Indeed, we used a conformational antibody that shows recognition of HLA-DO only when it's co-expressed with HLA-DM. This antibody also fully recognizes the mutated HLA-DO P to V molecule at the cell surface. Altogether, these results strongly suggest that HLA-DO must undergo a conformation change of its membrane-distal domain in order to leave the ER and that HLA-DM operates as a chaperone, assisting the folding and maturation of HLA-DO.

2.3 INTRODUCTION

MHC class II molecules are surface transmembrane glycoproteins that present antigenic peptide to specific CD4⁺ T lymphocytes in order to initiate an immune response (1). Once synthesized in the endoplasmic reticulum, the classical MHC class II molecules associate with the invariant chain (Ii). This interaction allows stabilization of the class II molecules, prevents the binding of endogenous peptide and targets the complex to the proper endosomal/lysosomal compartments (2-5). In these compartments, Ii is cleaved by proteases to generate a last piece (CLIP), which occupies the peptide-binding groove of the MHC molecule (6). Exchange of CLIP for antigenic peptides or polypeptides is catalyzed by HLA-DM, a class II molecule found within specialized lysosomal structure called MIIC (7-10).

By opposition to the classical MHC II molecules (HLA-DP/DQ/DR), HLA-DM is designated as a non-classical class II molecule because of its lack of polymorphism, its incapacity to present peptide and its very low expression at the cell surface (8, 10, 11). In addition to the removal of CLIP, other studies suggest that HLA-DM acts as a chaperone that stabilize empty class II molecule (12-14) and edits peptides presented by HLA-DR (9, 15-17). Another non-classical MHC related molecule, HLA-DO, was shown to accumulate in MIIC like compartments in a DM-dependant fashion (18). HLA-DO was first described as an HLA-DM inhibitor because its overexpression caused HLA-DR/CLIP accumulation at the cell surface (19, 20). However, HLA-DO seems to stabilize HLA-DM and

promote stable MHC-peptide complexes when physiological conditions are met (21). The biological role of HLA-DO was clarified following gene knock out of H2-O, the murine counterpart of HLA-DO (22). It was proposed that H2-O promotes presentation of antigens internalized by membrane immunoglobulins by selectively inhibiting the activity of H2-2M in early endocytic compartments rich in proteins internalized by fluid-phase endocytosis (22). This hypothesis is consistent with an active inhibitory role of HLA-DO at high pH (early endosomes) as opposed to a poor inhibitory role at low pH (MIIC compartments) (22).

In B-cells, the majority of HLA-DO is found associated with HLA-DM (19, 21) and it is speculated that this association allows HLA-DO to gain a proper conformation in order to egress to endocytic compartments (18). So far, the mechanisms that are responsible for the ER retention of HLA-DO in absence of HLA-DM are not well understood. To shed some light on the mechanism that regulates this retention, we made use of a chimerical molecule between DR and DO and we performed mutagenesis on the floor of the putative binding groove of HLA-DO. Our results show that modification of the membrane-distal region of HLA-DO was sufficient to achieve DM-independency for ER egress.

2.4 MATERIALS AND METHODS

Plasmids and cDNA

pBSDO α .9, pBSDO β , pBudCE4-A, pBudDO α β and pBudDM have been described previously (23, 24). RSV.5gptDN1 (25) and 45.1 DO β (26) cDNAs were obtained from DR E Long. pREP4CIITA was obtained from Dr JP Ting. pBSDO α .9 was subcloned in RSV.5neo by digesting with *SaII/XbaI* to generate RSV.5neoDO α . The DO β cDNA in 45.1 was excised with *BamHI* and the 1.3 kb fragment was cloned in RSV.7hygro plasmid to generate RSV.7hygroDO β . To construct pBS DR α , a *BamHI* fragment from DR α cDNA was inserted into pBluescript KS⁺ vector.

Creation of the DR₁₈/DO molecules and DO mutations

RSV.3 cDO β (27, 28) was previously described. To generate cDO α molecule, the 18 first amino acids of HLA-DO α were replaced by the corresponding amino acids of HLA-DR α by PCR overlap extension method. A first fragment was amplified from pBS DR α using the Bluescript reverse primer and a mutagenic primer which encodes a fusion between the N-terminus of HLA-DR α and HLA-DO α (oligonucleotide DR α ₁₈/DO α B: 5'-GT GAA CTG GCC CGA TTG GTC AGG ATT CAG- 3'). A second fragment was generated from RSV.5gptDN1 using a complementary fusion primer (DR α ₁₈/DO α C: 5'-CTG AAT CCT GAC CAA TCG GGC CAG TTC AC -3') and a primer, which anneal to the 3' end region of DO α (DO α 3': 5'-CCA CTC AAA GTC AGC ACA GCG -3'). The

two overlapping PCR products were mixed and a final PCR reaction was done using the flanking primers. The region of junction was subcloned into RSV.5gptDN1 by inserting a *SaI*-*PvuII* fragment. The nucleotide sequence was further confirmed by DNA sequencing. The resulting construction was excised with *Bam*HI and a 2 kb fragment was cloned into SR α vector (29) coding for puromycine resistance (SR α puro was kindly provided by Dr. François Denis) to generate SR α puroCDO α . The single point mutations (DO α P11V, α Δ P11 and α A12N) in DO α was created by overlap PCR using pBSDO α .9 as template. PCR products were digested with *SaI*-*PvuII* and cloned into pBudDO α β using the same sites to generate pBudDO α P11V/ β wt, pBudDO α Δ P11/ β wt and pBudDO α A12N/ β wt.

Antibodies

Anti-calnexin antibody, SPA-865 (Stressgen, BC, Canada) and Phycoerythrin (PE)-coupled Anti-CD63 (Becton Dickinson, USA) were used in this study. XD5.117 is an anti-DR β (IgG₁) mAb (30). Rabbit antisera were raised against keyhole limpet hemocyanin (KLH) conjugated to the peptides corresponding to the cytoplasmic tail of HLA-DO β , HLA-DO α (CMGTYVSSVPR-11) and HLA-DM β (EQGDAPAILFDKEF-14). MAP.DM1 monoclonal antibody reacts with the extracellular domain of HLA-DM (Pharmingen, USA). HKC5 recognizes the cytoplasmic domain of DO β and was generated by injections of BSA-conjugated peptides (Khalil *et al.*, submitted to Tissue Antigens). Mags.DO monoclonal

antibody was generated by repeating injection of purified DO-DM complexes into mouse.

Cell lines and transfections

Raji B lymphocyte cells (Burkitt lymphoma) and HeLa cells were kindly provided by Dr. R.P. Sékaly. HeLa DM.5 is a clone from the HeLa DM cells and was kindly provided by Dr. P. Cresswell (31). 293T cells were kindly provided by Dr. Eric Cohen. Cells were cultured in DMEM, 10% fetal bovine serum (Wisent, St-Bruno, Qc.) and with appropriate selective agents (see below). HeLa cells were co-transfected by the calcium phosphate precipitation method (32) using 2 μ g SR α puro DR₁₈/DO α molecule along with 20 μ g of RSV.3 DR₁₈/DO β . HeLa cells were also transfected using Fugene6. (Roche Diagnosis, Canada). Briefly, 2x10⁵ cells were plated 1 days before transfection. At day of transfection, 2 μ g of RSV.5neoDO α and the same amount of RSV.7hygroDO β was used with Fugene6 reagent as described by the manufacturer. Cells were also transfected with 2 μ g of pREP4CIITA alone or in combination with pBudDO $\alpha\beta$ or pBudDO α P11V/ β wt. Two days after, selective agents were added to a final concentration of 500 μ g/ml of G-418 (Gibco-BRL, Burlington, ON), 50U/ml of hygromycin or 100 μ g/ml of zeocin (Cayla, Toulouse, France). HeLa DM.5 cells were co-transfected by calcium phosphate using 20 μ g of SR α puroDR₁₈/DO α molecule along with 2 μ g of RSV.5neoDR₁₈/DO β . For transient expression, HEK293T cells were transfected by the calcium phosphate precipitation method using 2 μ g of each

DNA. Cells were analyzed 2 days post-transfection. To perform BFA experiments, HEK293T cells were treated at a final concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ of Brefeldin-A 6 hours after transfection. Cells were analyzed 16 hours post-transfection.

Flow Cytometry Analysis

Cells were harvested using trypsin, washed and treated for surface or intracellular staining. For surface staining, cells were treated with anti-DO β serum, DO.1 antibody for 30 min at 4°C, washed in PBS and incubated with a Alexa Fluor 488-conjugated[®]goat anti-mouse IgG antibody (Molecular Probes, Eugene, Oregon) for another 30 min at 4°C. Cells were washed in PBS and analyzed by flow cytometry on a FACS[®]calibur (Becton Dickinson, USA). As negative control, untransfected HeLa or 293T cells were stained. For intracellular staining, one wash of PBS was done between each of the following steps: cells were treated with 4% paraformaldehyde for 20 minutes, then cells were treated with 50mM NH₄Cl for 15 minutes and further incubated with PBS BSA 1% saponine 0.05% solution for permeabilization. After 15 minutes, primary antibody was added using the same permeabilization solution for 20 minutes. After one wash with PBS, Alexa Fluor 488-conjugated[®]goat anti-mouse IgG was added for another 20 minutes.

Fluorescence microscopy

HeLa cells were plated on cover slips in 24 well plates and cultivated for 2 days before intracellular staining. HEK293T transfectants were stained, transferred on microscope slides by cytospin centrifugation and mounted as described below. Intracellular staining was performed as described previously (FACS analysis) by using a DO-specific, DM-specific serum, Calnexin-specific or anti-CD63-PE antibody followed by biotinylated (Bio/Can Scientific, Ont., Canada) or FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody. To detect mouse antibodies, Alexa Fluor 488-conjugated® goat anti-mouse IgG antibody was used. When necessary, cells were washed twice and incubated with Texas red-coupled streptavidin (Amersham Pharmacia Biotech) for 20 min. Cells were finally washed two times and the cover slips were mounted using Geitol Mounting Medium (Immunon Shandon, PA, USA). Cells were then analyzed by fluorescence microscopy on a Zeiss axioscope microscope (Carl Zeiss, Germany). Photographs were taken with a Zeiss microscope camera MC 100 on Kodak elite chrome 400 films.

Immunoprecipitations and EndoH treatment

In order to do immunoprecipitation experiments, cells ($1,2 \times 10^7$) were trypsinized, washed in PBS and lysed into Triton-X100 1% as described previously (33). After centrifugation, supernatants were harvested and incubated with 20 μ l (50% beads) of CL-6b sepharose (Pharmacia, Canada) for 1 hour at 4°C with agitation. Cell lysates were transferred into new microtubes containing 20 μ l (50% beads) of

sepharose-protein A (Pharmacia) coupled to HLA-DO β or HLA-DM antibody. Samples were agitated overnight at 4°C. Beads were centrifuged, washed three times with lysate buffer and resuspended in Laemli buffer (5X). For EndoH treatment, cells were lysed into Triton-X100 1% and directly digested with Endoglycosidase H for 30 minutes at 37°C. Samples were boiled and loaded on 10% SDS-PAGE. Gels were transferred to Hybond ECL membranes (Amersham, Canada) and blotted with the rabbit DO α , DO β or DM β serum overnight at 4°C with agitation. Secondary antibody (peroxydase-coupled goat anti-rabbit; Bio/Can. Scientific, Ont. Canada) was used at 1:1000 dilution for 2 hours at room temperature. After washings, the membrane was developed by chemiluminescence (Boehringer-Mannheim, Germany) on Kodak XAR-5 films.

2.5 RESULTS

DM induces conformational changes on HLA-DO early after synthesis in the ER

Misfolding of newly synthesized proteins is known to induce retention and aggregation of the proteins in the ER (34). Because HLA-DO is retained in the ER in absence of HLA-DM, misfolding is likely to explain this phenotype and further binding of HLA-DM would rescue the conformational state of HLA-DO allowing its ER egress. In order to evaluate how the structure of HLA-DO is influenced by HLA-DM, we used a conformational antibody specific for HLA-DO (Mags.DO). This antibody is presumed conformational because of its incapacity to detect DO molecules by western blotting. We also demonstrate that this antibody is specific to the DO β chain. Indeed, we have designed chimerical recombinant molecules where the first 18 amino acids of each DO chains were replaced by the corresponding DR region (DR α /cDO β and cDO α /DR β ; fig. 1AB). With this system, we can express mixed pairs between DR and DO and determine the specificity of the antibody. As shown in figure 1C, the Mags.DO antibody recognizes the mixed pair expressing the DO β chain but not the one containing DO α . Cell surface expression of the mixed pairs was verified with L243 (DR α -specific) and XD5.117 (DR β -specific) antibodies.

If HLA-DM can truly rescue the degradation of HLA-DO, we suspect that the conformational antibody will differentiate between DO in either a free form or in a

DO-DM form. To verify this hypothesis, we transfected HeLa cells with HLA-DO alone or HLA-DO along with HLA-DM. We then compared by flow cytometry the level of recognition of the antibodies. As shown in figure 2A, the conformational antibody recognizes more strongly HLA-DO when HLA-DM is co-expressed, suggesting that DM induces a conformational change on HLA-DO. To confirm that our result was not attributable to a difference in DO expression, we stained cells with a non-conformational DO β specific antibody (HKC5). Comparable level of DO β was transfected in each cell line (fig.2A). Moreover, because DO β and DO α are encoded on the same pBud vector, we can assume that an equivalent amount of DO α is present. In order to verify whether the conformational change induced by DM occurs early after synthesis in the ER or later in the lysosomal compartments, we treated transfected cells with brefeldin A (BFA). BFA blocks the progression of the molecules along the protein synthesis pathway by inducing the fusion of the ER with the early Golgi apparatus. As shown in figure 2B, the conformational change seems to take place in the ER compartments since the reactivity of Mags.DO over HKC5 is increased in the presence of DM and this reactivity is a comparable between treated and untreated BFA cells.

Modification of the N-terminal region of HLA-DO rescues its retention from the ER

Numerous studies have described a key role of the N-terminal regions of the alpha and beta chains of MHC class II molecules for the formation of stable

heterodimers (35-39). In an effort to understand the retention mechanism and to evaluate the relative importance of these regions on association of HLA-DO's chains, we have designed a new chimeric recombinant molecule where the first 18 amino acids of both DO chains were replaced by the corresponding DR region (cDO; fig. 1AB). This chimera should give insightful information on whether DO retention is caused by an improper pairing of the α/β chains.

HeLa cells were stably transfected with either the cDO constructions or the wild type HLA-DO. We then investigated if the chimerical cDO molecule could be detected at the cell surface compared to the wild-type DO-expressing HeLa cells. As expected, the wild type HLA-DO could not be found at the cell surface in these cells when stained with the Mags.DO antibody (fig. 3A). This is reminiscent of the ER retention and confirms the B-cell phenotype as well as observations made by other groups (18). Strikingly, the cDO molecule was found at the cell surface (fig. 3A) and could be sorted using Mags.DO and GAM-coated magnetic beads. Since DO β encodes a lysosomal sorting motif (23), it was of interest to determine if this motif would be functional in the context of the chimerical molecule. To answer this question, we analyzed the localization of the DO and cDO molecule in HeLa transfected cells by fluorescence microscopy using antibodies against DO β . Immunostaining of DO expressing cells revealed a weak ER signal, which was similar to the one described previously by others in the same type of cell (fig. 3B) (18). By opposition to the ER pattern observed in DO transfected cells, the cDO molecule accumulates in clear perinuclear vesicles distinct from calnexin-

containing compartments (fig. 3B). The expression pattern was reminiscent of an endosomal/lysosomal staining similar to the one observed previously (23), indicating that the di-leucine motif is functional in this context. Finally, the acquisition of EndoH resistance of cDO molecule (fig. 3C) suggests that cDO molecules have reached the Golgi complex to undergo post-translational modifications. Such modifications have been described previously for HLA-DO/DM. DO/DM complexes are shown as positive control in the EndoH resistance assay (fig. 3C).

To evaluate the fate of the chimerical molecule when HLA-DM is present and further test if these molecules interact, we transfected HeLa DM.5 cells with the cDO construction. Since this heterodimer shows a different conformational state than DOwt, it was intriguing to test if this molecule still associates with DM and if its surface expression can be altered by such interaction. Indeed, if interaction occurs, one might expect that HLA-DM will preclude surface expression of cDO molecule through sorting by its tyrosine-based signal. As shown in figure 4A, fewer molecules are detected when DM is co-expressed in comparison to cDO alone. Intracellular staining confirmed that these two different cells were expressing the same amount of molecules (fig.4A). To further confirm the association between cDO and DM, co-immunoprecipitation experiments were performed (fig. 4B). The cell lysates were immunoprecipitated with the Mags.DO antibody and blotted with the DM-specific rabbit serum. As a positive control, we used Raji B lymphocytes cell line, which contains both DO and DM. Using either

CHAPS or Triton X-100 detergents, interaction between the chimerical molecule and HLA-DM remained strong (fig. 4B).

A Single mutation of the membrane-distal region of HLA-DO α chain abrogates ER retention

Modification of the N-terminal region of HLA-DO (cDO) has proven to induce significant correction of the conformation and ER egress of DO. This result suggests that there might be a pairing default between DO α and DO β in this region. To find out which residues would cause mispairing of the heterodimer, we compared the N-terminal amino acids sequence of HLA-DO with other classical class II molecules. Interestingly, HLA-DO sequence is very homologous to HLA-DQ2 in this region and DO α contains an extra amino acid comparable to the one found in DQ, causing a bulge on the peptide binding floor. Sequence alignment shows a major difference between DO and DQ since a proline is found at position 11 of the DO α chain while a valine stands for the equivalent residue of DQ2 α . (fig. 5A). Proline has an inflexible structure and may cause irregularities in the peptide-binding groove of the molecule. In order to verify if this amino acid was responsible for the ER retention of HLA-DO, we performed mutagenesis to delete this proline or to replace it for a valine. We also replaced the alanine in proximity of this proline for an arginine. HEK293T cells were then transfected with DOwt or mutant DOP11V (DO α P11V/ β WT) and stained for cell surface expression. As expected, no DOwt molecules could be detected at the cell surface. However, the replacement of this proline for a valine allowed a dramatic increase of DO

expression (fig. 5B). Interestingly, the deletion of the proline failed to correct the misfolding of DO as no molecules could be detected at the surface. The mutation of the alanine next to the proline could not restore DO expression. Altogether, these results suggest that the proline is solely responsible for the mispairing of the DO α and DO β chain in the N-terminal region of the molecule. However, the full amino acid sequence of DO α is required to achieve conformational restoration. Moreover, cell surface expression of DOP11V was also detected in stable HeLa transfected cells (fig 5C), suggesting that the conformational correction observed is not cell type-dependent.

To confirm that the mutated DO (DOP11V) could reach the Golgi apparatus and lysosomal compartments, we performed immunofluorescence on transfected 293T cells. As expected, the mutated DO clearly accumulates in perinuclear vesicles co-localizing with CD63, a marker of lysosomal compartments, while DOwt revealed a weak ER signal (fig 6A). We then addressed whether DOP11V could egress ER as efficiently as the DO/DM complex. To this respect, trafficking of the DOP11V molecule inside of the cell was assessed. HEK293T cells were transfected with DO, DO+DM and DOP11V, and lysates were prepared after 6, 8, 10 and 12 hours post-transfection. Samples were digested with endoH enzyme and analyzed by western blot. As shown in figure 6B, DO/DM complexes demonstrate endoH resistance starting at 8 hours while DOwt failed to acquire such resistance. Interestingly, endoH resistance pattern of DOP11V was similar to the one observed with DO/DM complexes. This result strongly suggests that the

mutation induced on DO influences the trafficking of the molecule in a DM-like fashion.

DM binds strongly to DOP11V without enhancing its overall conformation

We have previously shown that the modification of the N-terminal region of HLA-DO was not significantly affecting its capacity for HLA-DM binding. To confirm that the proline was not critical for the binding of DO to DM, we performed immunoprecipitation experiments. FACS analysis was conducted to evaluate the expression of molecules prior to immunoprecipitations. As described for the chimerical cDO molecule, DOP11V was sequestered from the cell surface by HLA-DM, suggesting a strong association between DM and DOP11V (fig. 7A). Immunoprecipitation experiments confirmed the interaction between these molecules (fig 7B). Moreover, having seen a significant improvement in the conformation of HLA-DO induced by the influence of HLA-DM, it was interesting to evaluate to which extent the DOP11V mutation was able to stabilize the conformation of this molecule. In order to do so, we transfected HEK293T cells with DOP11V molecule in the presence or absence of HLA-DM and tested whether or not an improvement in the reactivity of the Mags.DO antibody was observed. As seen in figure 7C, the conformational antibody didn't reveal an increased signal when HLA-DM is present as compared to the molecule alone. This strongly suggests that DOP11V adopts an optimal conformation without any influences from DM.

DOP11V is not impaired in its capacity to inhibit the catalytic activity of HLA-DM

To evaluate if the mutated DOP11V was functional, we co-transfected this molecule along with CIITA in HeLa cells. We then assessed the capacity of the mutant DO molecule (DOP11V) to inhibit CLIP release from class II molecules. Control HeLa cells transfected exclusively with CIITA and sorted using L243 expressed high levels of class II, little DO β and displayed few CLIP-class II complexes at their surface (Fig. 8) (40). As expected, cells co-transfected with CIITA together with DO^{wt} and sorted using L243 displayed a marked accumulation of CLIP. Comparable accumulation of CLIP was also obtained by co-transfecting CIITA with DOP11V, suggesting that the mutation induced on DO leads to a conformational change which does not interfere with its capacity to inhibit DM.

2.6 DISCUSSION

Many groups have described conformational changes of MHC class II molecules upon pH modification or following interaction with other MHC molecular partners (41, 42). Indeed, classical class II molecules such as HLA-DR gain functional conformation at acidic pH and are greatly influenced by the binding of HLA-DM. However, only limited information concerning HLA-DO conformational state is available in the literature, focusing mainly on the influence of the acidic environment. These types of experiments were generally performed using 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS), which recognizes hydrophobic residues exposed at the surface of molecules. In this study, we used a conformational antibody that preferentially recognizes HLA-DO folded in proper physiological conformation. For the first time, we demonstrate that HLA-DM affects the conformations of HLA-DO. Indeed, comparison between 293T cells transfected with DO and DO/DM was done using Mags.DO and a second non-conformational antibody restricted to DO β cytoplasmic tail, HKC5. Analysis of both cells with HKC5 illustrates an identical level of DO expression. On the other hand, staining with the Mags.DO antibody is stronger with the DO-DM expressing cell than DO alone even if the cells express identical levels of DO.

In HeLa cells and in murine B-lymphocytes, HLA-DO was shown to be totally dependent on its association with HLA-DM to egress the ER (18). In an effort to understand the ER retention mechanism of HLA-DO, we modified this molecule

in order to optimize pairing between the alpha and beta chains (Figure 1). Interestingly, this new cDO molecule was found to be expressed at the cell surface as well as in lysosome-like compartments. Furthermore, western blot analysis of the chimerical molecule showed that the maturation was similar to the one described for the DO/DM complexes. This result suggests that the N-terminal region of HLA-DO affects pairing of DO α and DO β . To rule out that the retention of DO was not attributable to a complete failure of the DO α and DO β chain to interact with each other, co-immunoprecipitation experiments were conducted. In these experiments, DO α and β chains showed strong association, comparable to the one found between cDO α and cDO β (data not shown). This result is consistent with other studies performed on mismatched combinations of class II MHC molecules showing that co isolation of the α and β chains was efficient regardless of whether or not α/β class II dimer would be expressed at the cell surface (39). Altogether, these data suggest that DO_{wt} ER retention is attributable to an inappropriate pairing between α and β chain at the N-terminal region.

A proper folding of the chimerical cDO molecule indicates that the 18 first amino acids of HLA-DO are critical for the overall conformation of HLA-DO. Comparison of the 18 first amino acids of HLA-DO with other MHC molecules such as DR and DQ revealed variations susceptible to cause an irregularity in the structure of the molecule. This analysis pointed to a critical residue (DO α P11) predicted to influence the formation of H-bound between α and β chains. Indeed,

proline is an inflexible structure that may affect other amino acids in close vicinity. Interestingly, Ia^k alpha molecule also contains a proline in its N-terminal domain in position $\alpha 13$. Crystal structure reveals that this proline is unable to form hydrogen bond with any other residues located on the same chain or on the opposite β chain. If such scenario is transposable to DO, the modification we made to the valine may have restored critical hydrogen bonds necessary for the proper pairing of α and β chains.

Since cDO molecule and DOP11V mutant adopt a proper conformation and can egress ER without HLA-DM, it was important to verify if these molecules were still able to bind HLA-DM. Our data demonstrate that that despite discrepancy between conformational states of the modified DO molecules and free HLA-DO, HLA-DM was able to strongly bind to both molecules. This result suggests that the binding capacity of HLA-DM is not restricted to a specific HLA-DO conformation. We can also confirm that the 18 first amino acids of HLA-DO are not essential for its interaction with HLA-DM. Indeed, the chimerical cDO molecule that lacks the 18 first amino acids of DO shows strong binding to DM. In other respects, it was surprising to find little amount of chimerical molecule or mutated DO at the cell surface despite potential sequestration of DM inside lysosomal compartments. This could be explained by the fact that these molecules are not dependent of DM to exit the ER. It is thus conceivable that a fraction of the molecules will progress to the cell surface before ever encountering DM.

Early after their synthesis in the ER, α and β chain of MHC molecules must associate to avoid premature degradation. It is also known that classical MHC molecules such as HLA-DR must gain a proper folding in order to egress to other compartments, otherwise molecular chaperones such as BIP and calnexin will retain these molecules inside the ER (43). Although HLA-DO has not been investigated for the binding of these chaperones so far, we can assume that it will obey similar rules. It is likely that a transient association with ER chaperones such as BIP, calnexin or calreticulin will cause retention. This association probably persists until DM interacts with DO to form a transport competent multi-unit complex. Indeed, one can speculate that DM allows DO to egress the ER by inducing the removal of an ER resident chaperone. In that model, it is not known whether HLA-DM would directly compete with this chaperone or if it would rescue HLA-DO by modifying its conformation in a way the chaperone will no longer recognize it. Our results strongly suggest the later option for several reasons. First, we clearly show that DM modifies the conformation of HLA-DO. Second, analysis of our chimerical cDO molecule or DOP11V mutation suggests that a correction of the conformation is sufficient to avoid retention. Third, N-terminally modified DO can egress from ER, which suggests that it is not constrained by any chaperone activity. Finally, HLA-DM continues to bind these molecules even if the molecular chaperones are apparently not further involved. It is thus unlikely that DM and the chaperone will compete for the same HLA-DO residues.

High stability is another interesting feature of the mutated DOP11V molecule. Numerous independent HeLa transfections have shown an improved expression of the mutated DO over DOwt (see figure 3A-HKC5 staining). Interestingly, this difference is only marginal when using HEK293T cells (see figure 3A). This divergence could be attributable to a poorer catabolic pathway in HEK293T cells or could simply be due to transient expression. Indeed, degradation of DO may require more than 48 hours to be visualized. In the future, it will be interesting to investigate the possible role of the proteasome on the premature degradation of DO β in HeLa cells. Moreover, nobody has been able to work properly with DO because of its poor stability. With the use of the DOP11V molecule, we hope to produce enough molecules to resolve the crystal structure of DO. Preliminary results have shown a dramatic improvement of the expression of the modified DO in drosophila cells over DOwt. This finding will have tremendous impact on understanding the function of DO since it will answer the question as whether or not HLA-DO is able to bind peptides in its groove-like domain. It will also provide valuable indications of the exposed residues susceptible to make contacts with HLA-DM in order to modulate its activity.

Altogether, the results presented in this study suggest that the DO's retention is attributable to an inappropriate pairing between α and β chain at the N-terminal region. It also raises the question whether or not DO α and DO β are natural partner. Numerous studies have proven that these two gene products truly interact in *in vitro* and *in vivo* experiments. However, it is conceivable that DO α and DO β

could have previously evolved with different partners. Several pieces of evidence suggest that. First, the two DO genes are located quite far from each other, in opposition to other class II genes located pair wise. Second, DO α expression is regulated by CIITA while DO β is not. In this regard, it is tempting to speculate that the immune system has developed an “isotype mismatching strategy” between DO α and DO β to facilitate DO-DM association in the ER compartments and to avoid the presence of free DO in the endocytic pathway in order to optimize its regulatory activity on DM.

2.7 ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank M. Serge Sénéchal for Facs analysis and cell sorting, Dr. Eric Cohen for the use of the fluorescence microscopy facility. This work was supported by grants to J.T. from the Canadian Institute for Health Research and the Cancer Research Society Inc. F.D. and A.B are scholars of the FCAR (Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche). JT holds a FRSQ fellowship.

2.8 ABBREVIATIONS

ANS : 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid

BSA : Bovine serum albumine

CLIP : CLass II associated Invariant chain Peptide

DM: HLA-DM

DO : HLA-DO

DR : HLA-DR

ER: Endoplasmic reticulum,

Ii : Invariant chain,

MIIC : MHC class II compartment

MHC: Major histocompatibility complex

PBS : Phosphate buffer saline

PCR : Polymerase chain reaction

BFA : Brefeldin A

2.9 REFERENCES

1. Cresswell P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12:259-93
2. Bakke O, Dobberstein B. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63:707-16
3. Lotteau V, Teyton L, Peleraux A, Nilsson T, Karlsson L, Schmid SL, Quaranta V, Peterson PA. 1990. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348:600-5
4. Roche PA, Cresswell P. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345:615-8
5. Roche PA, Marks MS, Cresswell P. 1991. Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein. *Nature* 354:392-4
6. Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC. 1995. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378:457-62
7. Sloan VS, Cameron P, Porter G, Gammon M, Amaya M, Mellins E, Zaller DM. 1995. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA- DR. *Nature* 375:802-6
8. Denzin LK, Robbins NF, Carboy-Newcomb C, Cresswell P. 1994. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1:595-606
9. Weber DA, Evavold BD, Jensen PE. 1996. Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* 274:618-20
10. Mosyak L, Zaller DM, Wiley DC. 1998. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* 9:377-83
11. Fremont DH, Crawford F, Marrack P, Hendrickson WA, Kappler J. 1998. Crystal structure of mouse H2-M. *Immunity* 9:385-93
12. Denzin LK, Hammond C, Cresswell P. 1996. HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J. Exp. Med.* 184:2153-65

13. Kropshofer H, Arndt SO, Moldenhauer G, Hammerling GJ, Vogt AB. 1997. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* 6:293-302
14. Vogt AB, Moldenhauer G, Hammerling GJ, Kropshofer H. 1997. HLA-DM stabilizes empty HLA-DR molecules in a chaperone-like fashion. *Immunol. Lett.* 57:209-11
15. Katz JF, Stebbins C, Appella E, Sant AJ. 1996. Invariant chain and DM edit self-peptide presentation by major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. *J. Exp. Med.* 184:1747-53
16. Kropshofer H, Vogt AB, Moldenhauer G, Hammer J, Blum JS, Hammerling GJ. 1996. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J.* 15:6144-54
17. Van Ham SM, Grueneberg U, Malcherek G, Broeker I, Melms A, Trowsdale J. 1996. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs. *J. Exp. Med.* 184:2019-24
18. Liljedahl M, Kuwana T, Fung-Leung WP, Jackson M, Peterson PA, Karlsson L. 1996. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* 15:4817-24
19. Denzin LK, Sant'Angelo DB, Hammond C, Surman MJ, Cresswell P. 1997. Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 278:106-9
20. Van Ham SM, Tjin EPM, Lillemeier BF, Gruneberg U, Van Meijgaarden KE, Pastoors L, Verwoerd D, Tulp A, Canas B, Rahman D, Ottenhoff TH, Pappin DJ, Trowsdale J, Neefjes J. 1997. HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol* 7:950-7
21. Kropshofer H, Vogt AB, Thery C, Armandola EA, Li BC, Moldenhauer G, Amigorena S, Hammerling GJ. 1998. A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.* 17:2971-81
22. Liljedahl M, Winqvist O, Surh CD, Wong P, Ngo K, Teyton L, Peterson PA, Brunmark A, Rudensky AY, Fung-Leung WP, Karlsson L. 1998. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8:233-43
23. Brunet A, Samaan A, Deshaies F, Kindt TJ, Thibodeau J. 2000. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta. *J. Biol. Chem.* 275:37062-71

24. Faubert A, Samaan A, Thibodeau J. 2002. Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM. *J. Biol. Chem.* 277:2750-5
25. Rosen-Bronson S, Long EO. 1991. An unusual form of alternative splicing in the HLA-DNA gene. *Immunogenetics* 33:124-31
26. Tonnelle C, DeMars R, Long EO. 1985. DO β : a new β chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J.* 4:2839-47
27. Samaan A, Thibodeau J, Mahana W, Castellino F, Cazenave PA, Kindt TJ. 1999. Cellular distribution of a mixed MHC class II heterodimer between DR α and a chimeric DO β chain. *Int. Immunol.* 11:99-111
28. Thibodeau J, Lavoie PM, Samaan A, Corre JP, Sékaly RP, Cazenave PA. 1998. Conserved structural features between HLA-DO β and -DR β . *Mol. Immunol.* 35:885-93
29. Takebe Y, Seiki M, Fujisawa JI, Hoy P, Yokota K, Arai KI, Yoshida M, Arai N. 1988. SR α 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.* 8:466-72
30. Radka SF, Machamer CE, Cresswell P. 1984. Analysis of monoclonal antibodies reactive with human class II beta chains by two-dimensional electrophoresis and western blotting. *Hum. Immunol.* 10:177-88
31. Pierre P, Denzin LK, Hammond C, Drake JR, Amigorena S, Cresswell P, Mellman I. 1996. HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. *Immunity* 4:229-39
32. Graham FL, van der Eb AJ. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-67
33. Lavoie PM, Thibodeau J, Cloutier I, Busch R, Sekaly RP. 1997. 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* 94:6892-7
34. Marquardt T, Helenius A. 1992. Misfolding and aggregation of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 117:505-13
35. Braunstein NS, Germain RN. 1987. Allele-specific control of Ia molecule surface expression and conformation: implications for a general

- model of Ia structure- function relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2921-5
36. Sant AJ, Braunstein NS, Germain RN. 1987. Predominant role of amino-terminal sequences in dictating efficiency of class II major histocompatibility complex $\alpha\beta$ dimer expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8065-9
 37. Braunstein NS, Germain RN, Loney K, Berkowitz N. 1990. Structurally interdependent and independent regions of allelic polymorphism in class II MHC molecules: implications for Ia function and evolution. *J. Immunol.* 145:1635-45
 38. Buerstedde JM, Pease LR, Nilson AE, Bell MP, Chase C, Buerstedde G, McKean DJ. 1988. Regulation of murine MHC class II molecule expression. Identification of A beta residues responsible for allele-specific cell surface expression. *J. Exp. Med.* 168:823-37
 39. Sant AJ, Hendrix LR, Coligan JE, Maloy WL, Germain RN. 1991. Defective intracellular transport as a common mechanism limiting expression of inappropriately paired class II major histocompatibility complex $\alpha\beta$ chains. *J. Exp. Med.* 174:799-808
 40. Khalil H, Deshaies F, Bellemare-Pelletier A, Brunet A, Faubert A, Azar GA, Thibodeau J. 2002. Class II transactivator-induced expression of HLA-DO(beta) in HeLa cells. *Tissue Antigens* 60:372-82
 41. Busch R, Reich Z, Zaller DM, Sloan V, Mellins ED. 1998. Secondary structure composition and pH-dependent conformational changes of soluble recombinant HLA-DM. *J. Biol. Chem.* 273:27557-64
 42. Ullrich HJ, Doring K, Grueneberg U, Jaehnig F, Trowsdale J, Van Ham MS. 1997. Interaction between HLA-DM and HLA-DR involves regions that undergo conformational changes at lysosomal pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13163-8
 43. Cotner T, Pious D. 1995. HLA-DR beta chains enter into an aggregated complex containing GRP-78/BiP prior to their degradation by the pre-Golgi degradative pathway. *J. Biol. Chem.* 270:2379-86

2.10 FIGURES

Figure 1. Chimerical DR/DO molecules

(A) Schematic representation of the recombinant molecules and full length HLA-DO used in this study. The chimerical molecule consists of an heterodimer between two recombinant chains: the first 18 amino acids of the DO chains were replaced by their corresponding DR counterparts. Recombinant molecules are described in Materials and Methods. Amino acid sequence at the chimerical molecule junction is depicted below. (B) TCR View of the peptide-binding groove of HLA-DR. The 18 first amino acid stretch of the α chain (red) and β chain (green) are highlighted in color. (C) Mags.DO characterization was performed by surface staining (bold line) of two different chimerical molecules (cDO α /DR β ; left panel, DR α /cDO β ; right panel). Detection of the chimeras was assessed by using XD5.117 and L243 (thin line).

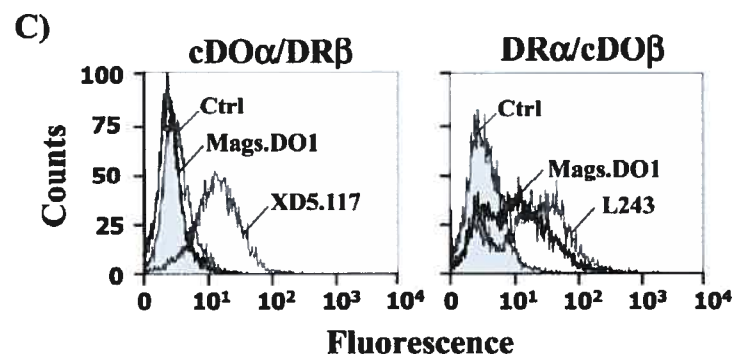
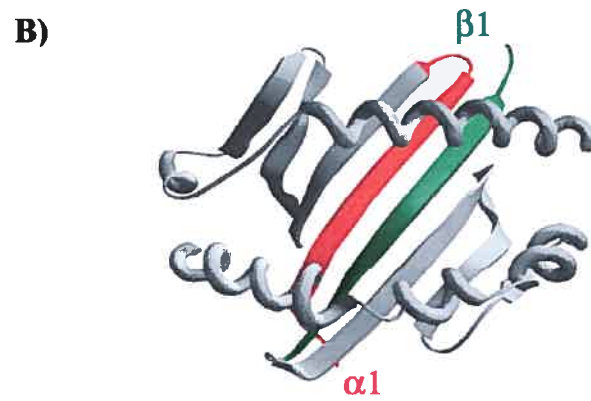
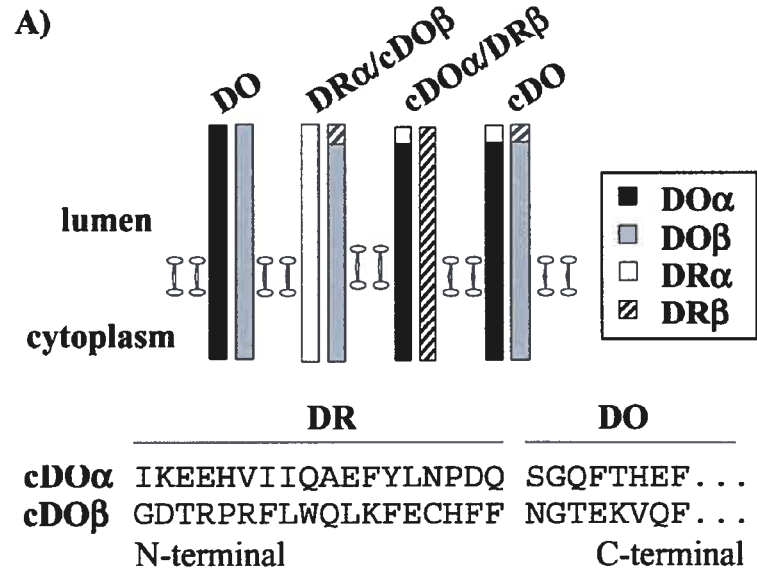


Figure 2. A DM-induced conformational change on HLA-DO occurs early after protein synthesis in the ER.

(A) Permeabilized cells expressing the HLA-DO alone (bold line) or DO with DM (thin line) were stained with Mags.DO antibody (left panel) and a cytoplasmic DO β -specific HKC5 antibody (right panel). (B) 293T cells were transfected with DO (left panels) or DO+DM (right panels), BFA was added 6 hours later (lower panels) and cells were analyzed 16 hours post-transfected with Mags.DO and HKC5 antibodies. The histogram represents the Mags.DO/HKC5 ratio for each conditions.

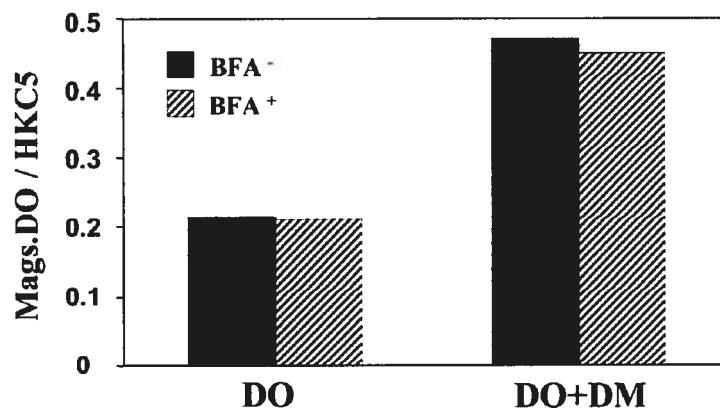
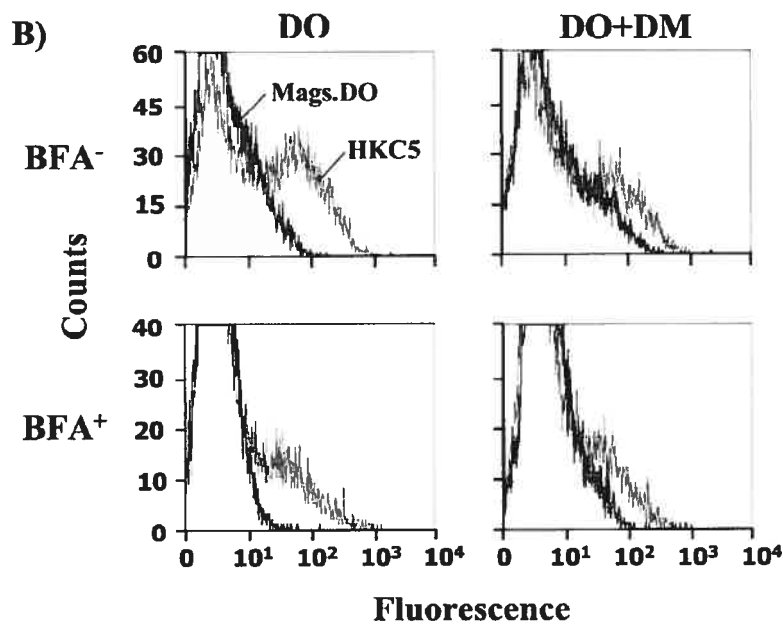
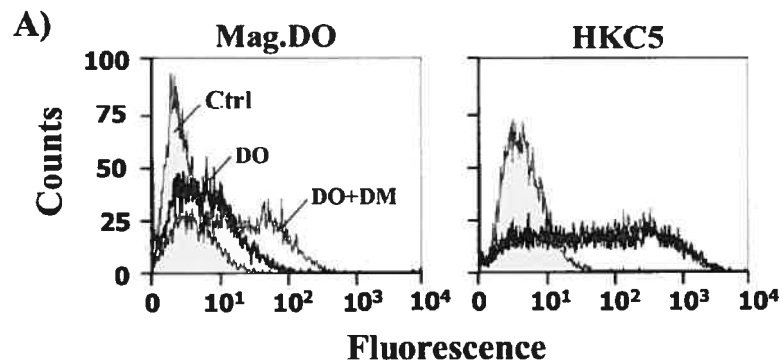


Figure 3. cDO molecule successfully egress the ER to reach cell surface and lysosomal compartment in transfected HeLa cells.

(A) Surface expression of the cDO molecule (right panel) was compared to DOwt (left panel) using the Mags.DO antibody followed by an Alexa 488-labeled goat anti-mouse antibody (bold line). Cells were permeabilized and stained with HKC5 antibody (thin line) in order to visualize the total expression of DO. Filled region represent the control fluorescence of cells incubated with the secondary antibody.

(B) Permeabilized cells expressing the wild-type HLA-DO (a to d) or CDO molecule (e to h) were stained to analyze the intracellular localization. Panels a-e show staining using the Mags.DO antibody followed by an Alexa 488-labeled goat anti-mouse antibody. Panels b-f show staining using the anti-calnexin specific rabbit serum followed by a biotinylated-labeled goat anti-rabbit antibody and texas-red conjugated streptavidin. Panels c-g illustrate the co-localization of the two molecules and d-h panels show the cells in visible light. Immunofluorescence was monitored by confocal microscopy.

(C) Cells expressing DO, DO+DM or cDO molecules were analyzed with a DO α -specific rabbit serum on western blot after EndoH treatment.

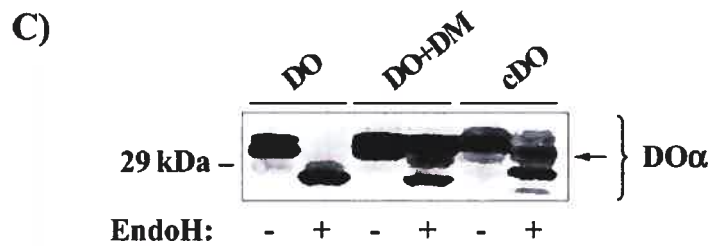
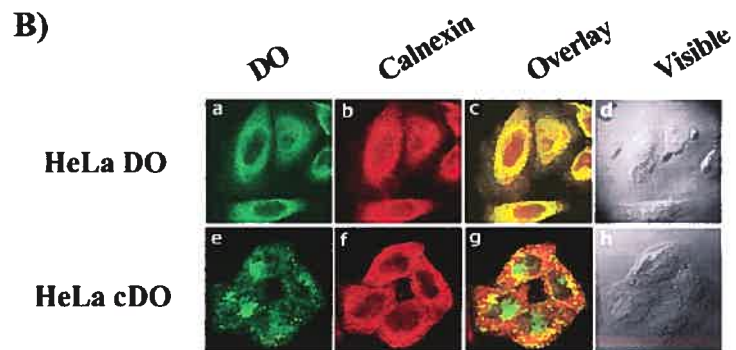
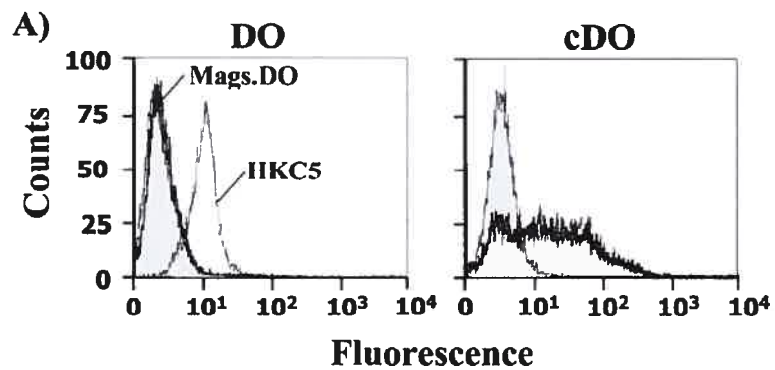


Figure 4. Efficient association between cDO and DM in transfected HeLa cells.

(A) Cells expressing cDO alone (thin line) or cDO+DM (bold line) were stained at the cell surface with Mags.DO antibody (left panel) or permeabilized and stained with the same antibody (right panel). (B) cDO molecule was compared to DOWt of Raji cells for its association with DM. Samples were lysed in 1% Chaps or Triton X-100, immunoprecipitated with the Mags.DO DO β -specific antibody and revealed with the Anti-DM β serum (left panel). As a control, Raji cells were lysed with the same reagents, immunoprecipitated with XD5.117 (DR) and revealed with the Anti-DM β serum (left panel).

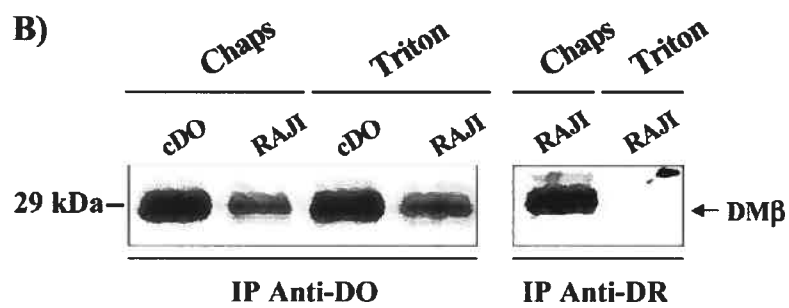
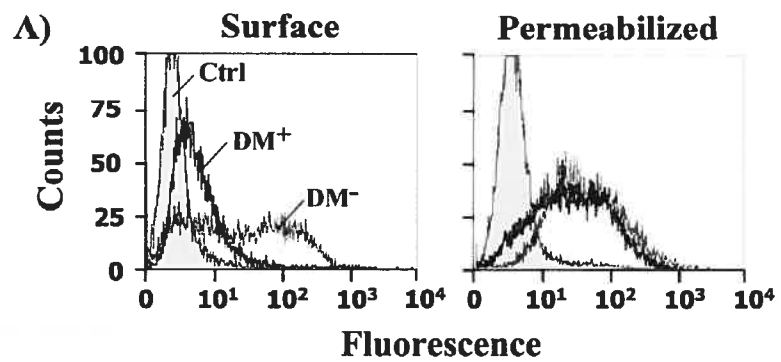


Figure 5. Mutation of the membrane-distal region of HLA-DO α chain abrogates ER retention and allows cell surface expression of HLA-DO.

(A) Amino acid sequence homology between DO α and DQ2 α in the N-terminal regions of the molecules. Mutated residues on DO are denoted with asterisks. (B) HEK293T cells were transfected with DO α / β wt or mutated versions of DO (DO α P11V/ β WT, DO α Δ P/ β WT or DO α A12N/ β WT) and stained for the cell surface expression of DO with Mags.DO (bold line). Cells were also permeabilized and stained with HKC5 antibody (thin line). (C) HeLa cells were transfected with DO α / β wt (thin line) or DO α P11V/ β WT mutant (bold line) and stained for the cell surface expression of DO with Mags.DO. Control (ctrl) cells were stained with the secondary antibody alone (filled histogram).

A) HLA-DO α : 1 TKADHMGSYGPAFYQSYG 18
 HLA-DQ2 α : 1 IVADHVASYGVNIFYQSHG 18

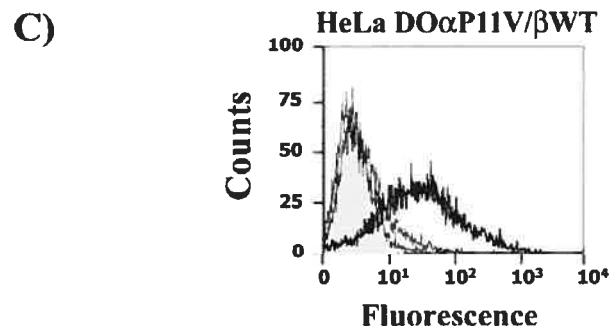
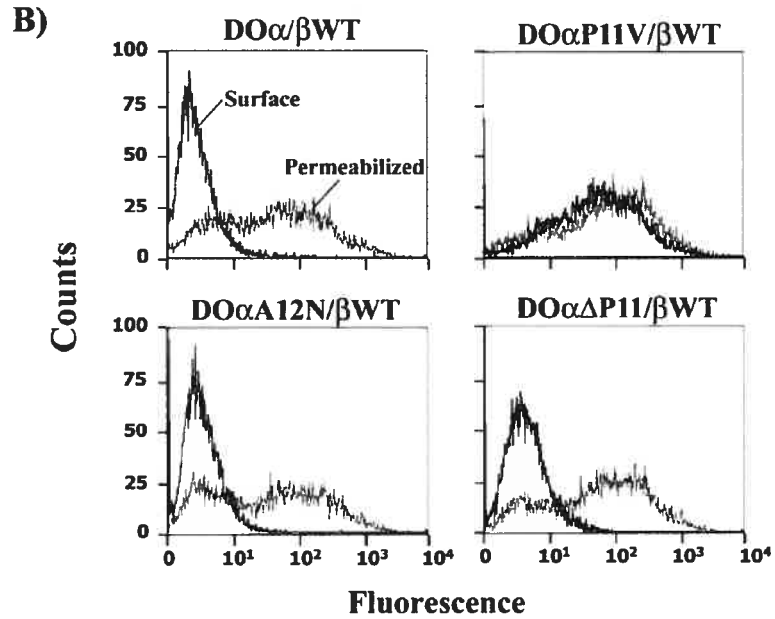


Figure 6. DOP11V molecule successfully egress the ER to reach Golgi apparatus and lysosomal compartments in transiently transfected HEK293T cells.

(A) HEK293T permeabilized cells expressing the wild-type HLA-DO (a to c) or DOP11V molecule (d to f) were stained to analyze the intracellular localization. Panels a-d show staining using the Mags.DO antibody followed by an Alexa 488-labeled goat anti-mouse antibody. Panels b-e show staining using the anti-CD63-PE antibody which detects lysosomal compartments. Panels c-f illustrate the colocalization of the two molecules. (B) HEK 293T cells were transfected with DO (upper panel), DO+DM (middle panel) and DOP11V (lower panel) and lysed after 6, 8, 10 and 12 hours post-transfection. Half of the samples were treated with endoH and analyzed on western blot using a DO α -specific rabbit serum.

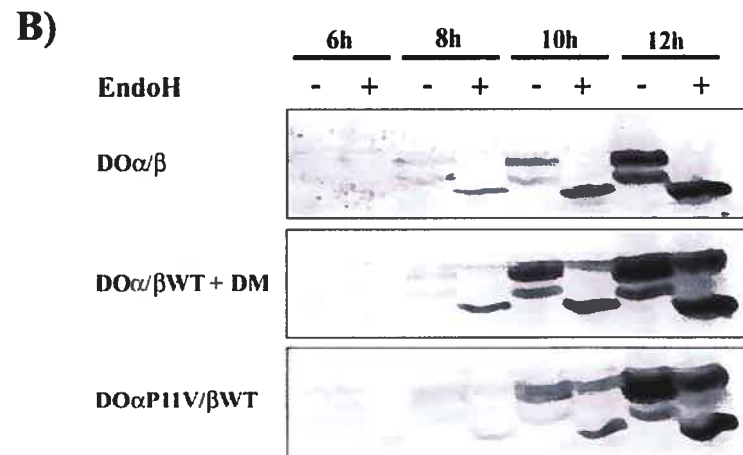
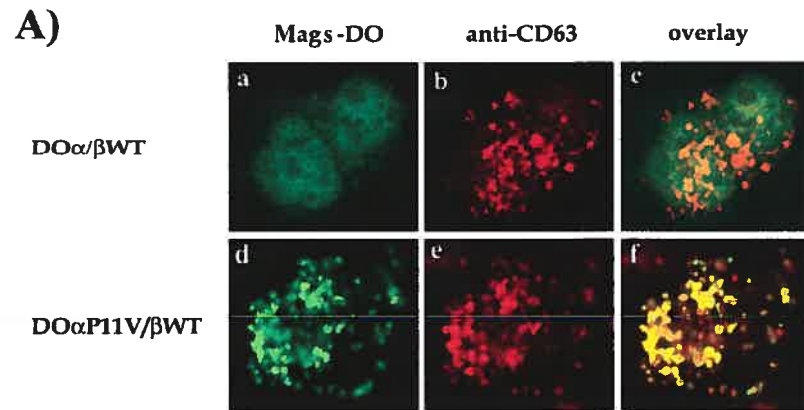


Figure 7. DM binds strongly to DOP11V without enhancing its overall conformation

(A) Cytometry analysis was performed on DOP11V/DM-positive 293T cells (bold line) and DM negative cells (thin line). Two Mouse anti-DO β antibodies were used, Mags.DO for cell surface staining and HKC5 monoclonal antibodies on permeabilized cells, followed by an Alexa 488-labeled goat anti-mouse antibody. Filled region represent the control fluorescence of cells incubated with the secondary antibody. (B) DOP11V molecule was compared to DOWt for its association with DM in HEK293T cells. Samples were lysed in 1% Triton X-100, immunoprecipitated with the Mags.DO DO β -specific antibody and revealed with the Anti-DM β serum. As a negative control, DM alone was also transfected, immunoprecipitated and blotted using the same antibodies. (C) HEK293T cells transfected with the same molecules as described above were permeabilized and stained with Mags.DO and HKC5 antibodies followed by an Alexa 488-labeled goat anti-mouse antibody. Filled region represent the control fluorescence of cells incubated with the secondary antibody.

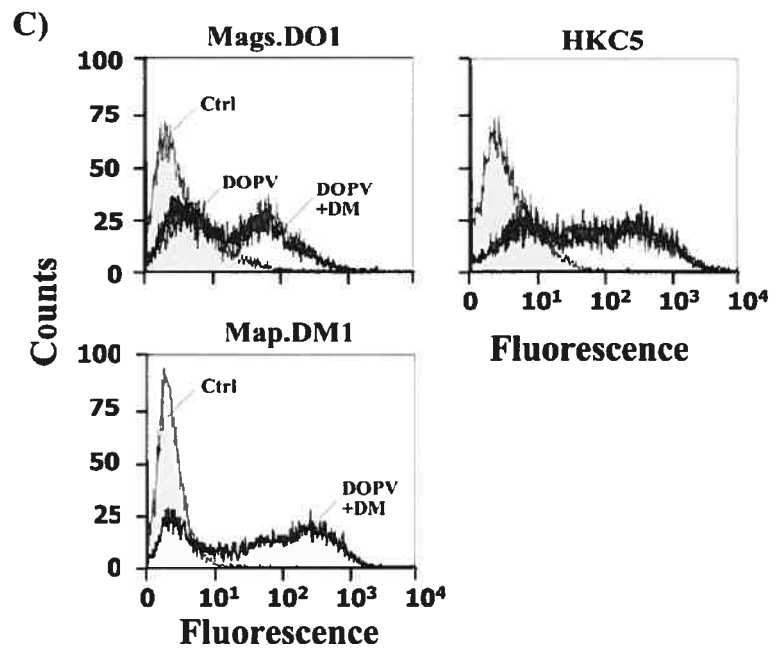
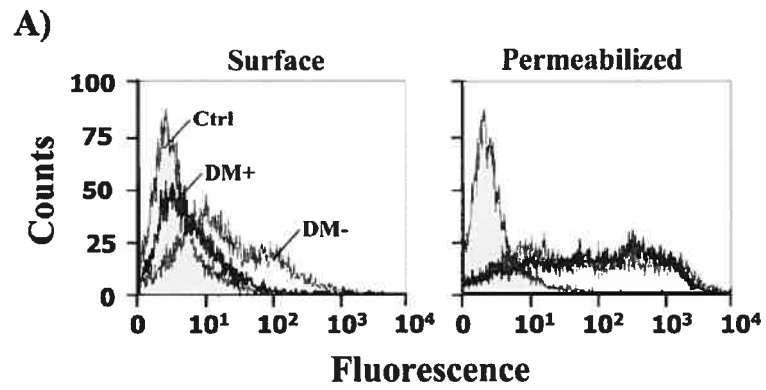
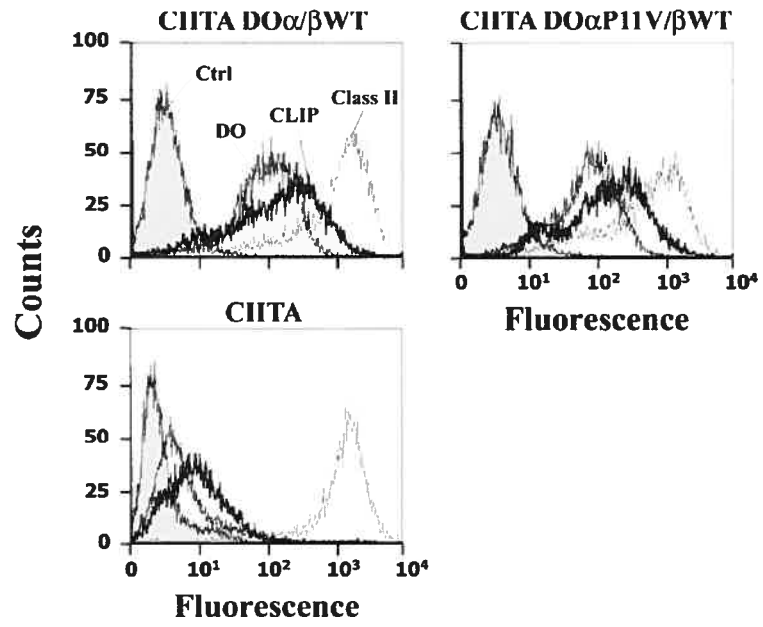


Figure 8. DOP11V is not impaired in its capacity to inhibits the catalytic activity of HLA-DM

HeLa cells were stably transfected with CIITA alone or together with DOwt or DOP11V and sorted on magnetic beads coated with L243. Cells were later analyzed by flow cytometry after surface staining for DR (L243; gray line) and CLIP (CerCLIP.1; bold line) and after intracellular staining for DO (HKC5 DO β -specific antibody; thin line). Control (ctrl) cells represent untransfected HeLa cells stained with L243 (filled histogram). The bottom histogram shows the ratios between the mean fluorescence values obtained for CerCLIP.1 and HKC5 antibodies.



CHAPITRE 3 – ARTICLE

**Determination of the HLA-DM interaction interface on HLA-DO
molecule**

Francis Deshaies, Alexandre Brunet and Jacques Thibodeau

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

Keywords: MHC class II; HLA-DO, HLA-DM, invariant chain; antigen
processing

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

Running title: Functional regions of HLA-DO

3.1 RÉSUMÉ

La molécule non classique de classe II HLA-DO (DO), exprimée dans les lymphocytes B, a pour fonction d'inhiber HLA-DM (DM) et prévenir le chargement de peptides internalisés par pinocytose. Cette inhibition cause l'accumulation de fragments CLIP (dérivé de la chaîne invariante) liés à la molécule de classe II classique. Jusqu'à présent, le mécanisme d'action de DO demeure incertain. En exprimant une seule chaîne de DO à la fois, dans le contexte de paires mixtes isotypiques, nous avons démontré que la chaîne DO α contenait des domaines importants pour faire contact avec DM situées en région C-terminale de l'hélice alpha. Des expériences de mutagenèse dirigée effectuées dans cette région ont révélé que la position DO α R80 était impliquée dans l'interaction DO-DM. De plus, un deuxième résidu situé sur la même face de DO alpha (α E41) influence l'association entre DO et DM ainsi que l'accumulation des complexes classe II-CLIP. Ce résidu est analogue à celui retrouvé sur la molécule HLA-DR (DR) qui participe à l'interaction avec DM. Le contact entre DM et cette face latérale de DO alpha a été confirmé en utilisant des anticorps dirigés contre la chaîne alpha qui font compétition avec DM pour l'accès à DO. Nos résultats suggèrent donc que l'interface d'interaction entre DO et DM est distincte de celle décrite entre DR et DM en impliquant majoritairement la participation de la chaîne DO α . Toutefois, DO pourrait inhiber l'activité catalytique de DM en interférant avec la liaison de DR.

3.2 ABSTRACT

B lymphocytes express the non-classical class II molecule HLA-DO (DO) which inhibits HLA-DM (DM) and prevents the loading of peptides derived from fluid-phase endocytosed antigens. This inhibition causes the accumulation of classical class II molecules bound to the CLIP fragment of invariant chain. Still, the mode of action of DO remains elusive. By expressing one chain of HLA-DO at a time in the context of mixed isotypic pairs, we showed that DO α contains an important region for DM interaction located at the C-terminal region of the alpha helix. Site-directed mutagenesis of this region revealed a critical position (DO α R80) that affects the DO-DM association. Moreover, another residue in the same lateral face of DO alpha (α E41) influences the DO-DM association as well as the accumulation of class II-CLIP complexes. This residue is analogous to the one found in DR and which participate to the interaction with DM. Contact between DM and this lateral face of DO alpha was further confirmed by the finding that alpha chain-specific antibodies compete with DM for binding to DO. Altogether, these results suggest that the interface of interaction between DO and DM is distinct from the one described for DR by involving an important participation of the DO α chain. However, DO may inhibit DM's catalytic activity by interfering with DR binding.

3.3 INTRODUCTION

Classical MHC class II molecules are polymorphic heterodimeric proteins expressed at the surface of antigen presenting cells. They present to CD4⁺ T lymphocytes those antigenic peptides derived from endocytosed antigens (see (1)). The α and β subunits of class II associate in the ER together with the invariant chain (Ii) (2). The complex enters the endocytic compartments where Ii is degraded from its C-terminus (3). A last piece called CLIP is protected inside the groove and must be released to allow binding of antigenic peptides (4). DM, a non-polymorphic intracellular chaperone, is responsible for removing CLIP and editing the peptide repertoire to favor those of high affinity (see (5)).

Class II-restricted antigen processing in B lymphocytes is tightly regulated to ensure specificity of the activation process. These cells express a non-classical class II molecule called DO (H2-O in mice) that inhibits the presentation of antigens taken up by fluid phase endocytosis and which are not recognized by the surface Ig (6, 7). The non-polymorphic DO α and DO β chains associate in the ER and access endosomes only upon binding to DM (8, 9). Lately, it was shown that transfection of HLA-DO in CIITA⁺ cells caused the cell surface accumulation of classical class II molecules associated with CLIP (10, 11). In vitro studies revealed that DO-bound DM molecules were inactive around neutral pH while retaining full activity at pH values around or below 5 (7, 12). This would allow efficient class II loading of antigens taken up by the surface Ig and needing highly

degradative conditions. This hypothesis is consistent with results obtained using splenocytes from mice with a targeted mutation in the DO α genes and which showed increased efficiency in the presentation of soluble antigens (7). Interestingly, these cells did not show any variation in the level of CLIP-associated class II molecules (7, 13).

The precise mechanism by which DO modulates the activity of DM molecule remain to be clarified. In this report, we have used mixed pairs between DR and DO to define the DM binding domains on DO and gain insights into its mode of action. We also made use of competing antibodies and performed point mutations on DO to map a face that is critical for interactions with HLA-DM. Understanding the function of DO might allow the modulation of antigen processing for therapeutic purposes.

3.4 MATERIALS AND METHODS

Plasmids and mutagenesis

pBSDO α .9, pBSDO β , pBudCE4-A, pBudDO $\alpha\beta$, RSV.5gptDN1, RSV.3DR β 008, pBudDM and pBUD DMY have been described previously (14, 15). pBudDR β was generated by inserting the *Bam*HI fragment of RSV.3DR β 008 in pBudCE4-A. pREP4CIITA and pCDNA3CIITA cDNAs were obtained from Dr J. Ting. pBudDO α was created by cloning a *Bam*HI fragment from pBSDO α .9 into the *Bgl*II site of pBudCE4-A. pBudDO β was generated by cloning a *Bam*HI fragment from pBSDO β into *Bgl*II site of pBudCE4-A.

The DR₁₈/DO α chimeric cDNA (cDO α) was made by overlap extension PCR as described (14) using the DR α cDNA, cloned in the *Bam*HI site of pBlueScript (Stratagene, CA), and RSV.5gptDN1 as templates. The sequence of the oligonucleotides is available upon request. The *Sal*I-*Pvu*II fragment encompassing the junction between DR and DO was subcloned into RSV.5gptDN1. The nucleotide sequence was confirmed by DNA sequencing. A 2 Kbp *Bam*HI fragment was cloned into the *Bgl*II site of pBudDR β to generate pBudDR₁₈/DO α + DR β . The other chimeras (DR₄₂/DO α , DR₇₇/DO α , DR₆₃/DO α and DR₈₄/DO α) was generated by using pBSDO α .9 and pBSDR α as templates. The *Not*I-*Bst*EII fragment encompassing the junction was cloned into the *Not*I-*Bst*EII sites of pBudDR₁₈/DO α + DR β to generate pBudDR₄₂/DO α + DR β , pBudDR₆₃/DO α + DR β and pBudDR₈₄/DO α + DR β .

The first two mutations in DO α (E41K and F52S) were generated by overlap PCR using pBSDO α . In order to generate the DO α double mutation (α EF-KS), we used the first PCR product containing aE41K mutation as template and a second set of primers was used to generate the α F52S mutation. From each PCR products, a 450bp *SalI* and *BstEII* fragment along with a *BstEII-XbaI* fragment digested from pBSDO α .9 were simultaneously cloned into the *SalI-XbaI* sites of pBudCE4-A and sequenced (pBudDO α E41K, pBudDO α F52S, pBudDO α EF-KS). A *BamHI* fragment from wild-type pBSDO β was sub-cloned into the *Bg/II* site of the previous vectors to generate pBudDO α E41K+ β wt, pBudDO α F52S+ β wt and pBudDO α EF-KS+ β wt. All other mutations in DO α (E76K/R80S, R80Y/A83I, R82P) were generated using a similar strategy.

Antibodies

Monoclonal antibodies L243 (DR α -specific), CerCLIP (CLIP-specific; Pharmingen), XD5.117 (DR β -specific), MAP.DM1 (DM-specific; Pharmingen) as well as the mouse serum against DO β and the rabbit sera against DO α and DM β have been described (14, 15). HKC5 is a monoclonal antibody against the cytoplasmic tail of DO β (16). Secondary antibodies were the Alexa Fluor 488-conjugated[®] goat anti-mouse IgG (Molecular Probes), the biotinylated goat anti-rabbit (Bio/Can Scientific) and the Texas-Red-coupled streptavidin (Amersham Pharmacia Biotech). Mags.DO monoclonal antibody was generated by repeating injection of purified DO-DM complexes into mouse.

Cell lines and transfections

HeLa DR α +DR₁₈/DO β (DR α /cDO β) have been described (14). HeLa and HeLa DM.5 cells were provided by R.P. Sékaly. HEK293T cells were obtained from E. Cohen. Cells were cultured in DMEM, 10% FBS (Invitrogen) and selective agents. HeLa and HeLa DM.5 were transfected with Fugene6 (Roche Diagnostics, Canada) using 1 μ g of each DNA (14). For transient expression, HEK293T cells were transfected by the calcium phosphate precipitation method using 2 μ g of each DNA. Cells were analyzed 2 days post-transfection.

Flow Cytometry

Cells were harvested using trypsin, washed and stained for surface expression. For intracellular staining, cells were treated with formaldehyde for 20 minutes, then with 50mM NH₄Cl for 15 minutes and permeabilized with PBS-BSA containing 0,05% saponin (14). Cells were analyzed on a FACS[®]calibur (Becton Dickinson, USA).

Fluorescence microscopy

HeLa cells were plated on cover slips in 24 well plates and cultured for 2 days before intracellular staining as described for flow cytometry analysis. Cells were washed twice and the cover slips were mounted using Geltol Mounting Medium (Immunon Shandon). HEK293T transfectants were stained, transferred on microscope slides by Cytospin centrifugation and mounted as above. Cells were analyzed by fluorescence microscopy on a Zeiss axioplan 2 imaging microscope. Photographs were taken with a Sony DXC-390P digital camera.

Immunoprecipitations and western blotting

Cells (10^7) were trypsinized, washed in PBS and lysed into 1% CHAPS or Triton-X100 (14). Immunoprecipitations were done overnight at 4°C using primary antibodies bound to protein-G coupled to sepharose 4B (Amersham Biosciences). Samples were analyzed on western blots (14).

3.5 RESULTS

DO α chain encompasses the main binding site for DM

To gain insights into the mode of action of DO, we undertook to delineate the regions important for contacting DM. We reasoned that the DO α chain was likely to be responsible for the interaction with DM since the primary sequence of its distal domain is far more divergent than DO β when compared to classical class II molecules (6, 17). Moreover, the overall structure of DO β is very similar to DR β suggesting that it is not involved in the specific ER interaction with DM (18). To isolate the DO α chain from DO β , we generated a mixed heterodimer between DO α and DR β (Fig.1A). Such pairing overcomes the ER retention and is made possible only when using a chimeric DO (cDO) chain in which the first 18 amino acids were replaced by those of DR (18). Then, we took advantage of the fact that the DO/DM interaction is resistant to cell lysis in Triton X-100 or CHAPS while DR/DM complexes can only be purified using CHAPS (8, 19).

The weak interaction between DR and DM was confirmed in figure 1B using HeLa cells transfected with the class II transactivator (CIITA) cDNA and which express classical class II molecules as well as DM and Ii (16). Using cell lysates prepared in different detergents, DR co-immunoprecipitated DM only in Chaps. We repeated this experiment using cells expressing cDO α /DR β and HLA-DM. Figure 1B shows that the two molecules could be co-immunoprecipitated in both detergents. On the other hand, a control DR α /cDO β molecule co-precipitated DM

only from cell lysates prepared in CHAPS. This last observation is in line with our three-dimensional model of DR α /cDO β which revealed a structure very similar to the one of DR (18). Altogether, these results suggest that cDO α /DR β and DR α /cDO β associate with DM in a DO-like and DR-like fashion, respectively, and that DO α represents the main contact site with DM.

To confirm the role of DO α , we transfected cDO α /DR β molecule in presence of HLA-DM and we analyzed the sub-localization as well as the surface expression of the molecule. In DM negative cells, the molecule could be detected at the surface of HeLa cells (Fig. 2A). However, upon co-expression of DM, cDO α /DR β was not expressed at the cell surface suggesting a DM-induced intracellular sequestration. Indeed, these cells were positive upon permeabilization and intracellular staining (Figure 2A). We analyzed by immunofluorescence microscopy the sub-cellular localization of cDO α /DR β in DM $^-$ and DM $^+$ cells (Figure 2B). Only a diffuse surface staining could be detected in DM $^-$ cells, in line with the absence of endosomal sorting motifs in DO α and DR β (14, 20). However, in the presence of DM, both molecules were found in vesicles of the endocytic pathway (Figure 2B, bottom panels). Altogether, these results suggested that DM and cDO α /DR β interacted early in the biosynthetic pathway preventing the mixed pair from taking the default route to the cell surface. In DM $^+$ cells, the sub-cellular distribution of cDO α /DR β was reminiscent of the one described for DO (8) suggesting that the DO α chain encompasses the main binding site for DM.

A DR-conserved residue on DO makes contact with DM

The results obtained with the mixed pairs prompted us to focus on the DO α chain residues to better understand the inhibitory function of DO. It has been previously suggested that this inhibition could be attributable to a competition between DO and DR for the binding to DM. To verify this hypothesis, we obliterated the putative DR-like binding site of DO α by site-directed mutagenesis based on results recently obtained by Doebele *et al.* (21) (fig. 3A, upper panel). According to this study, residues DR α E40 and α F51 are located on one lateral face and participate in the interaction with DM (fig.3A, lower panel). We introduced the same mutations on DO (E41K, F52S and combined EF-KS) and we verified if these mutations would affect the inhibition of CLIP release from class II molecules. As expected, cells co-transfected with CIITA together with DO and sorted using L243 displayed a marked accumulation of CLIP. However, a similar expression of DO α E41K and DO α EF-KS resulted in a drastic reduction in the amount of CLIP-class II complexes as compared to that observed with wild-type DO or DO α F52S (fig. 3B, top panel). These differences could not be attributed to variations in the levels of DO expression as shown by comparable staining of permeabilized cells. Moreover, because DO β and DO α are encoded on the same pBud vector, we can assume that an equivalent amount of DO α is present. As a control, HeLa cells were also transfected exclusively with CIITA and showed little DO β as well as very few CLIP-class II complexes at their surface (Data not shown) (16). The ratios of expression for CLIP over DR clearly showed that the transfectants containing the DO α E41K mutation still allowed efficient CLIP

release by DM (Fig. 3B, bottom panel). Interestingly, the F52S mutation did not affect the inhibitory function of DO on CLIP release. These results suggest that DO is using one of its homologous residue with DR (α E41) to make a contact with DM.

HLA-DM encodes a tyrosine-based motif (YTPL) in the cytoplasmic tail of the β chain, which allow efficient targeting of the molecule in lysosomal compartments (22, 23). Conversely, mutated version of this motif DMY (DMY227A) lead to the redistribution of DM molecules at the cell surface. Since DO is completely depend of DM for its sub-cellular localization, it can be detected at the cell surface when DMY is co-expressed. To assess if the failure of the mutated DO (DOEF-KS) to inhibit DM was caused by an impaired binding, we transiently transfected HEK293T cells with these molecules and stained for cell surface expression. As expected, DOwt could be detected at the cell surface using DO-specific antibody when co-expressed with DMY (fig. 3C). However, the DOEF-KS mutant was impaired in its capacity to reach the cell surface with DMY (fig. 3C). A lower surface expression could not be due to a variation in the expression of the molecules since surface DMY as well as intracellular DO were comparable between transfectants (fig. 3C). These results suggest that the binding between DOEF-KS and DM is not optimal and may explain the loss of function of DO.

In order to confirm the partial interaction between the mutated DO and DM, we performed co-immunoprecipitation experiments. As shown in figure 3D (upper IP

panels), DOwt could be easily pulled down with DM in CIITA/DOwt transfectant while only a marginal amount of DO could be detected in CIITA expressing cells (16). Interestingly, the mutated DO (EF-KS) could not be immunoprecipitated as efficiently as the wild type molecule despite comparable DO expression as shown by flow cytometry. This strongly suggests that the DO α E41 residue is critical for DM interaction. In previous studies, DO-DM complexes have been reported to associate with DR molecules to form tri-molecular complexes (24). To verify if the mutation on DO would affect the formation of such putative complexes, we performed co-immunoprecipitation experiment using DR-specific antibody on HeLa cells co-expressing CIITA and DOwt or DOEF-KS. Since no direct interaction occurs between DO and DR, the only way to observe DO molecule would imply the participation of DM or a member of the tetraspanin family (25). As shown in figure 3D (lower IP panels), a substantial amount of DOwt can be pulled down with DR while the DOEF-KS molecules could be detected at a lesser extent (fig3D, lower IP panels). This discrepancy could not be due to a failure in the immunoprecipitation experiments since the DR:DM ratio was comparable between transfectants. These results further confirm the implication of the DO α E41 residue for DO-DM interaction and suggest that the presence of DO in the putative tri-molecular complex is not solely due to the inclusion of tetraspanines molecules. Indeed, the participation of these proteins would have implied the non-specific presence of DO.

Previous study have reported that DO needs DM to reach endocytic pathway (8). Intracellular trafficking could also be monitored using pulse chase experiments for the acquisition of EndoH resistance, which is reminiscent of the passage to the late golgi apparatus (8). To better define the impact of the DOEF-KS mutation on DM binding, we analyzed its trafficking inside of the cells. HEK293T cells were transfected with DO, DO+DM and DOEFKS+DM, digested with endoH enzyme and analyzed by western blot after 6, 8, 10 and 12 hours post-transfection. In agreement with previous studies, DO/DM complexes showed endoH resistance over time (starting from 8 hours) while DOwt alone failed to acquire such resistance (fig. 3E). The analysis of the DOEF-KS mutation clearly demonstrate a partial failure of the molecule to acquires endoH resistance, which strongly suggests that this incapacity of the DO mutant to interact with DM occurs early after their synthesis in the ER.

A second residue located on the same lateral face of DO α contributes to the interaction with DM

While DO α E41 residue contributes to the binding with DM, other residues of DO are suspected to make a contact since the E41K mutation could not obliterate completely the interaction. To identify other regions of interaction on DO α , we made use of modified versions of the cDO α /DR β chimerical molecule transfected in HEK293T cells. We progressively replaced the DO α 1 portion of the molecule by the equivalent portion of DR α . As shown previously, complete cDO α /DR β chimerical molecule interacts strongly with DM and is sequestered inside of the

cell (fig. 2A). When the first 42, 63 and 77 amino acids of DO α were replaced by the ones of DR α , an efficient sequestration by DM was also observed (fig. 4). Indeed, chimerical molecules could be expressed at the cell surface but showed impaired surface expression with the presence of DM. Intracellular staining confirmed that an equivalent expression of the molecules was achieved (fig. 4). Moreover, DM expression was comparable between transfectants (data not shown). On the other hand, surface expression of complete DR was not affected by DM while the substitution of the 84 first amino acids of DO α exhibited a marginal DM-induced sequestration (fig. 4). These results suggest that no major residues implicated in the strong interaction with DM are located C-terminal of the position DO α 84. The histogram on figure 4 summarizes the effect of DM sequestration for each molecule by comparing the mean fluorescence of XD5 surface staining on DM⁻ over DM⁺ cells (fig. 4). Altogether, these data suggest that a region between DO α 77 and DO α 84 contains critical residues for a strong DO-DM interaction.

By comparing the DO α 77-84 region with other classical class II molecules, we expected to find discrepancy that could account for DO-specific interaction with DM. As shown in figure 5A, the amino acid sequence alignment between DO α , DR α and DQ α revealed interesting divergence. To further delineate which of these residues would make a contact with DM, we performed mutagenesis experiments and we evaluated the capacity of these mutants to follow DMY to the cell surface in HEK293T transfected cells. To this respect, a whole stretch of 5

amino acids of DO α (RSRAI) were replaced by the equivalent region of DR α (YTPIT). While the DO_{wt} molecule could be detected easily at the cell surface, the mutated DO was affected in its capacity to follow DMY (fig. 5B). This effect was comparable to the one observed with the DO α EF-KS mutation (fig. 3C). As shown on the histogram of figure 5B, the DO α RSRAI-YTPIT mutant lost more than 60% of its cell surface expression in comparison to DO_{wt}. Two other combinations of mutations showed similar defect. Indeed, the DO α E76K/R80S and DO α R80Y/A83I mutations (depicted with asterisks in figure 5A) affected surface expression. These mutants share the same mutated residue at position DO α R80 : one with a substitution for a serine (DQ α equivalent) and one with a tyrosine (DR α equivalent). This strongly suggest that the DO α R80 position participates to the DO-DM binding. In addition, a mutation of the DO α R82 for a proline showed only a limited impairment in DM binding (fig. 5B). Interestingly, the DO α R80 residue is suspected to be located on the same lateral face as the other critical position DO α E41. Altogether, these results suggest that DM may contacts these two critical residues of DO to interact.

A wide lateral face of DO α is used to make a contact with DM

The two critical positions described so far are located in opposite location of the DO α chain. Indeed, the DO α E41 is located at the N-terminal end of the alpha helix while the other DO α R80 position is located at the C-terminal extremity. This suggests that DM may bind to DO using two distinct region or it may use a wide area of the DO α chain to make a contact with the two residues at a time. To

answer this question, we used the chimerical molecule containing the first 63 amino acids of DR α (which binds strongly to DM, Fig.4) and complete DR (which binds weakly to DM) in combination with DMY to target the molecules at the surface of HEK293T cells. We then investigated with two DR α -specific antibodies (L243 and LB3.1) the capacity of DMY to interfere with their binding. These two antibodies are known to target the DR α 39 position as well as DR α 18, the later being a residue exposed on the first outer loop of the peptide binding groove (26). Interestingly, this loop is located right between DO α E40 and DO α R80 residues. If DM makes a wide contact with the DO α chain, one could predict that the antibodies will fail to fully recognize the chimerical molecule because of the presence of DM. A DR β -specific antibody (XD5.117) as well as the superantigen SEA, which binds to residue β 81, were used as control. As shown in figure 6A, XD5.117 antibody is able to recognize the chimerical molecule as well as the complete DR at the cell surface even in the presence of DMY (expression of DMY was comparable between transfectants, data not shown). However, L243 antibody was impaired in its capacity to recognize the chimerical molecule in the presence of DM while recognition of DR was unaffected (fig. 6A). This phenotype was also observed when performing intracellular staining (fig. 6A). As shown on the histogram of figure 6A, the L243/XD5.117 ratio of mean fluorescence clearly demonstrates a failure of the L243 antibody to recognize the chimerical molecule in presence of DMY in comparison to DM negative cells. This experiment was repeated to include SEA as well as LB3.1 antibody. Figure 6B shows that all transfectants were fully

recognized by the antibodies or SEA in DM negative cells. However, the DR α -specific L243 and LB3.1 antibodies failed to recognize the chimerical molecule while XD5.117 and SEA could detect this molecule properly in the presence of DMY. Altogether, these results strongly suggest that DM interferes with the binding of the DR α -specific antibodies by contacting a wide lateral face of DO α .

3.6 DISCUSSION

The results presented here provide evidence that the DO α chain plays a critical role in DO-DM interaction. First, a strong interaction between DO and DM could only be visualized when the DO α chain is present in the context of mixed DR-DO pairs. Second, we described two important DO α chain residues (DO α E41 and DO α R80) that affect the interaction of HLA-DO with HLA-DM. These residues are located on the same lateral face of the DO α chain and are most probably exposed at the surface of the molecule. Indeed, analysis of the DQ crystal structure reveals that these positions are highly accessible. Although no crystal structure of HLA-DO can confirm that these residues will be similarly oriented, the high homology found between DO and DQ strongly suggests a comparable structure. Third, we demonstrate that alpha chain-specific antibodies compete with DM to have access to DO. These antibodies map to the outer loops of the alpha chain. In addition, other data show that L243 significantly inhibits TSST-1 binding to HLA-DR molecule (27). This suggests that DM may contact HLA-DO using a similar interface as TSST-1 superantigen on DR. Altogether, these data suggest that a wide area of the DO α chain is used to make a contact with DM. To support this idea, many attempts to generate monoclonal antibodies against DO-DM purified complexes led to the formation of DO β -specific antibodies but failed to produce any DO α -specific clones (L. Denzin, personal observation). This could be attributable to a masking of the DO α chain by DM, so that the murine system is unable to mount a response against antigenic residues of the α chain.

Because the amino acid sequence of HLA-DO is very similar to other classical class II molecules, it has been proposed that the inhibitory function of DO may be caused by a direct competition for the catalytic site of DM. To verify this hypothesis, we mutated the two DR-conserved residues of the DO α chain and we tested the capacity of DO to affect DM's catalytic activity. Our results showed that only one mutation (DO α E41K) was able to affect the inhibiting function of DO while the other mutation (DO α F52S) did not influence its function. This important finding suggests that an interference might occur between DO and DR but it is unlikely that the same interface of interaction is used. To support this idea, we performed mutagenesis on the key DR-conserved residues on DO β chain and we observed no effect on the release of CLIP (data not shown). Moreover, our data suggest that HLA-DO does not directly affect the interaction between DR and DM. Indeed, numerous coimmunoprecipitation experiments showed that DR and DM could be pulled down equally well, whether or not DO was present (data not shown). We could observe the same result when seeking for tri-molecular complexes. As shown in figure 3D, the amount of immunoprecipitated DM was not significantly affected by the presence or absence of DO, nor by the mutated version of DO.

Despite distinct interface of interaction between DO-DM and DR-DM, it is tempting to speculate that the "DR-like" residue of HLA-DO (DO α E41) could interfere with classical class II for binding to the active site of DM molecules.

Indeed, this residue on DR has been proposed to act as a lever by which HLA-DM would affect the hydrogen bonds extending from α S53 to the peptide backbone (21). In a similar way, DM could act on a lever-like structure of DO by contacting the DO α E41 residue. This could partially explain the inhibitory function of DO as DM would not be able to act simultaneously on DR-CLIP complexes. The dramatic impact of the DO α E41K mutations on the surface expression of CLIP is in agreement with this scenario. Further experiments will be required to fully characterize the impact of this mutation on the inhibiting function of HLA-DO.

In a separate study, we found that a functional DO mutant with a substitution at position α P11 on the floor of the putative peptide-binding groove becomes independent of DM for ER egress and trafficking to the endocytic pathway (Deshaies *et al.*, to be submitted). Then, we concluded that a direct interaction between DM and this residue of DO was unlikely but that DM probably interacts with DO close to its binding groove in order to stabilize the interaction between the α and β chains. The lateral face of interaction mapped here is compatible with these results. Indeed, by contacting a wide area of the DO α chain, DM would be able to push on the first external loop of the α chain (a.a. 15 to 18) or on the N-terminal region of the β strand (fig. 7). We believe that this interaction would be sufficient to modify the position of the amino acids included in the floor of the peptide binding groove. Consequently, the hydrogen bonds network occurring between the α and β chain would be strengthened, allowing a proper folding of the DO heterodimer.

Model for DO-DM interaction

We propose that DO, through a wide region of its α chain, associates with DM using a distinct lateral face as the one described for DR. This interaction would allow the correction of the floor of the DO peptide binding groove and ER egress of the DO-DM complexes. Once in the early endosomes, it has been suggested that DO inhibits the catalytic activity of DM at pH 6.0-6.5 (7, 12). As suggested earlier, this could be attributable to the occupancy of the catalytic site of DM by DO or interference due to the close proximity of the DO α E41 residue being part of a “lever like” structure recognized by DM (fig. 7). In this scenario, HLA-DO would not directly interfere with the binding of DR to DM but would instead reduce the capacity of DM to exchange peptides on DR. This is in agreement with previous studies stating that the inhibition of DM by association with DO is not absolute. Indeed, with time, the number of peptide-loaded class II complexes reaches the number formed in the presence of DM alone (7, 24). This is also compatible with the results of Kropshofer *et al.* reporting that DMDO complexes bind more tightly to class II molecule than DM does (24).

On the other hand, other data show that peptide release from class II molecules, as well as peptide binding, is restored in the presence of DO at acidic pH (7). DMDO complexes and DO alone undergo a substantial reversible conformation upon acidification (7). Such conformation change has been described previously for purified DM and DR (28, 29). This structural change of DODM complexes

might explain the increased exchange activity at lower pH. Indeed, it is conceivable that the acidic environment modifies the orientation of the DO α E41 residue or move apart this later residue from the catalytic site of DM. This might lead to a better access between DM and DR in order to promote peptide exchange. Interestingly, while the group of Karlsson used recombinant molecules devoid of transmembrane regions to show that removal of CLIP at acidic pH was efficient (7), van Ham and collaborators still measured a substantial inhibition of DM by DO at pH 4.5 using purified molecules with their transmembrane regions (12). One possible explanation for this discrepancy is that the presence of transmembrane domains may affect the flexibility of the molecules. This factor could be necessary for the optimal catalytic activity of DM/DO complexes on acidic environment.

Finally, MHC class II molecules from H2-O-deficient mice have normal CLIP content (7, 13), suggesting that H2-O may not affect the function of H2-M in a same way as in human system. Although an effect of H2-O on the peptide repertoire has been demonstrated (13), the inhibition of antigen processing is certainly less stringent in mice than in human B cells. Interestingly, the amino acids surrounding the position α E41 on H2-O are quite divergent from HLA-DO molecule (fig. 3A). This could affect the orientation of the α E41 residue and consequently influence the binding capacity of H2-M. The relevance of this domain on H2-O is currently under investigation.

3.7 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Eric O. Long, Jenny Ting and Rafick Sékaly for providing cDNAs and cell lines. We are grateful to Angela Samaan for the gift of DO and DM-specific antisera. We also thank Eric Cohen and Rafick Sékaly for the use of fluorescence microscopy facilities. FD and AB were supported by studentships from the Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (Fonds FCAR). JT was supported by a New Investigator fellowship from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). This work was supported by grants from the CIHR and the Cancer Research Society Inc to JT.

3.8 ABBREVIATIONS

BSA : Bovine serum albumine

ER : Endoplasmic reticulum

CLIP : CLass II associated Invariant chain Peptide

DM: HLA-DM

DO : HLA-DO

DR : HLA-DR

Ii : Invariant chain,

MHC: Major histocompatibility complex

PBS : Phosphate buffer saline

PCR : Polymerase chain reaction

SEA : Staphylococcal enterotoxin A

TSST-1 : Toxic shock syndrome toxin-1

3.9 REFERENCES

1. Cresswell P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12:259-93
2. Roche PA, Marks MS, Cresswell P. 1991. Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein. *Nature* 354:392-4
3. Pieters J, Horstmann H, Bakke O, Griffiths G, Lipp J. 1991. Intracellular transport and localization of major histocompatibility complex class II molecules and associated invariant chain. *J. Cell Biol.* 115:1213-23
4. Riberdy JM, Newcomb JR, Surman MJ, Barbosa JA, Cresswell P. 1992. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360:474-7
5. Kropshofer H, Hammerling GJ, Vogt AB. 1997. How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: survival of the fittest? *Immunol. Today* 18:77-82
6. Tonnel C, DeMars R, Long EO. 1985. DO β : a new β chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J.* 4:2839-47
7. Liljedahl M, Winqvist O, Surh CD, Wong P, Ngo K, Teyton L, Peterson PA, Brunmark A, Rudensky AY, Fung-Leung WP, Karlsson L. 1998. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8:233-43
8. Liljedahl M, Kuwana T, Fung-Leung WP, Jackson M, Peterson PA, Karlsson L. 1996. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* 15:4817-24
9. Douek DC, Altmann DM. 1997. HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *Int. Immunol.* 9:355-64
10. Denzin LK, Sant'Angelo DB, Hammond C, Surman MJ, Cresswell P. 1997. Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 278:106-9
11. Van Ham SM, Tjin EPM, Lillemeier BF, Gruneberg U, Van Meijgaarden KE, Pastoors L, Verwoerd D, Tulp A, Canas B, Rahman D, Ottenhoff TH, Pappin DJ, Trowsdale J, Neefjes J. 1997. HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol* 7:950-7

12. 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, Neeffjes J. 2000. Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *J. Exp. Med.* 191:1127-36
13. Perraudeau M, Taylor PR, Stauss HJ, Lindstedt R, Bygrave AE, Pappin DJ, Ellmerich S, Whitten A, Rahman D, Canas B, Walport MJ, Botto M, Altmann DM. 2000. Altered major histocompatibility complex class II peptide loading in H2- O-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 30:2871-80
14. Brunet A, Samaan A, Deshaies F, Kindt TJ, Thibodeau J. 2000. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta. *J. Biol. Chem.* 275:37062-71
15. Faubert A, Samaan A, Thibodeau J. 2002. Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM. *J. Biol. Chem.* 277:2750-5
16. Khalil H, Deshaies F, Bellemare-Pelletier A, Brunet A, Faubert A, Azar GA, Thibodeau J. 2002. Class II transactivator-induced expression of HLA-DO(beta) in HeLa cells. *Tissue Antigens* 60:372-82
17. Trowsdale J, 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.* 4:2231-7
18. Thibodeau J, Lavoie PM, Samaan A, Corre JP, Sékaly RP, Cazenave PA. 1998. Conserved structural features between HLA-DO β and -DR β . *Mol. Immunol.* 35:885-93
19. Sanderson F, Thomas C, Neeffjes J, Trowsdale J. 1996. Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo. *Immunity* 4:87-96
20. van Lith M, van Ham M, Griekspoor A, Tjin E, Verwoerd D, Calafat J, Janssen H, Reits E, Pastoors L, Neeffjes J. 2001. Regulation of MHC class II antigen presentation by sorting of recycling HLA-DM/DO and class II within the multivesicular body. *J. Immunol.* 167:884-92
21. Doebele CR, Busch R, Scott MH, Pashine A, Mellins DE. 2000. Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules. *Immunity.* 13:517-27
22. Marks MS, Roche PA, van Donselaar E, Woodruff L, Peters PJ, Bonifacino JS. 1995. A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the β chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J. Cell Biol.* 131:351-69

23. Potter PK, Copier J, Sacks SH, Calafat J, Janssen H, Neeffjes JJ, Kelly AP. 1999. Accurate intracellular localization of HLA-DM requires correct spacing of a cytoplasmic YTPL targeting motif relative to the transmembrane domain. *Eur. J. Immunol.* 29:3936-44
24. Kropshofer H, Vogt AB, Thery C, Armandola EA, Li BC, Moldenhauer G, Amigorena S, Hammerling GJ. 1998. A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.* 17:2971-81
25. Hammond C, Denzin LK, Pan M, Griffith JM, Geuze HJ, Cresswell P. 1998. The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J. Immunol.* 161:3282-91
26. Fu X-T, Karr RW. 1994. HLA-DR α chain residues located on the outer loops are involved in nonpolymorphic and polymorphic antibody-binding epitopes. *Hum. Immunol.* 39:253-60
27. Scholl P, Diez A, Mourad W, Parsonnet J, Geha RS, Chatila T. 1989. Toxic shock syndrome toxin 1 binds to major histocompatibility complex class II molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4210-4
28. Busch R, Reich Z, Zaller DM, Sloan V, Mellins ED. 1998. Secondary structure composition and pH-dependent conformational changes of soluble recombinant HLA-DM. *J. Biol. Chem.* 273:27557-64
29. Ullrich HJ, Doring K, Grueneberg U, Jaehnig F, Trowsdale J, Van Ham MS. 1997. Interaction between HLA-DM and HLA-DR involves regions that undergo conformational changes at lysosomal pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13163-8
30. Lee JS, Trowsdale J, Travers PJ, Carey J, Grosveld F, Jenkins J, Bodmer WF. 1982. Sequence of an HLA-DR alpha-chain cDNA clone and intron-exon organization of the corresponding gene. *Nature* 299:750-2
31. Karlsson L, Peterson PA. 1992. The α chain of H-2O has an Unexpected Location in the Major Histocompatibility Complex. *J. Exp. Med.* 176:477-83
32. Larhammar D, Hammerling U, Rask L, Peterson PA. 1985. Sequence of Gene and cDNA Encoding Murine Major Histocompatibility Complex Class II Gene A β 2. *J. Biol. Chem.* 260:14111-9
33. Stratikos E, Mosyak L, Zaller DM, Wiley DC. 2002. Identification of the lateral interaction surfaces of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM with HLA-DR1 by formation of tethered complexes that present enhanced HLA-DM catalysis. *J. Exp. Med.* 196:173-83

34. Pashine A, Busch R, Belmares MP, Munning JN, Doebele RC, Buckingham M, Nolan GP, Mellins ED. 2003. Interaction of HLA-DR with an acidic face of HLA-DM disrupts sequence-dependent interactions with peptides. *Immunity*. 19:183-92

3.10 FIGURES

Figure 1. DO α chain is sufficient to mediate the strong interaction with HLA-DM .

(A) N-terminal primary sequence of the mature chimeric α chain and schematic representation of the chimeric mixed pair between DO and DR. (B) HeLa cells expressing the DR/DO mixed pairs together with DM were lysed either in CHAPS or Triton X-100. L243 (DR α /cDO β) and XD5.117 (cDO α /DR β) were used to immunoprecipitate the class II-like molecules and the association with DM was monitored by Western blotting after SDS-PAGE using the R α DM serum.

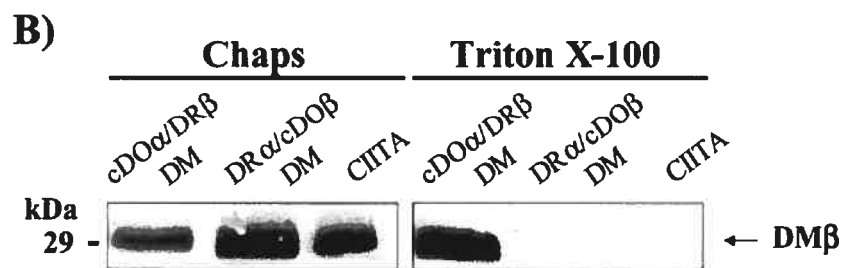
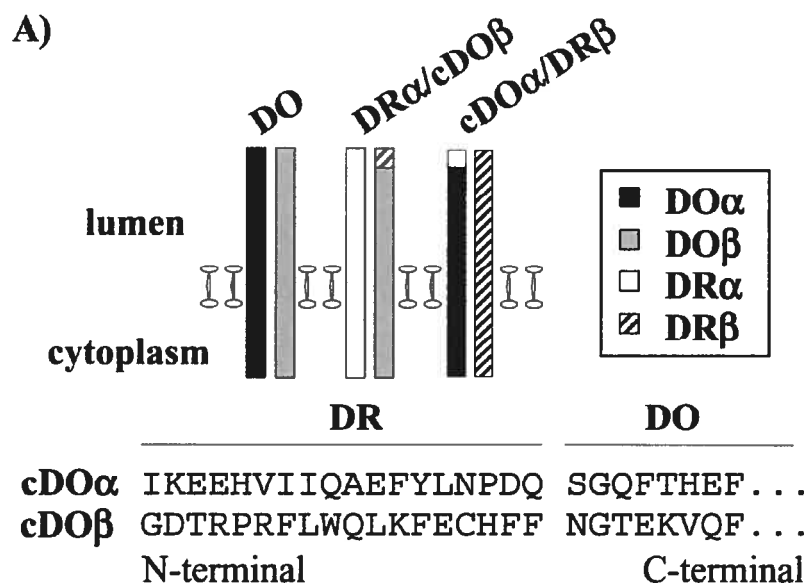


Figure 2. A mixed pair including the DO α chain reach the endocytic pathway in a DM- dependent manner.

(A) Cell surface staining of cDO α /DR β transfected in HeLa or HeLa DM.5 cells. Expression of the mixed pair was monitored at the surface by flow cytometry using the class II-specific mAb XD5.117 (DR β -specific) (bold line). Cells were permeabilized and total expression of the mixed pair was assessed (thin line). The intracellular expression of DM was determined after permeabilization using mAb MapDM.1 (gray line). Control (ctrl) cells were stained with the secondary antibody alone (filled histogram). (B) Cells stained with XD5.117 and the DM-specific rabbit anti-serum (R α DM) were analyzed by immunofluorescence microscopy. Untransfected HeLa cells were used as controls.

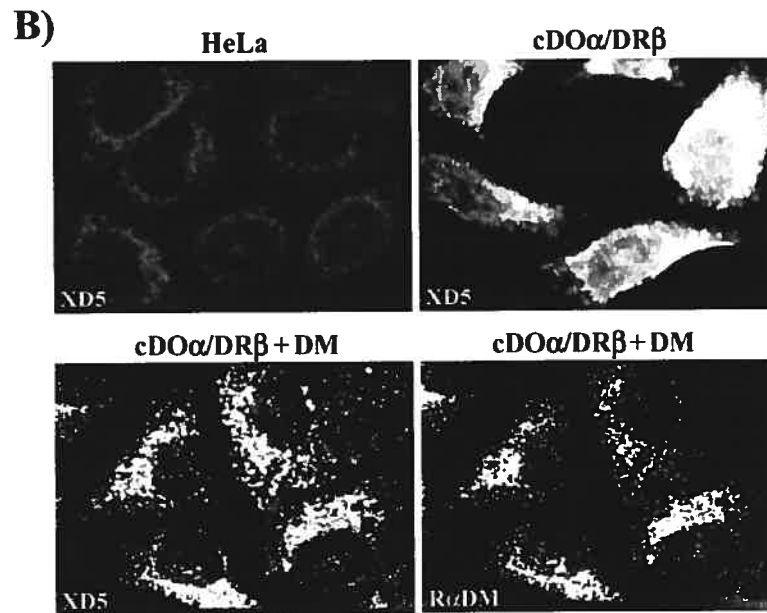
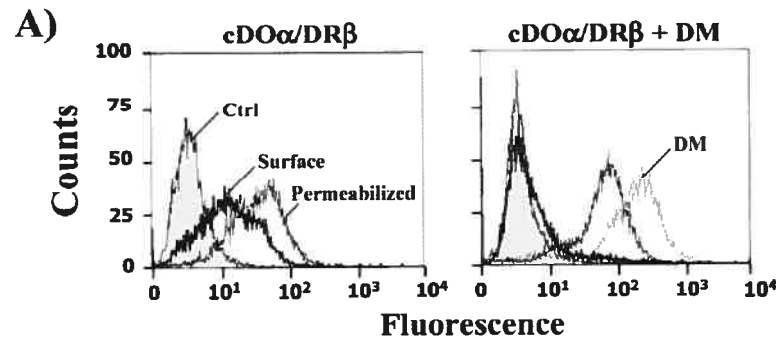


Figure 3. The mutation of a DR-conserved residue on HLA-DO affects its interaction with DM and the cell surface accumulation of class II-CLIP complexes.

(A) Amino acid sequence homology between DR α (6, 30), DO α (6, 17) and H2-O α (31, 32) in the regions important for DR-DM association. Mutated residues on DO are denoted with asterisks. (B) HeLa cells were stably transfected with CIITA together with DOwt or DO mutants and sorted on magnetic beads coated with L243. Cells were later analyzed by flow cytometry after surface staining for DR (L243; gray line) and CLIP (CerCLIP.1; bold line) and after intracellular staining for DO (HKC5 DO β -specific antibody; thin line). Control (ctrl) cells represent untransfected HeLa cells stained with L243 (filled histogram). The bottom histogram shows the ratios between the mean fluorescence values obtained for CerCLIP.1 and HKC5 antibody. (C) HEK293T cells were transfected with DO α EF-KS (bold line) or DOwt (thin line) along with DM mutated for its tyrosine (DMY) in order to visualize DO at the cell surface. Surface expression of DO was monitored using Mags.DO antibody (Left panel). Cells were permeabilized and intracellular expression of DO was assessed using HKC5 DO β -specific antibody (right panel). Control (ctrl) cells were stained with the secondary antibody alone (filled histogram). (D) DOEF-KS molecule was compared to DOwt for its association with DM or for the formation of a putative trimolecular complex in CIITA transfected cells. Samples were lysed in 1% Triton X-100, immunoprecipitated with the DM β - or DO α -specific rabbit serum and revealed for DM, DO or DR molecules. As a negative control, CIITA alone was also transfected, immunoprecipitated and blotted using the same antibodies. (E) HEK293T cells were transfected with DO (upper panel), DO+DM (middle panel) and DOEF-KS + DM (lower panel) and lysed after 6, 8, 10 and 12 hours post-transfection. Half of the samples were treated with endoH and analyzed on western blot using a DO α -specific rabbit serum.

Figure 4. A critical region located in the C-terminal end of the alpha helix of DO α allows strong binding to DM.

HEK293T cells were transfected with DR or different cDO α /DR β combinations (DR₄₂-DO α /DR β , DR₆₃-DO α /DR β , DR₇₇-DO α /DR β and DR₈₄-DO α /DR β) together with DM (bold line) or without DM (thin line). The capacity of DM to sequester the chimerical molecules inside of the cells was assessed by surface staining using the DR β -specific antibody XD5.117. Cells were also permeabilized and intracellular expression of the chimerical molecules was performed using the same antibody. Control (ctrl) cells were stained with the secondary antibody alone (filled histogram). The histogram shows the ratios between the mean fluorescence values obtained for XD5.117 antibody at the cell surface of DM negative in comparison to DM positive cells.

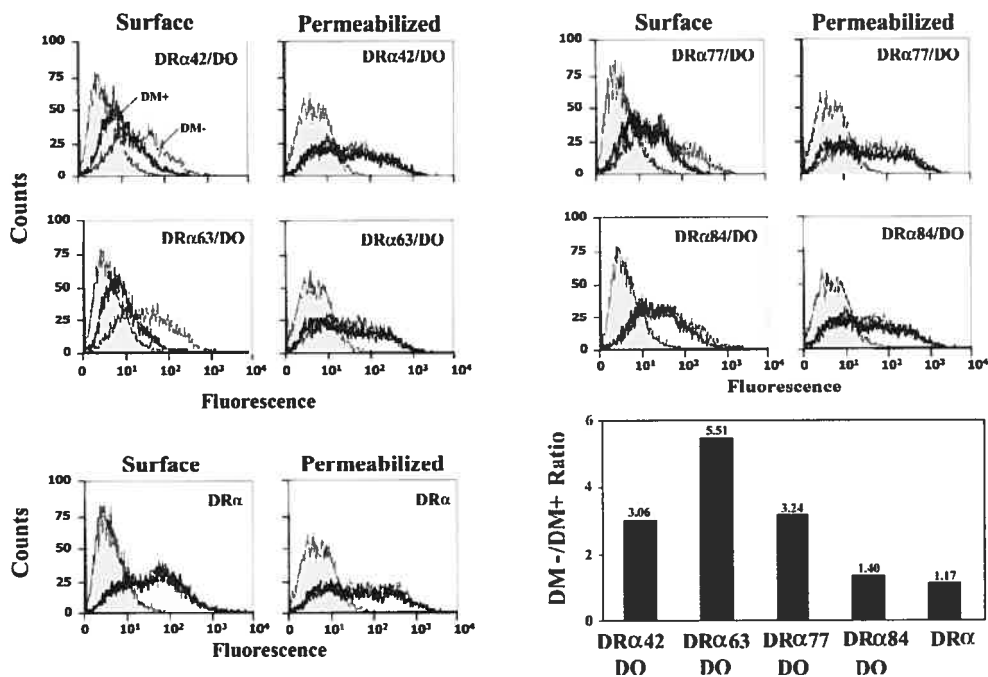


Figure 5. A second residue on the same lateral interface of HLA-DO α contributes to the interaction with HLA-DM.

(A) Amino acid sequence alignment between DR α and DO α in the region important for DO-DM interaction. Mutated residues are denoted with asterisks.

(B) HEK293T cells were transfected with DOwt or mutated version of DO (α RSRAI-YTPIT, α E76K/R80S, α R80Y/A83I and α R82P) along with DM mutated for its tyrosine (DMY) in order to visualize DO at the cell surface. Cells were stained at the surface with Mags.DO antibody (bold line) and Map.DM1 (thin line). Control (ctrl) cells were stained with the secondary antibody alone (filled histogram). The histogram shows the ratios between the mean fluorescence values obtained for Mags.DO antibody at the cell surface of DO mutants in comparison to DOwt cells.

A) HLA-DR α : 75 KRSNYTPITNVP 86
 HLA-DO α : 76 ERSNRSRAINVP 87
 HLA-DQ α : 76 KRYNSTAATNEV 87

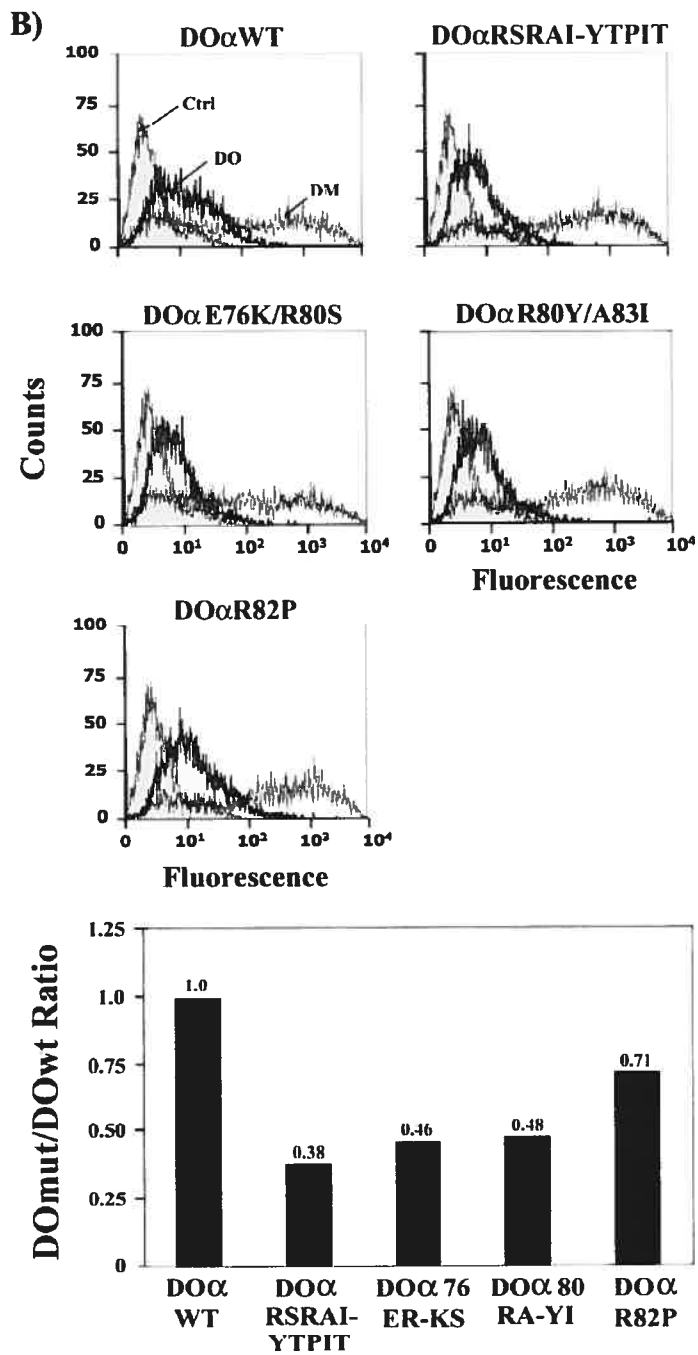


Figure 6. HLA-DM competes with α -specific antibodies to have access to the DO interface.

(A) HEK293T cells were transfected with DR (thin line) or DR₆₃-DO α /DR β chimerical molecule (DR₆₃/DO; bold line) together with DMY. Control (ctrl) cells were stained with the secondary antibody alone (filled histogram). Surface and intracellular staining was assessed by using a DR α -specific antibody (L243) compared to a DR β -specific one (XD5.117). The bottom histogram shows the ratios between the mean fluorescence values obtained for L243 and XD5.117 antibody at the cell surface. **(B)** HEK293T cells were transfected with the same molecules as above, in presence or absence of DMY. Surface staining was assessed by using DR α -specific antibodies (L243;LB3.1), a DR β -specific antibody (XD5.117) as well as the superantigen SEA-BIO. Control (ctrl) cells were stained with the secondary antibody alone (filled histogram).

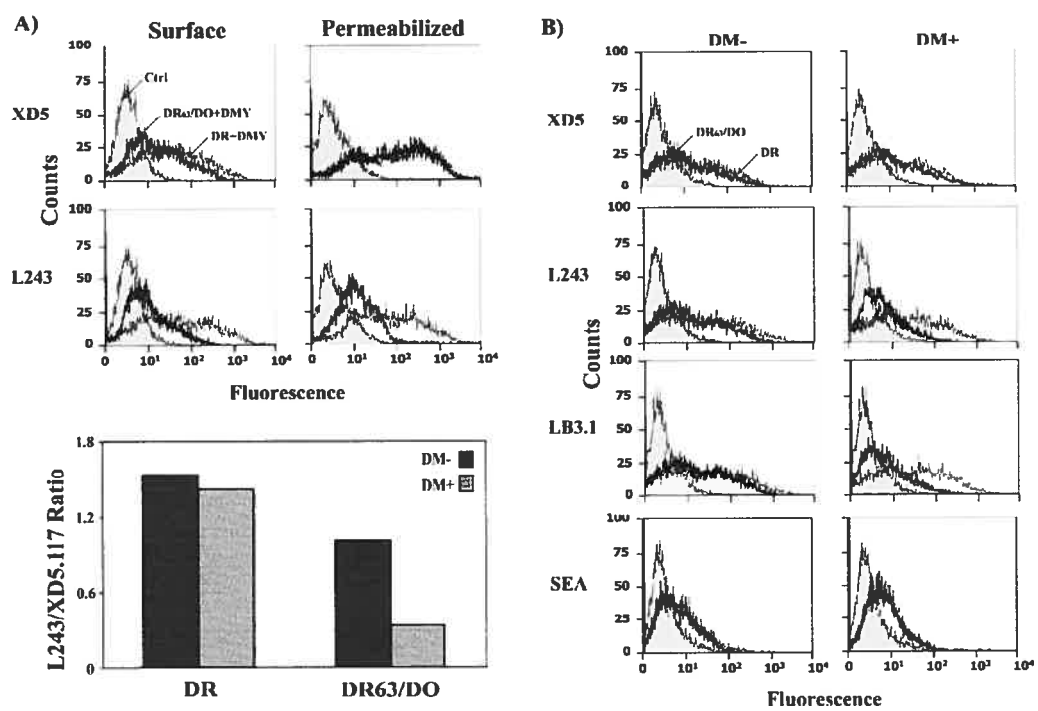
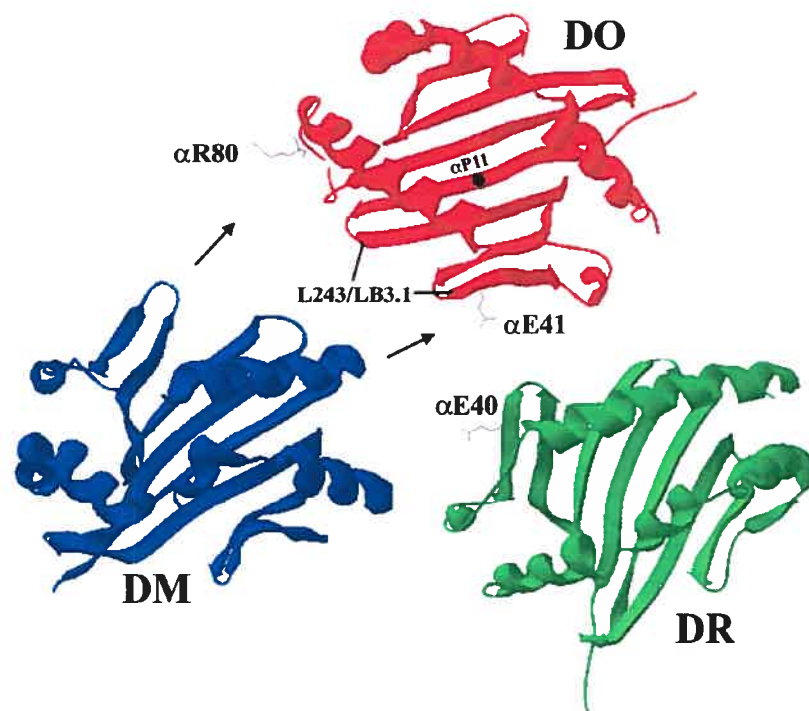


Figure 7. Proposed model of interaction between HLA-DM and HLA-DO.

View of the peptide binding groove of DM (blue), DO (red, inspired on DR crystal) and DR (green). The putative residues of DO implicated in the interaction with DM and the mapping region of the L243/LB3.1 antibodies are depicted as well as the position DO α P11 that affect the stability of the heterodimer. DM and DR molecules are oriented so as to juxtapose the interacting surface as described before (33, 34). DO molecule has been oriented so that the DO α E41 residue is positioned close enough to the DR-interacting lateral interface of DM (DR α E40). By contacting a wide area of the DO α chain, DM would be able to push on the first external loop of the α chain or on the N-terminal region of the β strand allowing a proper folding of the DO heterodimer. DO's inhibition could be due to the close proximity of the DO α E41 residue being part of a "lever like" structure recognized by DM.



CHAPITRE 4 – DISCUSSION

La présentation antigénique est une étape importante dans l'initiation de la réponse cellulaire face à un organisme étranger. A cette fin, de nombreuses molécules accessoires servent à aider la molécule de classe II à lier des peptides antigéniques générés dans les compartiments de présentation. Deux premières études concernant le ciblage et la régulation de la molécule HLA-DO (en annexe de cette thèse) nous ont permis de mieux comprendre son rôle sur la présentation antigénique. A cet effet, nous discuterons brièvement de ces études dans les deux premières sections de ce chapitre. Une connaissance plus approfondie de cette molécule passe toutefois par des études structurales et fonctionnelles. La discussion portera donc une attention particulière à ces aspects qui constituent les points majeurs présentés dans cette thèse.

4.1 Régulation de l'expression de HLA-DO

Dans une première étude (voir article 1 en annexe) nous avons évalué la présence de la chaîne HLA-DO β au niveau de cellules HeLa exprimant la protéine CIITA (Class II transactivator). Les résultats de cytométrie en flux et de microscopie confocale ont démontré une certaine expression de DO β suggérant que HLA-DO puisse s'accumuler dans des cellules autres que les lymphocytes B sous l'influence de CIITA. Toutefois, cette expression est beaucoup plus faible que dans le cas des autres molécules de classe II. Étant donné une distribution presque exclusive aux cellules B et le fait que DO β soit très faiblement induit par

CIITA, il a été proposé qu'un autre facteur spécifique aux cellules B puisse contribuer à l'induction du gène (176). En effet, DO β est fortement exprimé dans les cellules B Raji et cette expression demeure élevée même en absence de CIITA (6). De plus, il est probable que des régions promotrices extérieures à la région proximale de DO β soient impliquées dans l'induction de l'expression puisqu'un fragment de 250pb du promoteur de DO β n'est pas suffisant pour induire l'expression d'un gène rapporteur dans les cellules Raji (162). Le promoteur de DO β pourrait donc constituer un outil intéressant afin d'isoler de nouveaux facteurs de transcription ou de mieux comprendre les mécanismes d'induction impliquant les boîtes W, X et Y de manière CIITA indépendante. Des études futures nous permettront peut-être d'isoler ce facteur spécifique qui induit l'expression de DO β . Une des façons impliquerait l'utilisation d'une banque de cDNA de lymphocyte B transfecté dans des cellules HeLa.

4.2 Importance du ciblage pour la modulation de HLA-DO

Dans une autre étude, nous avons démontré qu'un signal dileucine fonctionnel était encodé dans la queue cytoplasmique de la chaîne DO β (voir article 2 en annexe). Plusieurs études ont démontré que les complexes DM-DO étaient présents en majorité dans les compartiments lysosomaux (91, 158, 164, 165). En revanche, personne n'a encore démontré si les complexes DM-DO pouvaient être redistribués dans des compartiments différents de ceux où on retrouve du DM libre. En effet, DO β possède un signal dileucine qui pourrait entrer en compétition avec le signal de type tyrosine retrouvé dans la queue

cytoplasmique de DM. Jusqu'à présent, nos résultats ont démontré que le motif dileucine de DO n'était pas essentiel afin de cibler le complexe DO-DM dans les compartiments lysosomaux. Sans affecter le ciblage globale du complexe, il est possible que DO affecte le type de compartiments vers lesquels sera ciblé le complexe. Certaines études démontrent d'ailleurs que le signal dileucine permet la redistribution des molécules de classe II ainsi que les complexes DM-DO de la membrane interne vers la membrane limitante des compartiments MIIC multivésiculaires (167). Ce même groupe démontre également que les cellules où les molécules HLA-DO sont mutées pour leur motif dileucine génèrent plus de complexes DR-CLIP qu'une cellule possédant une molécule HLA-DO sauvage. Cette observation a été confirmée dans notre laboratoire et suggère un rôle du signal dileucine dans le ciblage différentiel des complexes DO-DM dans la voie endocytaire.

Dans le futur, il sera intéressant de caractériser au niveau fonctionnel le motif dileucine de HLA-DO par des tests de présentation d'antigènes solubles et en analysant la composition des exosomes. En effet, on retrouve une grande quantité de molécules de classe II classiques dans ces structures (177). Il sera donc intéressant de vérifier la présence possible de DO au niveau des exosomes. D'autre part, une étude récente propose que la région transmembranaire des molécules de classe II soit importante pour leur ciblage (178). DO possède certaines irrégularités au niveau de sa région transmembranaire (voir section 4.3.1.2) qui pourrait jouer un rôle déterminant dans le processus. La

caractérisation de ce domaine pourrait donc fournir des résultats complémentaires à nos études de ciblage.

4.3 Analyse structurale de HLA-DO

4.3.1 Formation de l'hétérodimère HLA-DO $\alpha\beta$

La formation stable des hétérodimères de classe II classiques demande une interaction adéquate entre les chaînes α et β qui formeront le complexe. Étant donné que plusieurs isotypes différents (et parfois même plusieurs allèles d'un même isotype) sont produits en même temps dans le réticulum endoplasmique, certaines lois interviennent afin que la chaîne α d'un isotype particulier puisse interagir seulement avec le partenaire β du même isotype ou d'haplotypes correspondants. Il a été démontré par plusieurs groupes que certaines combinaisons d'haplotypes « non-correspondants » démontrent une expression complètement déficiente des hétérodimères à la surface cellulaire (73-75). Des expériences de digestion à l'endoglycosidase H ont également démontré une incapacité de certaines combinaisons à progresser vers l'appareil de Golgi. Dans la majorité des cas observés, cette rétention était attribuable à un mauvais appariement des domaines N-terminaux (79).

HLA-DO ressemble à ce type d'hétérodimère mal assemblé puisqu'il est retenu dans le réticulum endoplasmique et n'accède ni à l'appareil de Golgi, ni à la surface cellulaire. Nos résultats ont également démontré que la région N-

terminale de DO, comme il est décrit pour les hétérodimères mal assemblés, est responsable de la rétention de la molécule dans le RE. Il est donc probable que les chaînes DO α et DO β ne soient pas des partenaires naturels à l'origine. Le fait que ces deux gènes soient très éloignés l'un de l'autre pourrait appuyer cette hypothèse. Il est donc possible que le système immunitaire ait évolué en utilisant cette « restriction » dans la formation de l'hétérodimère afin de s'assurer que HLA-DO joue pleinement son rôle de modulateur de HLA-DM en n'ayant pas accès aux compartiments endosomaux sans sa présence.

4.3.1.1 Règles d'association entre la chaîne DO α et DO β

Comme nous l'avons décrit au chapitre 1.6, il existe plusieurs similarités entre DO et les molécules de classe II classiques. Mais en comparant la séquence protéique des régions N-terminales de DO avec les autres molécules de classe II, on remarque une ressemblance saisissante entre DO et DQ (6, 147) (voir figure 4.1a). En effet, en plus de la séquence protéique qui est très homologue (plus de 50% d'identité), DO possède un acide aminé de plus sur la chaîne alpha. Cet acide aminé supplémentaire est retrouvé dans la chaîne DQ α mais n'est pas présente dans les autres chaînes DR α ou DP α . En regardant le cristal de DQ de plus près, on remarque que cet acide aminé supplémentaire cause une protubérance au niveau du plancher peptidique et a plutôt été numéroté 9a au lieu de 10 (59) (voir figure 4.1b). Il est donc fort probable que DO possède également ce type de renflement. C'est donc en comparant DO avec DQ que nous avons

Nos résultats démontrent que la présence d'une proline en position 11 de la chaîne α (position 10 sur le crystal de la figure 4.1b) est en grande partie responsable du défaut conformationnel. Cet acide aminé peut affecter la structure de plusieurs façons. Premièrement, la proline est un élément très peu flexible qui affecte probablement les autres acides aminés retrouvés localement. De plus, il est possible que cette proline ne forme aucuns liens hydrogènes avec les résidus environnants. En effet, la molécule Ia^k (homologue de DQ chez la souris) possède une proline en position 13 de sa chaîne beta et sa structure tridimensionnelle révèle que cette proline est incapable de former des liens avec les autres résidus (59). Chez DQ α , un lien important se forme entre le résidu α V10 et l'hélice de la chaîne alpha au résidu α S23 (voir figure 4.1b). La proline de DO, qui est à la position équivalente, pourrait ne pas former ce lien important. D'autre part, la proline pourrait affecter les interactions des résidus environnant en affectant entre autre les interactions inter-chaînes. En effet, de nombreux ponts hydrogènes se forment au niveau du plancher peptidique chez DQ. Il existe aussi une liaison inter-chaîne impliquant le résidu β Q10 du plancher avec le résidu α H143 du domaine β 2 ainsi que le lien α Y9 avec le résidu β E86 de l'hélice alpha (voir figure 4.1b). La proline n'étant pas très loin de ces résidus, il est tentant de suggérer que cette dernière joue un rôle important dans la formation de ces liens inter-chaînes.

4.3.1.2 Importance des régions transmembranaires

Plusieurs études ont démontré l'importance des régions N-terminales dans l'assemblage des molécules de classe II (63, 64, 77, 78). Pour notre part, nous avons démontré que cette région était critique afin de permettre à HLA-DO de former des hétérodimères stables pouvant transiter hors du réticulum endoplasmique. Il existe néanmoins d'autres éléments qui pourraient être impliqués au niveau de l'assemblage. En effet, le haut degré de conservation retrouvé au niveau des régions transmembranaires des molécules de classe II suggère que ce domaine puisse jouer un rôle important (73, 179). Des expériences ont prouvé que la modification de ces domaines provoquait une rétention des hétérodimères de classe II dans le RE (81). De plus, l'insertion des régions transmembranaires α et β dans d'autres protéines permettait leur assemblage, ce qui suggère une interaction directe des chaînes au niveau de ces régions.

Concernant HLA-DO, certaines évidences permettent de croire que la région transmembranaire pourrait influencer l'assemblage des chaînes α et β . D'une part, certains auteurs ont réussi à purifier plus efficacement des molécules de DO en remplaçant la région transmembranaire par la région Fc des IgG1 (151). D'autre part, la séquence protéique de la région transmembranaire de DO n'est pas tout à fait conservée. En effet, les molécules de classe II possèdent une série de glycines conservées qui seraient orientées dans l'interface de contact entre les chaînes α et β (81). En regardant la séquence de DO β , on remarque que deux glycines consécutives sont remplacées par des alanines. Ce changement pourrait

donc être suffisant pour affecter localement l'ancrage à la membrane ou déstabiliser la formation de l'hétérodimère. La restauration de ces glycines permettrait de vérifier l'hypothèse. De plus, en combinant cette modification à celle du plancher peptidique (DO α P-V), il est probable que la sortie de DO du RE soit encore plus efficace.

4.3.2 Structure tridimensionnelle de HLA-DO

La résolution de la structure tridimensionnelle d'une molécule donne toujours énormément d'information car elle permet de prédire quels seront les résidus exposés susceptibles de permettre une interaction avec les autres molécules. La structure des molécules de classe II classique est connue depuis plus d'une dizaine d'années maintenant. Ces études ont permis notamment de mieux comprendre la façon dont les molécules du CMH peuvent lier les peptides et elles ont permis de visualiser les contacts entre les chaînes α et β permettant la formation des hétérodimères. Jusqu'à maintenant, aucune structure cristalline de DO n'a été proposée. Cette incapacité à résoudre cette structure peut être expliquée par le fait qu'il est difficile de produire une grande quantité de molécules DO solubles dans les cellules d'insectes (164) (Daved Fremont, communication personnelle) et la mauvaise conformation de DO pourrait expliquer cette faible production.

Dans notre étude, nous avons décrit une mutation de DO (DO α P11V) qui rétablit sa conformation. L'utilisation d'une telle molécule pourrait donc

permettre une production beaucoup plus importante de DO dans les cellules d'insecte. Cette voie ouvre la porte à plusieurs expériences dont la plus importante concerne la possibilité de résoudre la structure de DO par cristallographie à rayons X. Jusqu'à maintenant, seuls des modèles structuraux basés sur DR ont pu être proposés (180). La résolution de la structure tridimensionnelle de DO permettrait d'une part de déterminer si la niche peptidique est fermée comme c'est le cas pour DM ou bien si elle peut accommoder des peptides ou autres structures non peptidiques. A cette fin, il sera intéressant de confirmer par des études *in vitro* la liaison potentielle de peptides CLIP ou de peptides HA marqués sur le mutant DO α P11V. La structure tridimensionnelle de HLA-DO pourra également mieux orienter nos recherches sur les sites potentiels d'interaction avec HLA-DM. Enfin, ces molécules solubles permettront de confirmer le rôle fonctionnel de DOPV dans un système *in vitro*. En effet, nous avons déjà démontré que cette molécule menait à la formation de CLIP à la surface des cellules HeLa CIITA.

4.3.3 Changements conformationnels de DO

Certaines expériences ont démontrés que DM a la capacité d'altérer la conformation de DR (voir section 1.5.4.1). Par l'anticorps conformationnel 16.23, il est possible de discriminer les molécules de classe II qui ont rencontré DM de celles qui ne l'on jamais contacté (134). L'analogie entre cet anticorps et celui utilisé dans notre étude (Mags.DO) est intéressante. En effet, nos résultats démontrent que Mags.DO reconnaît préférentiellement DO lorsque DM est co-exprimé, ce qui suggère que la liaison de DM permet un changement de

conformation sur HLA-DO. Il faut toutefois être prudent lors de l'analyse de ce résultat car il est possible que la réactivité de l'anticorps soit due à une stabilisation des molécules DO par DM. Même si notre étude semble démontrer une expression équivalente de DO entre les cellules 293T transfectées avec DO seul ou co-exprimées avec DM, il est possible que nos méthodes de détection ne nous donnent pas l'heure juste concernant la stabilité de la protéine. Afin de confirmer un rôle de DM dans les changements de conformation induits sur DO, il sera intéressant d'effectuer des tests *in vitro* afin d'éviter toute dégradation prématurée. En purifiant des molécules DO et DM à partir de cellules transfectées, nous pensons pouvoir restaurer la réactivité de notre anticorps en combinant les deux molécules alors qu'une réaction beaucoup plus modeste est escomptée en utilisant seulement du DO. L'utilisation de microsphères fluorescentes (équivalentes à plus de 10 000 molécules fluorescentes) permettrait d'augmenter substantiellement le signal lors de ces essais.

4.3.3.1 Implication des chaperons du RE dans la rétention

Après leur synthèse dans le RE, les chaînes α et β des molécules de classe II doivent s'associer afin d'éviter l'agrégation ainsi qu'une dégradation prématurée. De plus, ces molécules doivent adopter une bonne conformation. En effet, il a été démontré que certains chaperons résidents du RE comme BIP et calnexine s'associent avec les molécules de classe II qui sont mal repliées (181, 182). Nous avons démontré que DM induisait un changement de conformation sur DO lors de leur liaison dans le RE. Il est donc probable que la conformation de

DO soit inadéquate avant l'arrivée de DM et que ce mauvais repliement soit reconnu par les protéines résidentes du RE. Ces chaperonnes permettrait à DO de demeurer dans le RE jusqu'à ce qu'une molécule DM vienne corriger la situation. Une fois la conformation rétablie, la chaperonne de rétention se détacherait de DO afin de permettre la sortie du RE.

Si les mécanismes de rétention de DO sont semblables à ceux décrits pour les molécules de classe II classiques, BIP et calnexine demeurent des candidats potentiels à investiguer. Par des études de co-immunoprécipitation, il sera possible de déterminer si DO peut se lier à l'une ou l'autre des ces molécules. Il faut toutefois être prudent en effectuant ce type d'expérience. Si les anticorps utilisés proviennent de sérums, beaucoup de protéines mal repliées peuvent s'y retrouver et lier non spécifiquement les chaperons. En effet, des expériences effectuées dans notre laboratoire semblaient démontrer une liaison entre DO et BIP/calreticuline. Suite à des analyses plus poussées, il s'est avéré que l'anticorps utilisé liait directement les chaperons. Une façon d'éviter ce type de problème implique l'utilisation d'anticorps dirigés contre BIP ou calnexine et de révéler la présence de DO co-immunoprécipitée par « western blot ».

4.3.3.2 Correction de la conformation de HLA-DO par DM

Lors de nos expériences, nous avons démontré que DM interagit fortement avec la chimère cDO (DR₁₈/DO $\alpha\beta$), ce qui suggère que les 18 premiers acides aminés de DO ne forment pas de contacts importants avec DM. Toutefois, sans

avoir un rôle direct à jouer, il est probable que DM possède un point de contact près de la niche peptidique permettant de corriger les problèmes de conformation. Nous avons également décrit une région de DO α (entre les acides aminés 77 et 84) qui favoriserait la liaison avec DM. En tenant compte de cette donnée, il est permis de proposer un modèle afin d'expliquer comment DM corrige la conformation du plancher peptidique de HLA-DO. En effet, en liant cette région, DM pourrait agir en poussant sur la région N-terminale de la chaîne β ou la région α 15-18 afin de corriger le plancher en jouant sur la formation des ponts hydrogènes (voir figure 4.2).

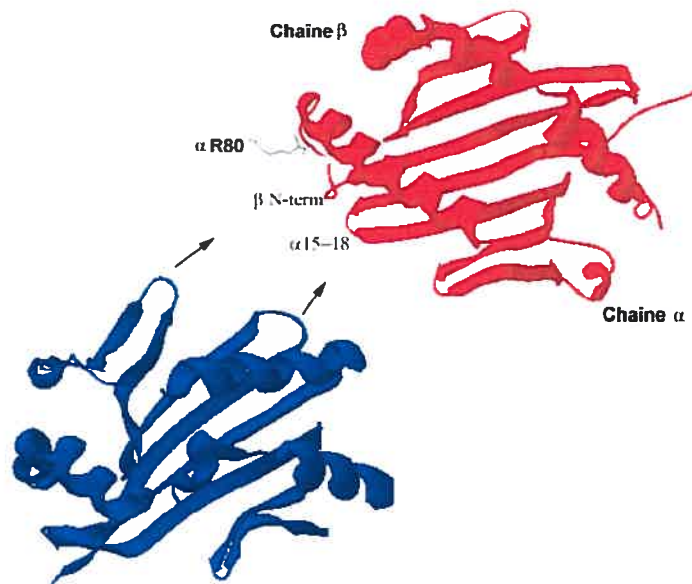


Figure 4.2 Correction de la conformation de HLA-DO par DM

HLA-DM est représenté en bleu et HLA-DO en rouge. En accédant à l'acide aminé α R80, HLA-DM pourrait faire contact avec la région N-terminale de la chaîne β ou bien pousser sur la région α 15-18 afin de replacer le plancher peptidique de HLA-DO. Les molécules ne sont représentées que par leur niche afin d'alléger le schéma.

4.4 Analyse fonctionnelle de HLA-DO

4.4.1 Modèle d'interaction entre DM et DO

A la lumière des résultats décrits dans cette thèse, il est possible de proposer certains modèles d'interaction entre DO et DM. D'une part, le résidu DO α E41 semble important pour l'inhibition de DM puisque sa mutation affecte la formation de CLIP à la surface des cellules et constituerait également un point de contact avec DM. D'autre part, le résidu DO α R80 (ou la région correspondante) semble également jouer un rôle dans l'interaction avec DM, comme il a été démontré par l'utilisation de molécules chimériques DR/DO. En analysant les résidus potentiellement impliqués dans l'interaction, on remarque qu'ils sont situés loin l'un de l'autre tout en étant orientés sur la même face de DO (voir figure 4.3). Cet éloignement suggère donc que DM puisse interagir de deux façons différentes sur DO.

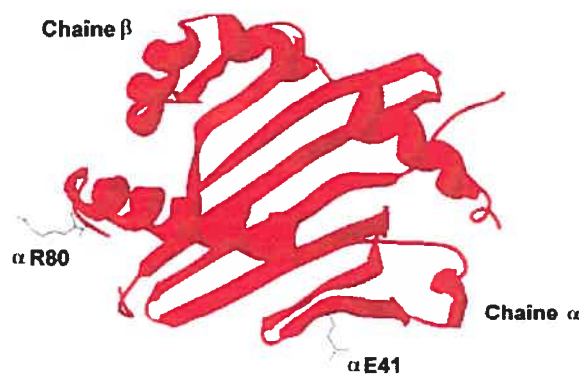


Figure 4.3 Acides aminés de DO impliqués dans l'interaction avec DM

Structure tridimensionnelle de la niche présumée de DO. Les résidus impliqués dans l'interaction avec DM sont indiqués en noir. Un premier résidu est situé en région N-terminale de l'hélice DO α (α E41) alors que l'autre résidu est situé en région C-terminale de l'hélice (α R80). Le modèle s'inspire de la structure de la molécule de classe II classique HLA-DQ.

En effet, comme nous l'avons proposé dans notre étude, un premier modèle d'interaction impliquerait une seule interface et la participation des deux résidus de DO à la fois. Dans cette éventualité, DM devrait nécessairement interagir sur le côté de la chaîne α de DO et il est peu probable que des résidus de la chaîne β soient impliqués (voir figure 4.4a). Un deuxième modèle d'interaction impliquerait la participation d'un seul résidu à la fois, ce qui laisse deux interfaces possibles : Une première faisant contact par le résidu α E41 et la deuxième interagissant par la région α R80 (voir figure 4.4b). Cette dernière possibilité n'exclue pas le fait que deux molécules de DM puissent se lier en même temps sur une molécule de DO.

Jusqu'à maintenant, les études sur DM et DR ont démontré que l'interaction implique la partie concave de DM qui interagit avec la partie convexe de la molécule de classe II (voir figure 1.15). D'autres molécules apparentées aux molécules du CMH démontrent également ce type d'interaction. A l'instar de HLA-DM sur DR, c'est la partie concave des molécules du CMH I qui interagit avec CD8 et Ly49 (183, 184). Le Fc récepteur neonatal de rat (FcRn) utilise également des groupements acides similaires à DM pour faire contact avec la portion Fc des immunoglobulines (185). Dans l'éventualité où l'interaction entre les molécules de classe II ne peut s'effectuer autrement que par cette forme, le deuxième modèle d'interaction proposé est favorisé. De plus, il a été démontré que l'interaction entre DM et DR implique autant la participation de la chaîne α

que de la chaîne β pour chacun des hétérodimères (136, 142). Si DM et DO utilisent également chacune de leur chaîne afin de permettre l'interaction, le premier modèle est moins probable à cause de la participation majoritaire de la chaîne α .

En revanche, il existe plusieurs autres exemples d'interaction, notamment l'interaction TCR-CMH ou SEB-CMH (53, 186), qui n'utilisent pas ces interfaces de liaison. En effet, les molécules SEB et TSST-1 n'interagissent qu'avec des résidus de la chaîne α sur les molécules de classe II. Si DM interagit avec DO de façon similaire, le premier modèle d'interaction reste alors possible. Pour supporter cette même idée, nous avons utilisé un anticorps qui fait compétition avec DM pour avoir accès à la chaîne α de DO (voir article 2). Enfin, les deux modèles proposés ne sont pas nécessairement mutuellement exclusifs. En effet, il est possible que des interfaces soient disponibles seulement à certains pH, selon la localisation des complexes DM-DO dans la voie endosomale.

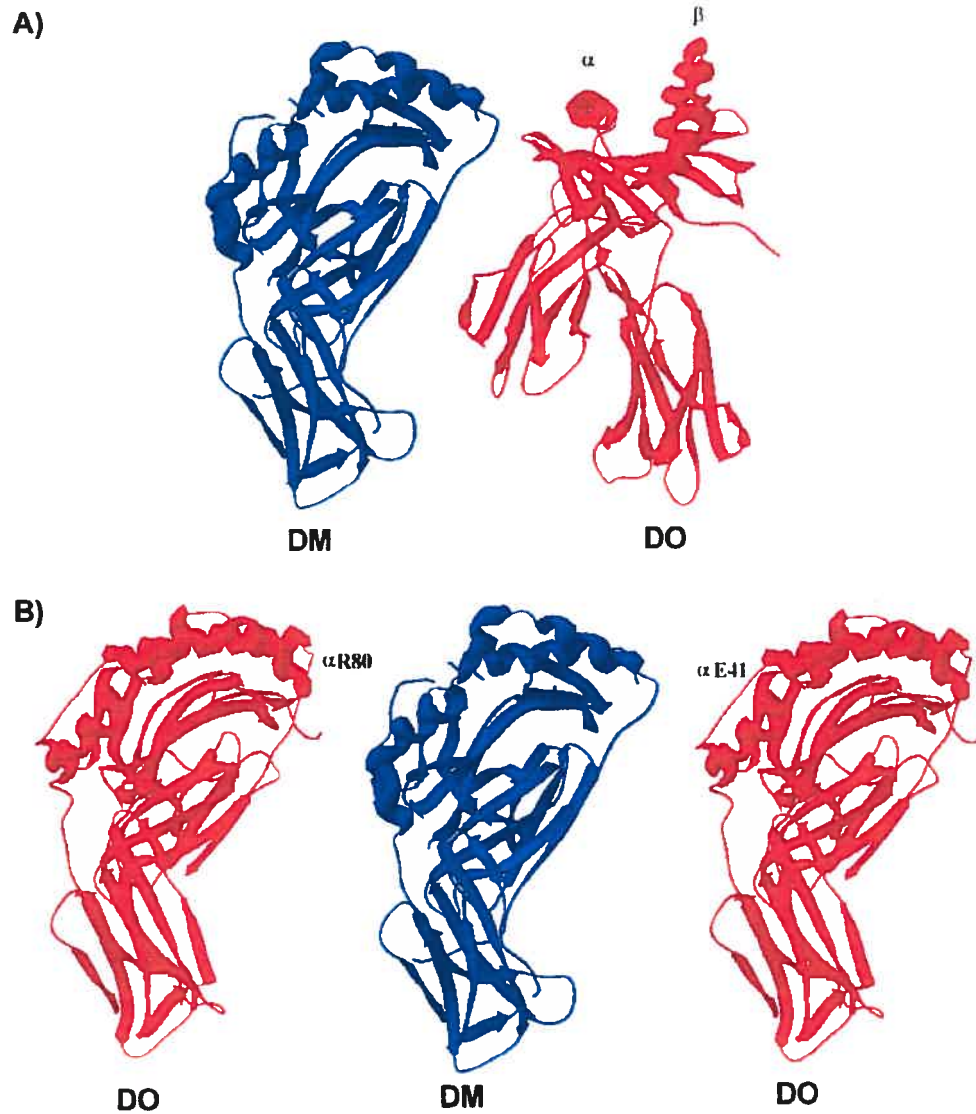


Figure 4.4 Modèles d'interaction entre DM et DO

(A) HLA-DM utilise une seule interface pour interagir avec HLA-DO. La structure bleue représente la molécule HLA-DM orientée de côté par rapport à la niche. La structure rouge représente DO orienté de face par rapport à la niche.

(B) HLA-DM utilise deux interfaces distinctes pour faire contact avec HLA-DO. Il interagit soit du côté C-terminal de l'hélice DO α avec le résidu $\alpha R80$ ou du côté N-terminal de l'hélice avec le résidu $\alpha E41$. Les structures sont orientées de côté par rapport à la niche.

4.4.2 Modèle d'inhibition de DM par DO

4.4.2.1 Modulation par compétition entre DR et DO

En comparant la séquence protéique de DO avec DR, on se rend compte que la majorité des résidus critiques de DR impliqués dans l'interaction avec DM sont conservés chez HLA-DO (voir figure 4.5). Cette ressemblance suggère donc que les sites d'interaction sur DO pourraient être les mêmes et qu'une compétition entre DO et DR pour ces sites pourrait expliquer la baisse d'activité de DM. Nos expériences démontrent des résultats mitigés à cet égard. En effet, la mutation de la plupart des résidus conservés sur DO (α F52, β V184, β V186 et β E187) n'empêche ni l'interaction avec DM, ni sa capacité inhibitrice. Le seul effet observé concerne le résidu α E41 qui, une fois muté, abroge la capacité inhibitrice de DO tout en affectant partiellement son interaction avec DM. Ces résultats suggèrent donc que d'autres résidus propre à l'interaction DO-DM (Triton X-100 résistante) soient impliqués comme celui que nous décrivons à la région N-terminale de l'hélice α (α R80). A la lumière de ces constatations et à cause d'une force d'interaction différente retrouvée entre DO-DM et DR-DM, il est fort probable que DO et DR utilisent des interfaces distinctes afin de faire contact avec DM. Pour appuyer cette idée, le groupe de Elizabeth Mellins a testé plusieurs mutants de DM qui n'interagissent plus avec DR mais qui continuent de lier fortement DO (142).

```

DO $\alpha$  : 36 DLKKSEAVWRLPEFGDFARFDP 58
          |. |.|.|||| ||| || |.
DR $\alpha$  : 35 DMAKKE TVWRLEEFGRFACFEA 57

DO $\beta$  : 177 HSSLLSPVSEWRAQSE 193
          | |. ||..|||| ||
DR $\beta$  : 177 HPSVTSPLTVEWRARSE 193

```

Figure 4.5 Les résidus de DR impliqués dans l'interaction avec DM sont conservés chez HLA-DO

Alignement de séquence entre DO et DR. Seules les régions contenant les résidus critiques pour l'interaction avec DM sont indiquées. Les résidus importants sont marqués en rouge. Les chiffres correspondent à la position des acides aminés. Les barres entre les séquences correspondent aux acides aminés identiques et les points aux résidus conservés.

Toutefois, étant donné une très forte association entre DO et DM, il est possible que les résidus impliqués dans l'interaction DR-DM soient conservés pour DO-DM mais que leur mutation ponctuelle soit insuffisante pour affecter la liaison. Il faudrait donc muter plusieurs résidus à la fois ou affecter radicalement la structure de DO pour empêcher l'interaction. A cet effet, le groupe de Elizabeth Mellins a décrit un mutant de glycosylation sur DM β qui affecte à la fois l'interaction avec DR et celle avec DO (142). Avant de conclure hâtivement, il faut toutefois prendre en considération que ces mutations ne sont pas de simples modifications. En effet, l'ajout de groupements glycosylés ont toutes les chances de modifier significativement la conformation des molécules impliquées.

A la lumière de ces résultats, il est probable que DM puisse lier DO par plusieurs points d'ancrage. Un premier contact dans le réticulum endoplasmique se ferait grâce à un lien fort (possiblement la région $\alpha R80$) qui permet de rétablir la conformation de DO et la sortie du complexe DO-DM vers d'autres compartiments. Une fois dans les compartiments acides, DO exposerait son interface apparentée à DR (résidu $\alpha E41$). Sans agir nécessairement par compétition directe, DO pourrait quand même interférer avec l'activité de DM. En effet, il a été suggéré que le résidu $\alpha E40$ de DR fasse partie d'un levier permettant à DM d'agir afin d'enlever le peptide de la niche (voir figure 1.16a). Il est donc possible que DO compétitionne avec DR dans les lysosomes en présentant le même type de structure à DM. Ce dernier agirait sur le levier de DO sans résultats concrets. Cette diversion ferait en sorte qu'une quantité appréciable de DR-CLIP échappe à l'attention de DM et soit transportée en surface.

4.4.2.2 Modulation simple

Le modèle le plus simple permettant l'inhibition de DM par DO implique des changements conformationnels. En effet, le simple fait de lier DM peut induire un changement de conformation qui inhibe son activité. DO pourrait agir sur DM dans les endosomes précoces, l'empêchant d'interagir avec DR. Une fois dans les lysosomes à pH acide, DO pourrait lui-même être affecté par un changement conformationnel ayant pour effet de rétablir l'activité de DM.

4.4.3 Engagement des complexes DO-DM avec DR

Par des expériences d'immunoprécipitations successives, certaines études ont démontré que les molécules DO-DM-DR pouvaient s'associer afin de former un complexe trimoléculaire (125). Dans notre cas, certaines données suggèrent également la possibilité de former ce genre de complexe. En effet, nous avons démontré qu'il était possible de co-immunoprécipiter les molécules DO-DM-DR lorsque DO était intact. En revanche, la mutation de la position α E41 démontre une perte de complexes tri-moléculaires malgré la présence égale de molécules DO (voir article 2, figure 3). Ce résultat suggère fortement que la formation du complexe soit spécifique à l'interaction DO-DM et que la présence de DO dans ce complexe tri-moléculaire n'est pas attribuable à la seule participation des tétraspanes.

Dépendamment de la façon dont DO fait contact avec DM, il est possible d'imaginer comment DO peut s'intégrer dans un complexe trimérique. Si le contact se fait par deux interfaces distinctes, une molécule DM peut très bien lier une molécule DO par son site Triton X-100 résistant, laissant l'autre interface disponible. A ce moment, une molécule DR pourrait venir interagir avec DM par cette interface libre (voir figure 4.6a). Une façon pour DO d'inhiber l'échange peptidique se ferait par compétition pour cette interface (voir figure 4.6a). En effet, la mutation du résidu α E41 suggère que DO serait incapable d'utiliser cette deuxième interface afin d'entrer en compétition avec DR. Une autre possibilité de

complexe trimoléculaire implique une seule interface entre DO et DM (résidus α E41 et α R80). Dans cette optique, il faut imaginer que DO est situé suffisamment près du site catalytique de DM pour empêcher son activité mais permet quand même la liaison de DR sur DM. La figure 4.6b illustre une possibilité intéressante de complexe.

Dans ce modèle, le résidu DO α E41 peut « interférer » avec le résidu identique sur DR, affectant du même coup la relâche peptidique. De plus, la compétition peut s'effectuer sans nécessairement empêcher la liaison DM-DR. Contrairement au modèle précédent où DO empêcherait la formation de complexes trimoléculaires par compétition directe, ce modèle-ci pourrait au contraire le favoriser. En effet, DO pourrait avoir comme rôle d'occuper le site catalytique de DM tout en laissant DR suspendu à DM. Dans ce scénario, le temps de contact entre DM et DR serait prolongé à cause de l'interférence occasionnée par DO. Ce modèle est en accord avec certaines études démontrant que les complexes DM-DO lieraient mieux les molécules de classe II (125). Il reste également compatible avec certaines études du groupe de Karlsson suggérant que DO modifie la cinétique de relâche peptidique (149). Enfin, nous n'avons pas de preuves directes que le résidu α E41 de DO soit impliqué dans quelconque interférence avec DR. Il est donc possible que cette position ne soit impliquée que dans l'interaction avec DM et que la ressemblance avec DR ne soit que pure coïncidence.

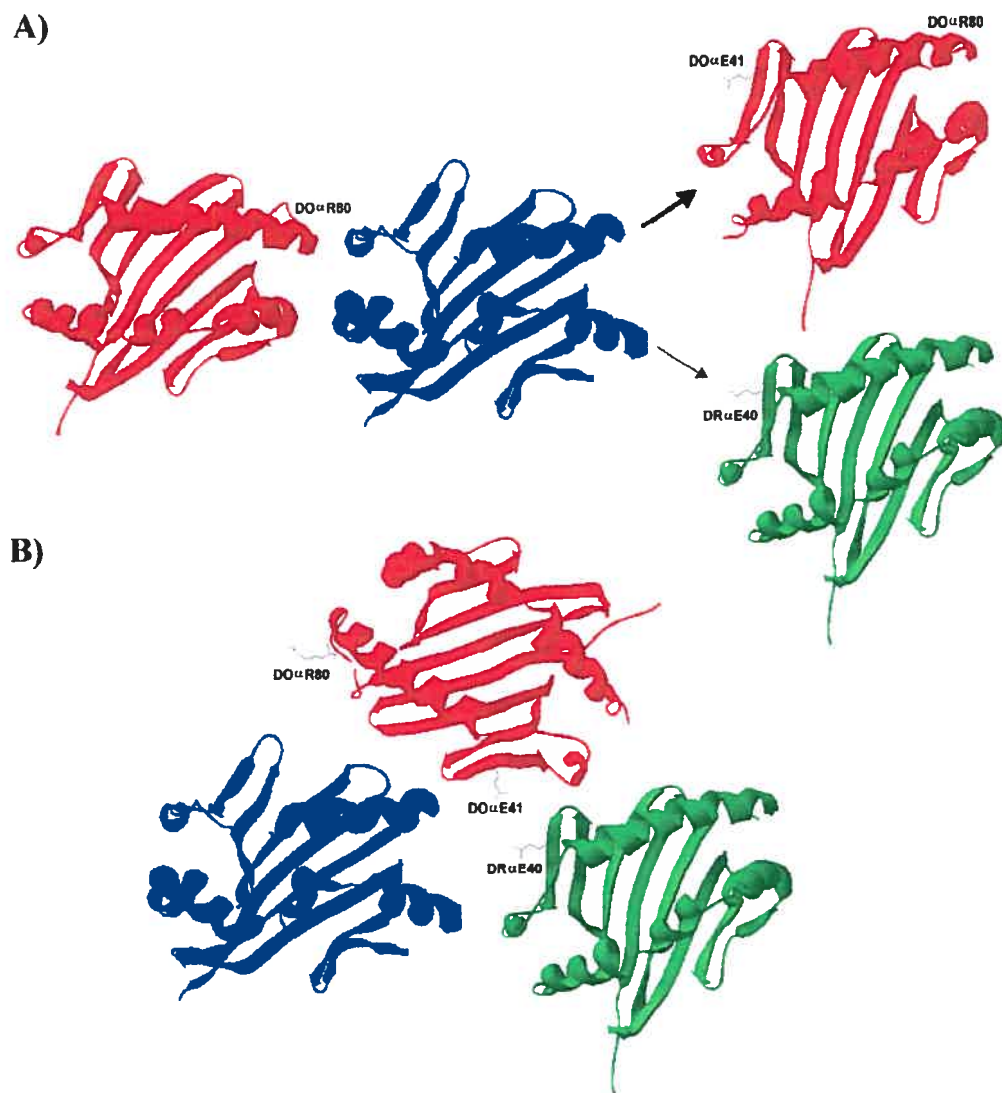


Figure 4.6 Complexes tri-moléculaires DO-DM-DR

(A) HLA-DO interagit avec DM par une interface (DO α R80) opposée à l'interface d'interaction DM-DR. DO pourrait toutefois compétitionner avec DR pour cette dernière interface dans les compartiments lysosomaux. (B) HLA-DO se lie à DM par une seule interface impliquant les résidus DO α R80 et DO α E41. Cette interaction laisserait assez de place pour lier DR afin de former des complexes tri-moléculaires. DO pourrait interférer avec l'activité de DM en présentant un levier similaire à DR contenant l'acide aminé α E41. DM est représenté en bleu, DO en rouge et DR en vert. Les acides aminés impliqués dans les interactions sont indiqués en noir. Les grosseur des flèches indiquent la préférence d'interaction. Les molécules ne sont représentées que par leur niche peptidique afin d'alléger le schéma.

4.4.4 Conclusions

Il n'y a malheureusement pas de réponses claires quant à la façon exacte dont DO affecte l'activité de DM. Mais en plus des arguments apportés dans nos études, certaines évidences semblent suggérer que DM et DO interagissent par une seule interface et qu'il n'y a pas de compétition directe entre DO et DM. En effet, lorsque des complexes DO-DM sont injectés à des souris afin d'obtenir des anticorps spécifiques dirigés contre DO, il s'est avéré que la totalité des anticorps repêchés étaient spécifiques à la chaîne beta et qu'aucun de ces anticorps ne reconnaît la chaîne alpha (communication personnelle, Lisa Denzin). Cette incapacité à générer des anticorps contre la chaîne alpha pourrait être due à une protection par la molécule DM qui empêche la souris de monter une réponse contre les résidus de DO α . Si cette protection existe vraiment, le résultat suggère que la liaison entre DO et DM implique une interface majeure de la chaîne DO α . De plus, une interaction de ce type expliquerait beaucoup plus facilement comment DM peut corriger la conformation de DO en agissant sur le plancher peptidique (voir section 4.3.3.2).

Les études *in vitro* effectuées par le groupe de Cresswell concernant l'inhibition de DM par DO ne semblent pas correspondre à un profil de compétition directe (158). De plus, si cette compétition existait, nous devrions être en mesure de le vérifier en effectuant des tests de coimmunoprécipitation. En effet, la présence de DO devrait empêcher l'interaction entre DM et DR. Hors

aucune de nos expériences n'a pu démontrer une telle interférence de la part de DO, que ce soit à pH acide ou basique. Afin de mieux caractériser le mécanisme d'inhibition par DO, une voie prometteuse impliquerait une mutagenèse sur DM. En effet, la découverte de mutants affectant l'interaction avec DO mais pas avec DR suggérerait fortement des sites de liaison distincts pour l'accès à DM. A l'opposé, des mutations simples provoquant a la fois une perte d'interaction entre DM-DR et DM-DO favoriserait le modèle de compétition directe. D'autre part, il sera important de mieux caractériser la mutation α E41K qui semble affecter l'activité de DM. En effet, la mesure effectuée dans nos expériences est indirecte puisqu'elle implique l'analyse de CLIP en surface des cellules. Le système de cellules HeLa utilisé pourrait également donner des résultats différents de ceux rencontrés dans les cellules B.

4.5 Rôle de HLA-DO au niveau des cellules B

Le rôle principal de HLA-DO dans les cellules B semble être de freiner la présentation antigénique, surtout en ce qui concerne les antigènes internalisés de façon non spécifique (151, 187). Une question reste toutefois importante à soulever : pourquoi les cellules B ont-elles besoin de ce type de régulateur négatif? En effet, il serait beaucoup plus simple pour ces cellules de réguler négativement l'expression des molécules de classe II ou de HLA-DM afin de réduire l'efficacité de présentation. Mais dans le contexte d'une infection, il pourrait être préférable de ne pas trop jouer sur l'expression des molécules de classe II en général afin de favoriser une présentation antigénique optimale. De plus, la régulation négative

spécifique de HLA-DM pourrait être difficile à obtenir puisque ce dernier est sous le contrôle de CIITA comme la majorité des autres molécules de classe II. En affectant CIITA, il y a risque de perturber un bon nombre de molécules impliquées dans la présentation antigénique. HLA-DO pourrait également mener à un contrôle plus fin à l'intérieur de la cellule en affectant la présentation antigénique selon le pH rencontré. De plus, en jouant possiblement sur le ciblage de DM dans différents compartiments, HLA-DO éviterait au système d'avoir à modifier ses fonctions de ciblage généraux (ex : adaptines) afin d'arriver au même effet.

D'autre part, dans l'éventualité où la cellule veut changer rapidement son efficacité de présentation antigénique, il peut être préférable d'utiliser une molécule inhibitrice comme HLA-DO au lieu de jouer sur le niveau d'expression des autres molécules de classe II. En effet, ces molécules sont extrêmement stables puisqu'elles résident naturellement dans les compartiments lysosomaux. Le temps nécessaire à leur dégradation ou le temps pour réactiver leur expression par la suite pourrait être trop long pour la cellule B. Il existe de nombreux exemples de systèmes utilisant un « interrupteur moléculaire » (les protéine G par exemple) qui permet aux cellules de s'adapter rapidement aux nouvelles conditions. Sans agir par le même mécanisme, HLA-DO pourrait quand même agir comme un interrupteur négatif spécifique aux cellules B.

4.5.1 Prévention des maladies autoimmunitaires?

Les lymphocytes B peuvent être des CPA très efficaces, surtout lorsque les antigènes sont internalisés par leurs récepteurs de surface (188). De façon intéressante, il a été démontré que les cellules B peuvent présenter des épitopes sous-dominants alors que les cellules dendritiques présentent plutôt des épitopes immunodominants (189). Cette observation pourrait expliquer pourquoi la présentation antigénique par les cellules B peut mener à des réactions autoimmunitaires (190). Dans ce contexte, HLA-DO pourrait jouer un rôle important en contrôlant la réponse induite par les cellules B. D'une part, la capacité inhibitrice de DO suggère une diminution généralisée de la réponse CD4⁺. D'autre part, HLA-DO régule la composition du répertoire peptidique qui influence la spécificité des cellules B qui seront induites afin de mener une réponse. Ces deux fonctions modulatrices de DO pourraient donc empêcher l'activation de cellules CD4⁺ non spécifiques et ainsi prévenir l'induction d'une réponse autoimmunitaire. D'un autre côté, HLA-DM semble être important afin de favoriser la présentation de peptides immunodominants (191). Une trop grande quantité de HLA-DO pourrait donc nuire à cette fonction de DM en favorisant la présentation de peptides cryptiques et ainsi jouer sur l'autoimmunité.

4.5.2 Impact de DO dans l'évasion tumorale?

Dans de nombreux cas, les cellules cancéreuses peuvent échapper à la surveillance du système immunitaire grâce à une diminution de la présentation d'antigènes tumoraux (192). Une hausse d'expression de la molécule HLA-DO

ou une baisse de HLA-DM pourrait être une des causes possibles. En effet, l'activité inhibiteur de HLA-DO laisse suggérer qu'une cellule B surexprimant cette molécule puisse être grandement affectée dans sa capacité à présenter des antigènes. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé par « western blot » ou par cytométrie en flux l'expression des molécules de classe II HLA-DM, DO, DR ainsi que la chaîne invariante et le peptide CLIP chez des lignées cellulaires ainsi que des cellules leucémiques primaires. L'analyse par « western blot » a permis de montrer une grande variation au niveau de l'expression de DO entre les différentes cellules. De façon plus intéressante, l'analyse des lignées démontrait une forte corrélation entre le niveau d'expression de DO et la quantité de complexes MHC-CLIP détectés à la surface des cellules (voir figure 4.7). Malheureusement, cette corrélation était beaucoup moins frappante dans le cas des cellules primaires. En effet, une hausse de CLIP en surface ne correspondait pas nécessairement à une hausse de DO. Ces analyses nous informent donc qu'il faut être prudent au niveau de l'interprétation et que le CLIP n'est pas nécessairement un marqueur fidèle de la quantité de DO exprimé. Il faudra également analyser plus de quatre échantillons de cellules primaires afin d'arriver à des réponses concluantes.

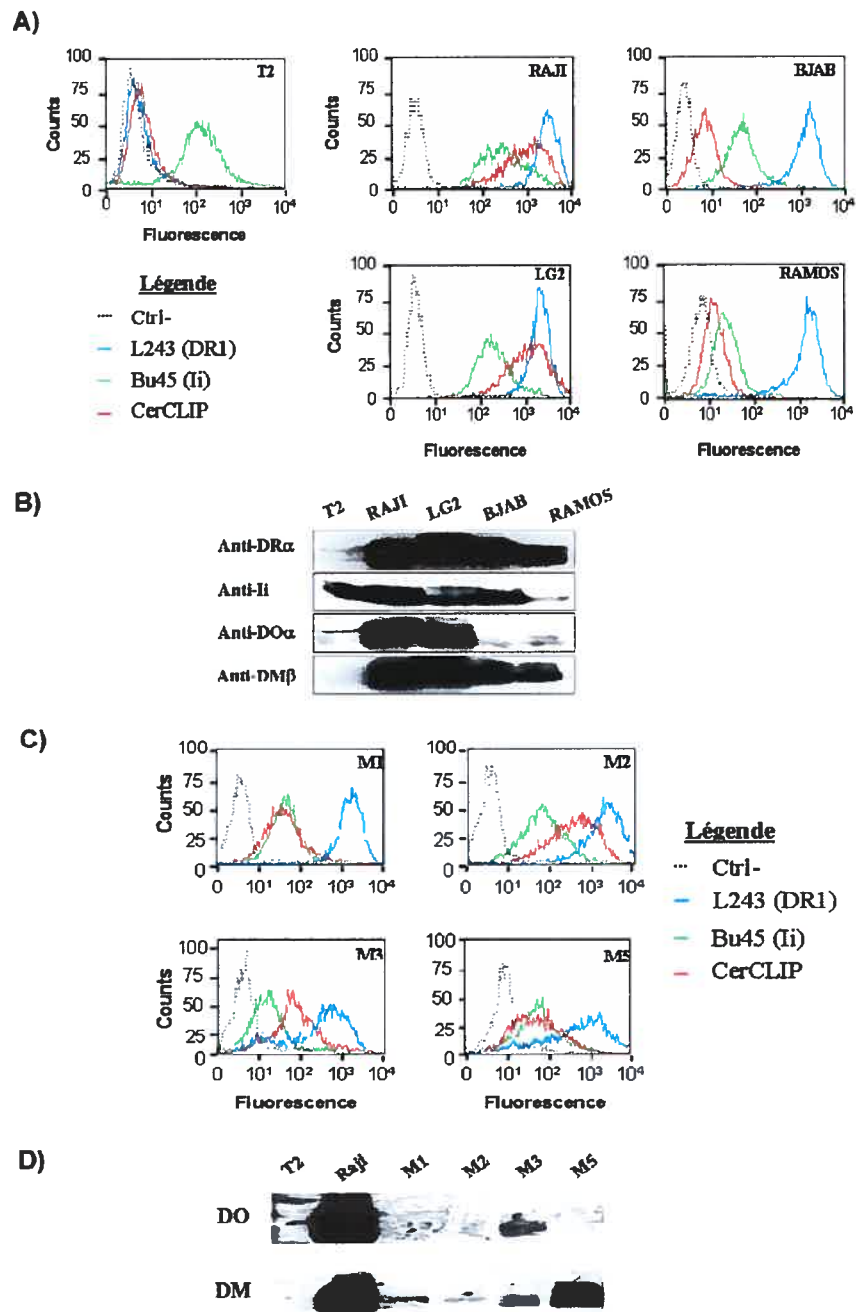


Figure 4.7 Variation d'expression des molécules non classiques de classe II dans des lignées cellulaires et cellules leucémiques primaires

(A) Analyse par cytométrie en flux de l'expression des molécules DR1, Ii et CLIP dans diverses lignées cellulaires (T2 étant un contrôle négatif). (B) Expression par « western blot » des molécules DR, DO, DM et Ii dans les lignées cellulaires. (C/D) Analyse par cytométrie en flux et « western blot » de cellules leucémiques primaires pour des marqueurs similaires à la section précédente.

CHAPITRE 5 – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La présentation antigénique par les molécules de classe II joue un rôle clé dans l'initiation de la réponse cellulaire face aux pathogènes. Dans ce processus, la participation de la molécules accessoire HLA-DM est importante afin que les peptides exogènes soient favorisés et qu'une quantité suffisante de complexes CMHII/peptides soient exprimés en surface afin de stimuler les lymphocytes T. Pour sa part, le rôle de HLA-DO est de moduler la fonction de HLA-DM en agissant surtout de façon négative. Afin de mieux comprendre ce mécanisme d'inhibition, il était important de bien concevoir la façon dont DO interagit avec DM. Notre première étude nous a permis de démontrer que la région N-terminale de DO était critique afin de retenir la molécule à l'intérieur du RE. Sans être une région d'interaction directe avec DM, ce domaine est important puisqu'il force la molécule à lier HLA-DM afin d'atteindre les compartiments endosomaux.

Dans notre deuxième étude, nous avons décrit une interface sur la chaîne DO α qui est impliquée dans l'interaction avec DM. La découverte de cette interface peut conduire à des applications intéressantes dans le but de manipuler la présentation antigéniques chez certaines cellules. En effet, la surexpression de DO pourrait être responsable de désordres liés à la présentation antigénique dans certaines cellules B tumorales. Dans ce contexte, il serait intéressant d'empêcher l'interaction DO-DM dans le but de corriger ces problèmes potentiels. L'inhibition de DO dans les cellules cancéreuses permettrait de restaurer la

présentation antigénique des produits tumoraux et ainsi stimuler les cellules CD4⁺. Une des façons d'y parvenir consisterait à exprimer des polypeptides identiques à la région de DO qui fait contact avec DM afin de faire compétition avec l'interaction des molécules endogènes. L'utilisation de SiRNA (*Small interference RNA*) pourrait également être envisagée afin de réduire l'expression de HLA-DO dans ces cellules.

Jusqu'à maintenant, nos études se sont concentrées presque exclusivement du côté de HLA-DO. Mais il faut être conscient qu'une connaissance plus complète de l'interaction DO-DM implique également la détermination des résidus du côté de DM. Pour cette raison, des expériences de mutagenèse sur HLA-DM seront essentielles afin de mieux caractériser le système. Une meilleure compréhension de cette voie de présentation permettra sûrement d'améliorer le traitement des maladies et de comprendre la progression des infections, cancers et maladies autoimmunitaires. D'autre part, très peu d'études se sont attardées sur le rôle de DO dans les cellules épithéliales thymiques. En considérant son rôle inhibiteur sur la présentation antigénique, il sera intéressant de déterminer jusqu'à quel point HLA-DO peut influencer la sélection des cellules T au niveau du thymus.

CHAPITRE 6 – RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Klein J, Sato A. 2000. The HLA system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343:702-9
2. Les molécules de la reconnaissance immunitaire. 1994. In *ADN recombinant*, ed. De Boeck-Wesmael, pp. 293-312. Bruxelles:
3. Transplantation immunology. 1991. In *Immunology : A short course*, ed. Wiley-Liss, pp. 347-367. New York:
4. Trowsdale J, 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.* 4:2231-7
5. Inoko H, Ando A, Kimura M, Tsuji K. 1985. Isolation and characterization of the cDNA clone and genomic clones of a new HLA class II antigen heavy chain, DO alpha. *J. Immunol.* 135:2156-9
6. Tonnelle C, DeMars R, Long EO. 1985. DO β : a new β chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J.* 4:2839-47
7. Serenius B, Rask L, Peterson PA. 1987. 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.* 262:8759-66
8. Trowsdale J. 1995. "Both man & bird & beast": Comparative organization of MHC genes. *Immunogenetics* 41:1-17
9. Cho S, Attaya M, Brown MG, Monaco JJ. 1991. A cluster of transcribed sequences between the Pb and Ob genes of the murine major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:5197-201
10. York IA, Rock KL. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 14:369-96
11. Lehner PJ, Surman MJ, Cresswell P. 1998. Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity.* 8:221-31
12. HLA Class II Antigens and Alleles: Workshops and Nomenclature. 2000. In *HLA facts book*, ed. S.G.E.Marsh, pp. 26.
13. Thery C, Amigorena S. 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 13:45-51

14. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 15:749-95
15. Steimle V, Otten LA, Zufferey M, Mach B. 1993. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 75:135-46
16. Steimle V, Siegrist C-A, Mottet A, Lisowska-Groszpiere B, Mach B. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265:106-9
17. Chang C-H, Fontes JD, Peterlin M, Flavell RA. 1994. Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *J. Exp. Med.* 180:1367-74
18. Chang C-H, Flavell RA. 1995. Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation. *J. Exp. Med.* 181:765-7
19. Ting JP, Trowsdale J. 2002. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109 Suppl:S21-S33
20. Long EO, LaVaute T, Pinet V, Jaraquemada D. 1994. Invariant chain prevents the HLA-DR-restricted presentation of a cytosolic peptide. *J. Immunol.* 153:1487-94
21. Bakke O, Dobberstein B. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63:707-16
22. Peters PJ, Raposo G, Neefjes JJ, Oorschot V, Leijendekker RL, Geuze HJ, Ploegh HL. 1995. Major histocompatibility complex class II compartments in human B lymphoblastoid cells are distinct from early endosomes. *J. Exp. Med.* 182:325-34
23. Cresswell P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84:505-7
24. Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ. 1991. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 349:669-76
25. Benaroch P, Yilla M, Raposo G, Ito K, Miwa K, Geuze HJ, Ploegh HL. 1995. How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J.* 14:37-49

26. Roche PA, Teletski CL, Stang E, Bakke O, Long EO. 1993. Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8581-5
27. Castellino F, Germain RN. 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
28. Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, Chapman HA. 1996. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4:357-66
29. Nakagawa TY, Rudensky AY. 1999. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol. Rev.* 172:121-9
30. Bonnerot C, Marks MS, Cosson P, Robertson EJ, Bikoff EK, Germain RN, Bonifacino JS. 1994. Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *EMBO J.* 13:934-44
31. Anderson MS, Miller J. 1992. Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2282-6
32. Bikoff EK, Germain RN, Robertson EJ. 1995. Allelic differences affecting invariant chain dependency of MHC class II subunit assembly. *Immunity.* 2:301-10
33. Bikoff EK, Huang L-Y, Episkopou V, van Meerwijk J, Germain RN, Robertson EJ. 1993. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J. Exp. Med.* 177:1699-712
34. Viville S, Neefjes JJ, Lotteau V, Dierich A, Lemeur M, Ploegh H, Benoist C, Mathis D. 1993. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72:635-48
35. Elliott EA, Drake JR, Amigorena S, Elsemore J, Webster P, Mellman I, Flavell RA. 1994. The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* 179:681-94
36. Romagnoli P, Germain RN. 1994. The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J. Exp. Med.* 180:1107-13

37. Pieters J, Horstmann H, Bakke O, Griffiths G, Lipp J. 1991. Intracellular transport and localization of major histocompatibility complex class II molecules and associated invariant chain. *J. Cell Biol.* 115:1213-23
38. Amigorena S, Drake JR, Webster P, Mellman I. 1994. Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 369:113-20
39. Barnes KA, Mitchell RN. 1995. Detection of functional class II-associated antigen: Role of a low density endosomal compartment in antigen processing. *J. Exp. Med.* 181:1715-27
40. Tulp A, Verwoerd D, Dobberstein B, Ploegh HL, Pieters J. 1994. Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature* 369:120-47
41. West MA, Lucocq J, Watts C. 1994. Antigen processing and class II MHC peptide-loading compartments in human B-lymphoblastoid cells. *Nature* 369:147-51
42. Romagnoli P, Layet C, Yewdell J, Bakke O, Germain RN. 1993. Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *J. Exp. Med.* 177:583-96
43. Pierre P, Denzin LK, Hammond C, Drake JR, Amigorena S, Cresswell P, Mellman I. 1996. HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. *Immunity* 4:229-39
44. Geuze HJ. 1998. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol. Today* 19:282-7
45. Turk V, Turk B, Turk D. 2001. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J.* 20:4629-33
46. Arunachalam B, Phan UT, Geuze HJ, Cresswell P. 2000. Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:745-50
47. Phan UT, Arunachalam B, Cresswell P. 2000. Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). Maturation, activity, and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 275:25907-14
48. Watts C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 15:821-50

49. Villadangos JA, Ploegh HL. 2000. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity*. 12:233-9
50. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-9
51. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215-21
52. Kim J, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. 1994. Crystallographic structure of toxic shock syndrome toxin-1 complexed with a human class II major histocompatibility molecule HLA-DR1. *Science* 266:1870-4
53. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Chi Y-I, Stauffacher C, Strominger JL, Wiley DC. 1994. Three-dimensional structure of human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 368:711-8
54. Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC. 1995. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378:457-62
55. Dessen A, Lawrence CM, Cupo S, Zaller DM, Wiley DC. 1997. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity* 7:473-81
56. Smith KJ, Pyrdol J, Gauthier L, Wiley DC, Wucherpfennig KW. 1998. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA*0101, DRB1*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J Exp. Med.* 188:1511-20
57. Siebold C, Hansen BE, Wyer JR, Harlos K, Esnouf RE, Svejgaard A, Bell JI, Strominger JL, Jones EY, Fugger L. 2004. Crystal structure of HLA-DQ0602 that protects against type 1 diabetes and confers strong susceptibility to narcolepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:1999-2004
58. Fremont DH, Hendrickson WA, Marrack P, Kappler J. 1996. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 272:1001-4
59. Fremont DH, Monnaie D, Nelson CA, Hendrickson WA, Unanue ER. 1998. Crystal structure of I-Ak in complex with a dominant epitope of lysozyme. *Immunity*. 8:305-17

60. Latek RR, Suri A, Petzold SJ, Nelson CA, Kanagawa O, Unanue ER, Fremont DH. 2000. Structural basis of peptide binding and presentation by the type I diabetes-associated MHC class II molecule of NOD mice. *Immunity*. 12:699-710
61. Corper AL, Stratmann T, Apostolopoulos V, Scott CA, Garcia KC, Kang AS, Wilson IA, Teyton L. 2000. A structural framework for deciphering the link between I-Ag7 and autoimmune diabetes. *Science* 288:505-11
62. Fremont DH, Dai S, Chiang H, Crawford F, Marrack P, Kappler J. 2002. Structural basis of cytochrome c presentation by IE(k). *J. Exp. Med.* 195:1043-52
63. Braunstein NS, Germain RN. 1987. Allele-specific control of Ia molecule surface expression and conformation: implications for a general model of Ia structure- function relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2921-5
64. Sant AJ, Braunstein NS, Germain RN. 1987. Predominant role of amino-terminal sequences in dictating efficiency of class II major histocompatibility complex $\alpha\beta$ dimer expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8065-9
65. Lechler RI, Ronchese F, Braunstein NS, Germain RN. 1986. I-A-restricted T cell antigen recognition. Analysis of the roles of A alpha and A beta using DNA-mediated gene transfer. *J. Exp. Med.* 163:678-96
66. Batalia MA, Collins EJ. 1997. Peptide binding by class I and class II MHC molecules. *Biopolymers* 43:281-302
67. Chicz RM, Urban RG, Lane WS, Gorga JC, Stern LJ, Vignali DAA, Strominger JL. 1992. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogenous in size. *Nature* 358:764-8
68. Arunachalam B, Pan M, Cresswell P. 1998. Intracellular formation and cell surface expression of a complex of an intact lysosomal protein and MHC class II molecules. *J. Immunol.* 160:5797-806
69. Deng H, Apple R, Clare-Salzler M, Trembleau S, Mathis D, Adorini L, 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.* 178:1675-80
70. Marsh SG, Bodmer JG. 1989. HLA-DR and -DQ epitopes and monoclonal antibody specificity. *Immunol. Today* 10:305-12

71. Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC. 1988. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 332:845-50
72. Stratikos E, Wiley DC, Stern LJ. 2004. Enhanced catalytic action of HLA-DM on the exchange of peptides lacking backbone hydrogen bonds between their N-terminal region and the MHC class II alpha-chain. *J. Immunol.* 172:1109-17
73. Kaufman JF, Auffray C, Korman AJ, Shackelford DA, Strominger J. The Class II Molecules of the Human and Murine Major Histocompatibility Complex. *Cell* 36, 1-13. 1984.
74. Jones PP, Murphy DB, McDevitt HO. 1981. Variable synthesis and expression of E alpha and Ae (E beta) Ia polypeptide chains in mice of different H-2 haplotypes. *Immunogenetics* 12:321-37
75. Schlauder GG, Bell MP, Beck BN, Nilson A, McKean DJ. 1985. The structure-function relationship of I-A molecules: a biochemical analysis of I-A polypeptides from mutant antigen-presenting cells and evidence of preferential association of allelic forms. *J. Immunol.* 135:1945-54
76. Germain RN, Bentley DM, Quill H. 1985. Influence of allelic polymorphism on the assembly and surface expression of class II MHC (Ia) molecules. *Cell* 43:233-42
77. Braunstein NS, Germain RN, Loney K, Berkowitz N. 1990. Structurally interdependent and independent regions of allelic polymorphism in class II MHC molecules: implications for Ia function and evolution. *J. Immunol.* 145:1635-45
78. Buerstedde JM, Pease LR, Nilson AE, Bell MP, Chase C, Buerstedde G, McKean DJ. 1988. Regulation of murine MHC class II molecule expression. Identification of A beta residues responsible for allele-specific cell surface expression. *J. Exp. Med.* 168:823-37
79. Sant AJ, Hendrix LR, Coligan JE, Maloy WL, Germain RN. 1991. Defective intracellular transport as a common mechanism limiting expression of inappropriately paired class II major histocompatibility complex $\alpha\beta$ chains. *J. Exp. Med.* 174:799-808
80. Kwok WW, Kovats S, Thurtle P, Nepom GT. 1993. HLA-DQ allelic polymorphisms constrain patterns of class II heterodimer formation. *J. Immunol.* 150:2263-72

81. Cosson P, Bonifacino JS. 1992. Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules. *Science* 258:659-62
82. Lotteau V, Sands J, Teyton L, Turmel P, Charron D, Strominger JL. 1989. Modulation of HLA class II antigen expression by transfection of sense and antisense DR alpha cDNA. *J. Exp. Med.* 169:351-6
83. Sant AJ, Germain RN. 1989. Intracellular competition for component chains determines class II MHC cell surface phenotype. *Cell* 57:797-805
84. Lotteau V, Teyton L, Burroughs D, Charron D. 1987. A novel HLA class II molecule (DR alpha-DQ beta) created by mismatched isotype pairing. *Nature* 329:339-41
85. Germain RN, Quill H. 1986. Unexpected expression of a unique mixed-isotype class II MHC molecule by transfected L-cells. *Nature* 320:72-5
86. Malissen B, Shastri N, Pierres M, Hood L. 1986. Cotransfer of the Ed alpha and Ad beta genes into L cells results in the surface expression of a functional mixed-isotype Ia molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83:3958-62
87. Spencer JS, Kubo RT. 1989. Mixed isotype class II antigen expression. A novel class II molecule is expressed on a murine B cell lymphoma. *J. Exp. Med.* 169:625-40
88. Karp DR, Teletski CL, Jaraquemada D, Maloy WL, Coligan JE, Long EO. 1990. Structural requirements for pairing of α and β chains in HLA-DR and HLA-DP molecules. *J. Exp. Med.* 171:615-28
89. Samaan A, Thibodeau J, Mahana W, Castellino F, Cazenave PA, Kindt TJ. 1999. Cellular distribution of a mixed MHC class II heterodimer between DR α and a chimeric DO β chain. *Int. Immunol.* 11:99-111
90. Sanderson F, Kleijmeer MJ, Kelly A, Verwoerd D, Tulp A, Neeffjes JJ, Geuze HJ, Trowsdale J. 1994. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* 266:1566-9
91. Liljedahl M, Kuwana T, Fung-Leung WP, Jackson M, Peterson PA, Karlsson L. 1996. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* 15:4817-24
92. Karlsson L, Surh CD, Sprent J, Peterson PA. 1991. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* 351:485-8

93. Kropshofer H, Hammerling GJ, Vogt AB. 1999. The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunol. Rev.* 172:267-78
94. Braunstein NS, Germain RN. 1986. The mouse E beta 2 gene: a class II MHC beta gene with limited intraspecies polymorphism and an unusual pattern of transcription. *EMBO J.* 5:2469-76
95. Harding CV, Roof RW, Unanue ER. 1989. Turnover of Ia-peptide complexes is facilitated in viable antigen-presenting cells: biosynthetic turnover of Ia vs. peptide exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86:4230-4
96. Mellins E, Smith L, Arp B, Cotner T, Celis E, Pious D. 1990. Defective processing and presentation of exogenous antigens in mutants with normal HLA class II genes. *Nature* 343:71-4
97. Riberdy JM, Newcomb JR, Surman MJ, Barbosa JA, Cresswell P. 1992. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360:474-7
98. Sette A, Ceman S, Kubo RT, Sakaguchi K, Appella E, Hunt DF, Davis TA, Michel H, Shabanowitz J, Rudersdorf R, Grey HM, DeMars R. 1992. Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen-processing mutant. *Science* 258:1801-4
99. Mellins E, Kempin S, Smith L, Monji T, Pious D. 1991. A gene required for class II-restricted antigen presentation maps to the major histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* 174:1607-15
100. Riberdy JM, Cresswell P. 1992. The antigen-processing mutant T2 suggest a role for MHC-linked genes in class II antigen presentation. *J. Immunol.* 148:2586-90
101. Fling SP, Arp B, Pious D. 1994. HLA-DM and -DMB genes are both required for complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* 368:554-8
102. Morris P, Shaman J, Attaya M, Amaya M, Goodman S, Bergman C, Monaco JJ, Mellins E. 1994. An essential role for the HLA-DM in antigen presentation by MHC class II major histocompatibility molecules. *Nature* 368:551-4
103. Fung-Leung WP, Surh CD, Liljedahl M, Pang J, Leturcq D, Peterson PA, Webb SR, Karlsson L. 1996. Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice. *Science* 271:1278-81

104. Miyazaki T, Wolf P, Tourne S, Waltzinger C, Dierich A, Barois N, Ploegh H, Benoist C, Mathis D. 1996. Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* 84:531-41
105. Martin WD, Hicks GG, Mendiratta SK, Leva HI, Ruley HE, Van Kaer L. 1996. *H2-M* mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection. *Cell* 84:543-50
106. Tourne S, Miyazaki T, Oxenius A, Klein L, Fehr T, Kyewski B, Benoist C, Mathis D. 1997. Selection of a broad repertoire of CD4⁺ T cells in H-2Ma^{0/0} mice. *Immunity*. 7:187-95
107. Grubin CE, Kovats S, DeRoos P, Rudensky AY. 1997. Deficient positive selection of CD4 T cells in mice displaying altered repertoires of MHC class II-bound self-peptides. *Immunity*. 7:197-208
108. Surh CD, Lee DS, Fung-Leung WP, Karlsson L, Sprent J. 1997. Thymic selection by a single MHC/peptide ligand produces a semidiverse repertoire of CD4⁺ T cells. *Immunity*. 7:209-19
109. Sant'Angelo DB, Waterbury PG, Cohen BE, Martin WD, Van Kaer L, Hayday AC, Janeway CA, Jr. 1997. The imprint of intrathymic self-peptides on the mature T cell receptor repertoire. *Immunity* 7:517-24
110. Denzin LK, Robbins NF, Carboy-Newcomb C, Cresswell P. 1994. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1:595-606
111. Schafer PH, Green JM, Malapati S, Gu L, Pierce SK. 1996. HLA-DM is present in one-fifth the amount of HLA-DR in the class II peptide-loading compartment where it associates with leupeptin-induced peptide (LIP)-HLA-DR complexes. *J. Immunol.* 157:5487-95
112. Lindstedt R, Liljedahl M, Peleraux A, Peterson PA, Karlsson L. 1995. The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif. *Immunity* 3:561-72
113. Marks MS, Roche PA, van Donselaar E, Woodruff L, Peters PJ, Bonifacino JS. 1995. A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the β chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J. Cell Biol.* 131:351-69
114. Liu SH, Marks MS, Brodsky FM. 1998. A dominant-negative clathrin mutant differentially affects trafficking of molecules with distinct sorting motifs in the class II major histocompatibility complex (MHC) pathway. *J. Cell Biol.* 140:1023-37

115. Andersson T, Patwardhan A, Emilson A, Carlsson K, Scheynius A. 1998. HLA-DM is expressed on the cell surface and colocalizes with HLA-DR and invariant chain in human Langerhans cells. *Arch. Dermatol. Res.* 290:674-80
116. Arndt SO, Vogt AB, Markovic-Plese S, Martin R, Moldenhauer G, Wolpl A, Sun Y, Schadendorf D, Hammerling GJ, Kropshofer H. 2000. Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *EMBO J.* 19:1241-51
117. Sloan VS, Cameron P, Porter G, Gammon M, Amaya M, Mellins E, Zaller DM. 1995. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 375:802-6
118. Denzin LK, Cresswell P. 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II $\alpha\beta$ dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82:155-65
119. Sherman MA, Weber DA, Jensen PE. 1995. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* 3:197-205
120. Vogt AB, Kropshofer H, Moldenhauer G, Hammerling GJ. 1996. Kinetic analysis of peptide loading onto HLA-DR molecules mediated by HLA-DM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9724-9
121. Sadegh-Nasseri S, Germain RN. 1991. A role for peptide in determining MHC class II structure. *Nature* 353:167-70
122. Stern LJ, Wiley DC. 1992. The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty $\alpha\beta$ heterodimers in the absence of antigenic peptide. *Cell* 68:465-77
123. Germain RN, Rinker Jr AG. 1993. Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes surface expression of occupied molecules. *Nature* 363:725-8
124. Denzin LK, Hammond C, Cresswell P. 1996. HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J. Exp. Med.* 184:2153-65
125. Kropshofer H, Arndt SO, Moldenhauer G, Hammerling GJ, Vogt AB. 1997. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* 6:293-302
126. Kropshofer H, Vogt AB, Moldenhauer G, Hammer J, Blum JS, Hammerling GJ. 1996. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J.* 15:6144-54

127. Kropshofer H, Vogt AB, Stern LJ, Hammerling GJ. 1995. Self-release of CLIP in peptide loading of HLA-DR molecules. *Science* 270:1357-9
128. Mosyak L, Zaller DM, Wiley DC. 1998. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* 9:377-83
129. Fremont DH, Crawford F, Marrack P, Hendrickson WA, Kappler J. 1998. Crystal structure of mouse H2-M. *Immunity* 9:385-93
130. Kropshofer H, Hammerling GJ, Vogt AB. 1997. How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: Survival of the fittest? *Immunol. Today* 18:77-82
131. Busch R, Doebele RC, Von Scheven E, Fahrni J, Mellins ED. 1998. Aberrant intermolecular disulfide bonding in a mutant HLA-DM molecule: implications for assembly, maturation, and function. *J. Immunol.* 160:734-43
132. Sanderson F, Thomas C, Neeffes J, Trowsdale J. 1996. Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo. *Immunity* 4:87-96
133. Weber DA, Dao CT, Jun J, Wigal JL, Jensen PE. 2001. Transmembrane domain-mediated colocalization of HLA-DM and HLA-DR is required for optimal HLA-DM catalytic activity. *J. Immunol.* 167:5167-74
134. Verreck FA, Fargeas CA, Hammerling GJ. 2001. Conformational alterations during biosynthesis of HLA-DR3 molecules controlled by invariant chain and HLA-DM. *Eur. J. Immunol.* 31:1029-36
135. Ullrich HJ, Doring K, Grueneberg U, Jaehnig F, Trowsdale J, Van Ham MS. 1997. Interaction between HLA-DM and HLA-DR involves regions that undergo conformational changes at lysosomal pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13163-8
136. Doebele CR, Busch R, Scott MH, Pashine A, Mellins DE. 2000. Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules. *Immunity.* 13:517-27
137. Mellins E, Cameron P, Amaya M, Goodman S, Pious D, Smith L, Arp B. 1994. A mutant human histocompatibility leukocyte antigen DR molecule associated with invariant chain peptides. *J. Exp. Med.* 179:541-9
138. Boniface JJ, Lyons DS, Wettstein DA, Allbritton NL, Davis MM. 1996. Evidence for a conformational change in a class II major histocompatibility complex molecule occurring in the same pH range where antigen binding is enhanced. *J. Exp. Med.* 183:119-26

139. Runnels HA, Moore JC, Jensen PE. 1996. A structural transition in class II major histocompatibility complex proteins at mildly acidic pH. *J. Exp. Med.* 183:127-36
140. Faubert A, Samaan A, Thibodeau J. 2002. Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM. *J. Biol. Chem.* 277:2750-5
141. Stratikos E, Mosyak L, Zaller DM, Wiley DC. 2002. Identification of the lateral interaction surfaces of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM with HLA-DR1 by formation of tethered complexes that present enhanced HLA-DM catalysis. *J. Exp. Med.* 196:173-83
142. Pashine A, Busch R, Belmares MP, Munning JN, Doebele RC, Buckingham M, Nolan GP, Mellins ED. 2003. Interaction of HLA-DR with an acidic face of HLA-DM disrupts sequence-dependent interactions with peptides. *Immunity.* 19:183-92
143. McFarland BJ, Beeson C, Sant AJ. 1999. Cutting edge: a single, essential hydrogen bond controls the stability of peptide-MHC class II complexes. *J. Immunol.* 163:3567-71
144. Weber DA, Evavold BD, Jensen PE. 1996. Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* 274:618-20
145. Sato AK, Zarutskie JA, Rushe MM, Lomakin A, Natarajan SK, Sadegh-Nasseri S, Benedek GB, Stern LJ. 2000. Determinants of the peptide-induced conformational change in the human class II major histocompatibility complex protein HLA-DR1. *J. Biol. Chem.* 275:2165-73
146. Chou CL, Sadegh-Nasseri S. 2000. HLA-DM recognizes the flexible conformation of major histocompatibility complex class II. *J. Exp. Med.* 192:1697-706
147. Karlsson L, Peterson PA. 1992. The α chain of H-2O has an Unexpected Location in the Major Histocompatibility Complex. *J. Exp. Med.* 176:477-83
148. Douek DC, Altmann DM. 1997. HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *Int. Immunol.* 9:355-64
149. Alfonso C, Karlsson L. 2000. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 18:113-42

150. Surh CD, Gao E-K, Kosaka H, Lo D, Ahn C, Murphy DB, Karlsson L, Peterson P, Sprent J, Gao EK. 1992. Two subsets of epithelial cells in the thymic medulla. *J. Exp. Med.* 176:495-505
151. Liljedahl M, Winqvist O, Surh CD, Wong P, Ngo K, Teyton L, Peterson PA, Brunmark A, Rudensky AY, Fung-Leung WP, Karlsson L. 1998. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8:233-43
152. Chen X, Laur O, Kambayashi T, Li S, Bray RA, Weber DA, Karlsson L, Jensen PE. 2002. Regulated expression of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO during antigen-dependent and antigen-independent phases of B cell development. *J. Exp. Med.* 195:1053-62
153. Glazier KS, Hake SB, Tobin HM, Chadburn A, Schattner EJ, Denzin LK. 2002. Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. *J. Exp. Med.* 195:1063-9
154. Chalouni C, Banchereau J, Vogt AB, Pascual V, Davoust J. 2003. Human germinal center B cells differ from naive and memory B cells by their aggregated MHC class II-rich compartments lacking HLA-DO. *Int. Immunol.* 15:457-66
155. Roucard C, Thomas C, Pasquier MA, Trowsdale J, Sotto JJ, Neefjes J, van Ham M. 2001. In vivo and in vitro modulation of HLA-DM and HLA-DO is induced by B lymphocyte activation. *J. Immunol.* 167:6849-58
156. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P. 2003. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res.* 63:2836-43
157. Walter W, Scheuer C, Lingnau K, Reichert TE, Schmitt E, Loos M, Maeurer MJ. 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
158. Denzin LK, Sant'Angelo DB, Hammond C, Surman MJ, Cresswell P. 1997. Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 278:106-9
159. Taxman DJ, Cressman DE, Ting JP. 2000. Identification of class II transcriptional activator-induced genes by representational difference analysis: discoordinate regulation of the DN alpha/DO beta heterodimer. *J. Immunol.* 165:1410-6

160. Nagarajan UM, Lochamy J, Chen X, Beresford GW, Nilsen R, Jensen PE, Boss JM. 2002. Class II Transactivator Is Required for Maximal Expression of HLA-DOB in B Cells. *J. Immunol.* 168:1780-6
161. Khalil H, Deshaies F, Bellemare-Pelletier A, Brunet A, Faubert A, Azar GA, Thibodeau J. 2002. Class II transactivator-induced expression of HLA-DO(beta) in HeLa cells. *Tissue Antigens* 60:372-82
162. Voliva CF, Tsang S, Peterlin BM. 1993. Mapping cis-acting defects in promoters of transcriptionally silent DQA2, DQB2, and DOB genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:3408-12
163. Hake SB, Tobin HM, Steimle V, Denzin LK. 2003. Comparison of the transcriptional regulation of classical and non-classical MHC class II genes. *Eur. J Immunol* 33:2361-71
164. Kropshofer H, Vogt AB, Thery C, Armandola EA, Li BC, Moldenhauer G, Amigorena S, Hammerling GJ. 1998. A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.* 17:2971-81
165. Van Ham SM, Tjin EPM, Lillemeier BF, Gruneberg U, Van Meijgaarden KE, Pastoors L, Verwoerd D, Tulp A, Canas B, Rahman D, Ottenhoff TH, Pappin DJ, Trowsdale J, Neefjes J. 1997. HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol* 7:950-7
166. van Lith M, van Ham M, Neefjes J. 2003. Stable expression of MHC class I heavy chain/HLA-DO complexes at the plasma membrane. *Eur. J. Immunol.* 33:1145-51
167. van Lith M, van Ham M, Griekspoor A, Tjin E, Verwoerd D, Calafat J, Janssen H, Reits E, Pastoors L, Neefjes J. 2001. Regulation of MHC class II antigen presentation by sorting of recycling HLA-DM/DO and class II within the multivesicular body. *J. Immunol.* 167:884-92
168. Brunet A, Samaan A, Deshaies F, Kindt TJ, Thibodeau J. 2000. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta. *J. Biol. Chem.* 275:37062-71
169. 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, Neefjes J. 2000. Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *J. Exp. Med.* 191:1127-36

170. Hammond C, Denzin LK, Pan M, Griffith JM, Geuze HJ, Cresswell P. 1998. The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J. Immunol.* 161:3282-91
171. Alfonso C, Liljedahl M, Winqvist O, Surh CD, Peterson PA, Fung-Leung WP, Karlsson L. 1999. The role of H2-O and HLA-DO in major histocompatibility complex class II-restricted antigen processing and presentation. *Immunol. Rev.* 172:255-66
172. Brocke P, Armandola E, Garbi N, Hammerling GJ. 2003. Downmodulation of antigen presentation by H2-O in B cell lines and primary B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 33:411-21
173. Jemmerson R, Paterson Y. 1986. Mapping epitopes on a protein antigen by the proteolysis of antigen-antibody complexes. *Science* 232:1001-4
174. Alfonso C, Williams GS, Han JO, Westberg JA, Winqvist O, Karlsson L. 2003. Analysis of H2-O influence on antigen presentation by B cells. *J. Immunol.* 171:2331-7
175. Chalouni C, Banchereau J, Vogt AB, Pascual V, Davoust J. 2003. Human germinal center B cells differ from naive and memory B cells by their aggregated MHC class II-rich compartments lacking HLA-DO. *Int. Immunol.* 15:457-66
176. Hake SB, Tobin HM, Steimle V, Denzin LK. 2003. Comparison of the transcriptional regulation of classical and non-classical MHC class II genes. *Eur. J. Immunol.* 33:2361-71
177. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell Sci.* 113 Pt 19:3365-74
178. Barabanova YA, Kang HK, Myoung J, Kang B, Bishop GA, Kim BS. 2004. Role of the major histocompatibility complex class II transmembrane region in antigen presentation and intracellular trafficking. *Immunology* 111:165-72
179. Kappes D, Strominger JL. 1988. Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 57:991-1028
180. Thibodeau J, Lavoie PM, Samaan A, Corre JP, Sékaly RP, Cazenave PA. 1998. Conserved structural features between HLA-DO β and -DR β . *Mol. Immunol.* 35:885-93

181. Cotner T, Pious D. 1995. HLA-DR beta chains enter into an aggregated complex containing GRP-78/BiP prior to their degradation by the pre-Golgi degradative pathway. *J. Biol. Chem.* 270:2379-86
182. Marks MS, Germain RN, Bonifacino JS. 1995. Transient aggregation of major histocompatibility complex class II chains during assembly in normal spleen cells. *J Biol. Chem.* 270:10475-81
183. Gao GF, Tormo J, Gerth UC, Wyer JR, McMichael AJ, Stuart DI, Bell JI, Jones EY, Jakobsen BK. 1997. Crystal structure of the complex between human CD8 $\alpha\alpha$ and HLA-A2. *Nature* 387:630-4
184. Tormo J, Natarajan K, Margulies DH, Mariuzza RA. 1999. Crystal structure of a lectin-like natural killer cell receptor bound to its MHC class I ligand. *Nature* 402:623-31
185. Burmeister WP, Gastinel LN, Simister NE, Blum ML, Bjorkman PJ. 1994. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature* 372:336-43
186. Reinherz EL, Tan K, Tang L, Kern P, Liu J, Xiong Y, Hussey RE, Smolyar A, Hare B, Zhang R, Joachimiak A, Chang HC, Wagner G, Wang J. 1999. The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science* 286:1913-21
187. Alfonso C, Williams GS, Karlsson L. 2003. H2-O influence on antigen presentation in H2-E-expressing mice. *Eur. J. Immunol.* 33:2014-21
188. Constant SL. 1999. B lymphocytes as antigen-presenting cells for CD4+ T cell priming in vivo. *J. Immunol.* 162:5695-703
189. Gapin L, Bravo dA, Casrouge A, Cabaniols JP, Kourilsky P, Kanellopoulos J. 1998. Antigen presentation by dendritic cells focuses T cell responses against immunodominant peptides: studies in the hen egg-white lysozyme (HEL) model. *J. Immunol.* 160:1555-64
190. Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. 1998. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 161:3912-8
191. Nanda NK, Sant AJ. 2000. DM determines the cryptic and immunodominant fate of T cell epitopes. *J. Exp. Med.* 192:781-8
192. Maudsley DJ, Pound JD. 1991. Modulation of MHC antigen expression by viruses and oncogenes. *Immunol. Today* 12:429-31

CHAPITRE 7 - ANNEXES

Article supplémentaire #1

Khalil, H. *, **Deshaies, F***, Bellemare-Pelletier, A., Brunet, A., Faubert, A., Azar, G.A., Thibodeau, J. (2002). Class II transactivator-induced expression of HLA-DO beta in HeLa cells. *Tissue Antigens*. 60(5):372-82.

* These authors contributed equally to this work

H. Khalil
F. Deshaies
A. Bellemare-Pelletier
A. Brunet
A. Faubert
G.A. Azar
J. Thibodeau

Class II transactivator-induced expression of HLA-DO β in HeLa cells

Key words:

CIITA; HeLa; HLA-DM; HLA-DO; MHC

Acknowledgement:

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.

Abstract: HLA-DO is an intracellular nonclassical 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 analyses showed a marked expression of DO β suggesting that HLA-DO could accumulate under the influence of CIITA in non-B cells.

Authors' affiliations:

H. Khalil,
F. Deshaies,
A. Bellemare-Pelletier,
A. Brunet,
A. Faubert,
G.A. Azar,
J. Thibodeau

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

Correspondence to:

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

MHC class II molecules are highly polymorphic proteins composed of two noncovalently 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 nonameric 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 nonclassical 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

H. Khalil and F. Deshaies contributed equally to this work.

Received 10 April 2002, revised 3 July 2002,
accepted for publication 3 July 2002

Copyright © Blackwell Munksgaard 2002
Tissue Antigens . 0001-2815

Tissue Antigens 2002 60: 372–382
Printed in Denmark . All rights reserved



nonclassical 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 prerequisite 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 would inhibit HLA-DM exclusively in early compartments of the endocytic pathway to prevent nonspecific 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 is 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 coregulated with other class II molecules as 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 who showed that the RJ2.2.5 mutant B cells express DO β mRNA even though the DR β gene was shut down. In addition, DO β or H2-O 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 nonprofessional 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.

Materials and methods

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 were obtained from Robert DeMars (University of Wisconsin, WI) (34). The Burkitt lymphoma B cell lines Raji (EBV⁺, Epstein-Barr virus, ATCC) and BJA-B (EBV⁻; (35, 36)) were obtained from Rafick Sékaly (University of Montreal). 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) were transfected by the calcium phosphate coprecipitation 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).

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

antiserum against HLA-DM β was previously described (39). Goat antimouse IgG (H + L) and goat antirabbit IgG (H + L) coupled to Alexa Fluor[®]488 were obtained from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Biotinylated goat antirabbit, biotinylated goat antimouse and peroxidase-coupled goat antimouse were from Jackson Immuno-Research (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).

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 s.c. at one-week intervals at multiple sites with 10 μ g of BSA-conjugated HLA-DO β peptide mixed with 10 μ g 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 μ M aminopterin and 0.8 μ M thymidine) (Sigma, Oakville, ON) and screened by ELISA (45). After subcloning, clone HKC5 was further characterized.

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 (NH₄)₂SO₄ precipitation at 50% saturation. Crystalline ammonium sulfate (341 g/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. The antibody was purified by immunoaffinity chromatography on protein G-sepharose.

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 for 5 min under nonreducing conditions in SDS loading buffer and analyzed on 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred to hybond ECL membranes (Amersham Pharmacia Biotech) and blotted with HKC5

overnight at 4°C with agitation. Peroxidase-coupled goat antimouse secondary antibody was used. After washings, the membrane was developed by chemiluminescence (Roche Molecular Biochemicals, Quebec, QC) on superRX fujifilms.

Flow cytometry

Cells were stained for the presence of cell surface CLIP and HLA-DR using CerCLIP.1 and L243 monoclonal antibodies, respectively. Intracellular staining was carried out 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 antimouse 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).

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.

Results

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. Using an ELISA, we determined 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) (Fig. 1A). No signal could be detected in nontransfected 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 Fig. 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 (Fig. 1C). Therefore, HKC5 was able to recognize both the denatured and folded forms of HLA-DO β .

The usefulness of HKC5 for analysing the subcellular 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 the HeLa cells analyzed by confocal microscopy (Fig. 2). On the other hand, in HeLa cells transfected with both chains of HLA-DO, HKC5 displayed a pattern that was indistinguishable from that obtained for the ER-resident chaperone calnexin (panels b, e and h). When HLA-DM was cotransfected 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 (panels f and i). These results demonstrate that HKC5 is a useful tool in monitoring the cellular localization of HLA-DO or DO/DM complexes.

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, which has 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 performed site-directed mutagenesis of the tyrosine (DR/DO β cyto Y227A) or di-leucine (DR/DO β cyto LL242–243AA) motifs (Fig. 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 Fig. 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 the part of the epitope that is recognized by HKC5.

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

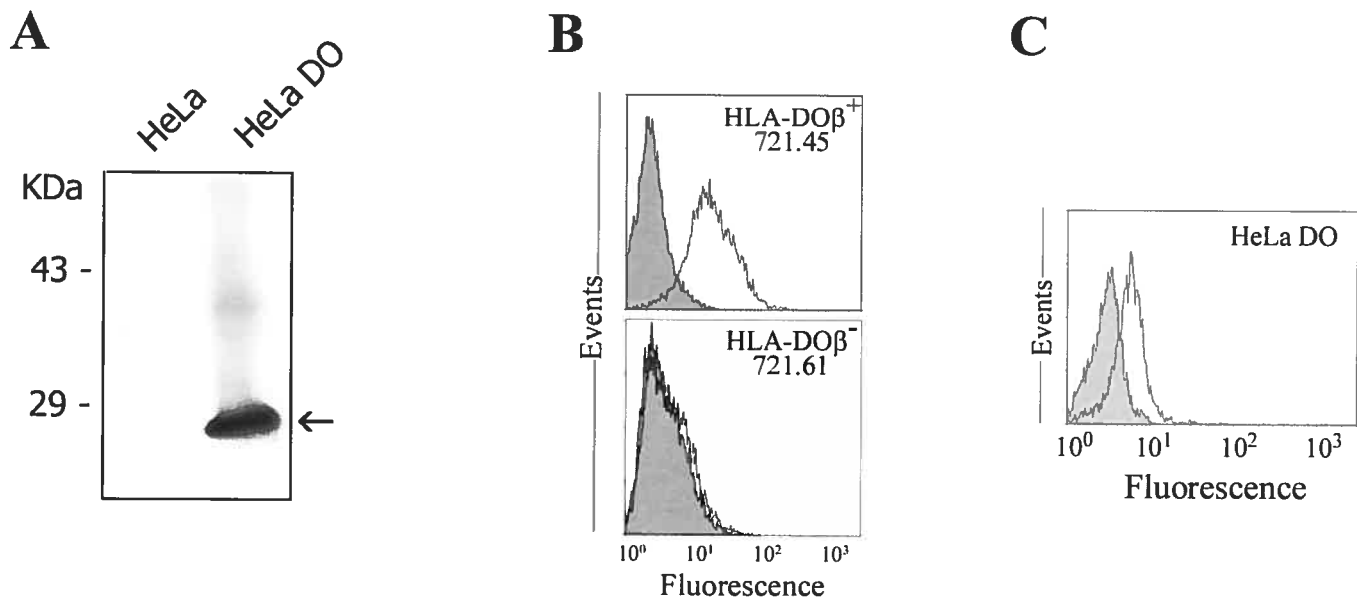


Fig. 1. Monoclonal antibody HKC5 is specific for HLA-DO β . (A) Lysates from HeLa cells transfected with HLA-DO (α and β) and HLA-DM were immunoblotted with HKC5 and compared to lysates from wild-type HeLa cells. HKC5 reacts with a 28 KDa protein corresponding to HLA-DO β in transfected cells. (B) Flow cytometry analysis was performed on permeabilized human 721.45 B cell and mutant derivative 721.61 using HKC5 and

Alexa 488-conjugated goat antimouse IgG (solid line). Filled histograms represent the control fluorescence of cells incubated with an irrelevant antibody and Alexa 488-conjugated goat antimouse 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.

and another EBV⁻ Burkitt lymphoma cell line called BJA-B (35, 36). Figure 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 (Fig. 4B) which showed a strong DO β signal in Raji cells only and a clear colocalization 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 (Fig. 4C).

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 (Fig. 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 that this DO β chain was associated to DO α (not shown) by coimmunoprecipitation and Western blot analyzes. Also, HLA-DO could be found outside the ER in vesicular structures suggesting a tight association with HLA-DM (Fig. 5B).

Human B cells and mouse splenocytes deficient in CIITA expres-

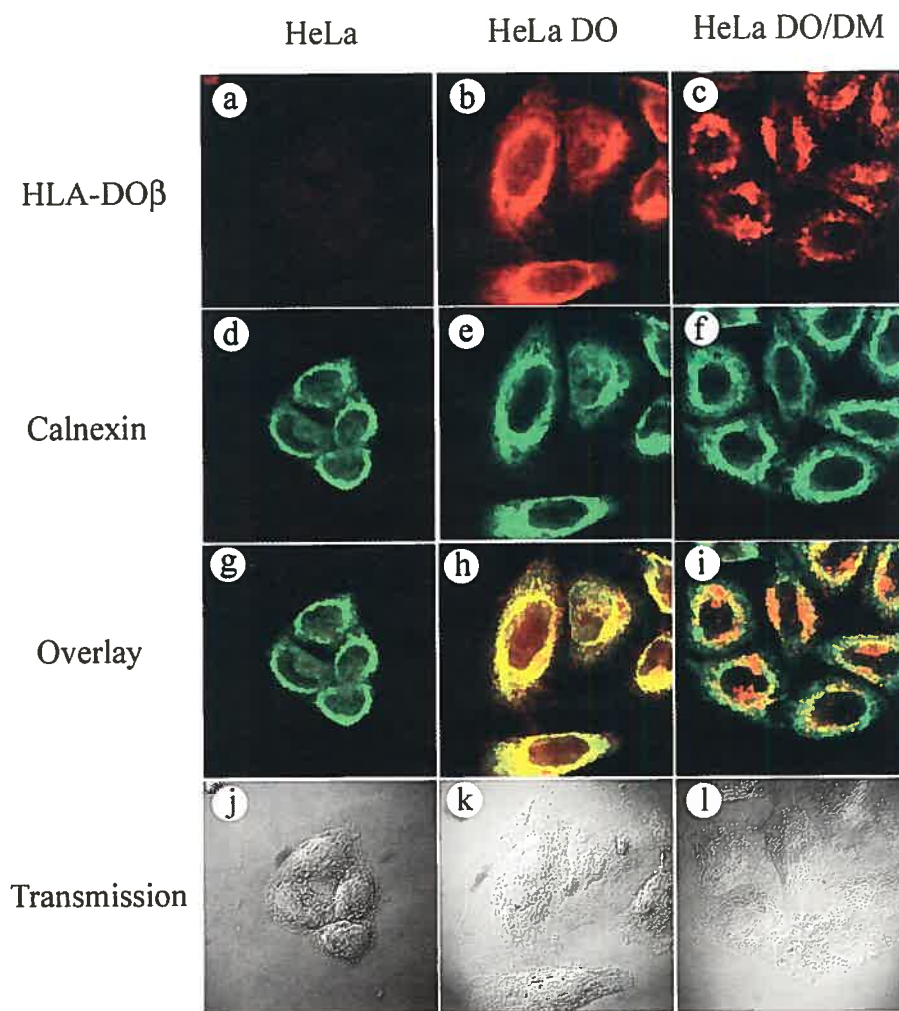


Fig. 2. HKC5 reacts with HLA-DO in the ER and in the endocytic pathway. (A) Permeabilized HeLa cells expressing HLA-DO with or without HLA-DM were simultaneously stained intracellularly for DO β with HKC5 and for the endoplasmic reticulum-resident protein Calnexin. Secondary antibody was biotinylated goat antimouse followed by Texas Red-coupled streptavidin for HKC5 and Alexa Fluor[®] 488-conjugated goat antirabbit 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). Colocalization of the two proteins is shown in g, h, and i (yellow). Immunofluorescence was monitored by confocal microscopy.

sion still express significant DO β mRNA or protein levels 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 a 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 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. We ruled out the possibility that some over-expressed, nonassociated DO β chains sequestered DM in the ER by transfecting DMY230A with or without DO β in HEK 293 cells. Mutation of this tyrosine in DM caused its cell surface accumulation (51–53) and the presence of free DO β chains did not affect its level of expression as measured by flow cytometry (data not shown). Altogether, these results strongly suggest that free DO α chains were present in HeLa CIITA cells.

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 tumors. 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 whether 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 demonstrate the expression of DO β in CIITA-transfected cells. Still, the effect of CIITA on the DO β

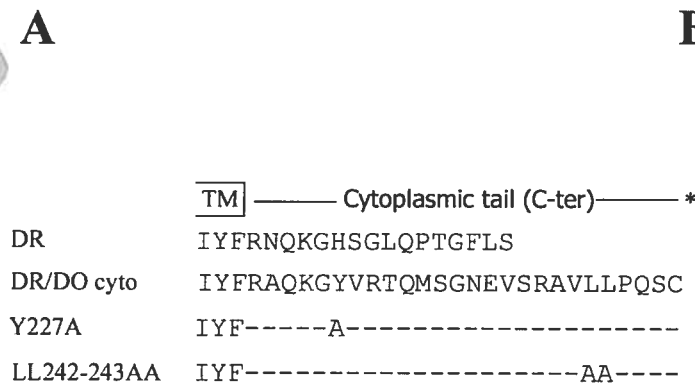
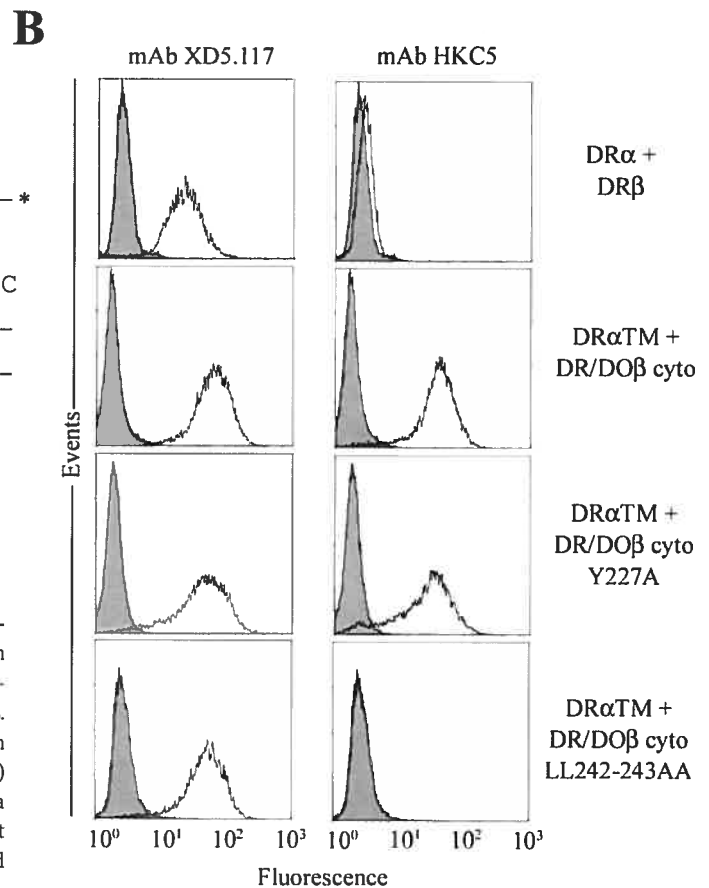


Fig. 3. HKC5 reacts with the di-leucine motif of HLA-DO β cytoplasmic tail. **(A)** Amino acid sequence of the chimeric molecules used in this experiment. The cytoplasmic tail of HLA-DO β was fused to the transmembrane (TM) region of DR β . The asterisk indicates the end of the proteins. **(B)** Permeabilized HeLa cells expressing the different β chains together with the wild-type or truncated α chain (without its cytoplasmic tail, α TM) (58) were analyzed by flow cytometry using HKC5 or XD5.117 followed by Alexa 488-conjugated goat antimouse IgG (solid line). Filled histograms represent the control fluorescence of cells incubated with an irrelevant antibody and Alexa 488-conjugated goat antimouse IgG.



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 that there was 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 could 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 (Fig. 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. (Fig. 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, 54). The nature of this transactivator regulating the DO genes is presently unknown. We hope to be able to identify such a factor in the near future using HKC5 to screen HeLa cells expressing cDNA libraries made from B cells.

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 that allow 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 (55) and to induce transcription of the CAT reporter gene in Raji cells (56). 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 to differ in the case of the DO β promoter.

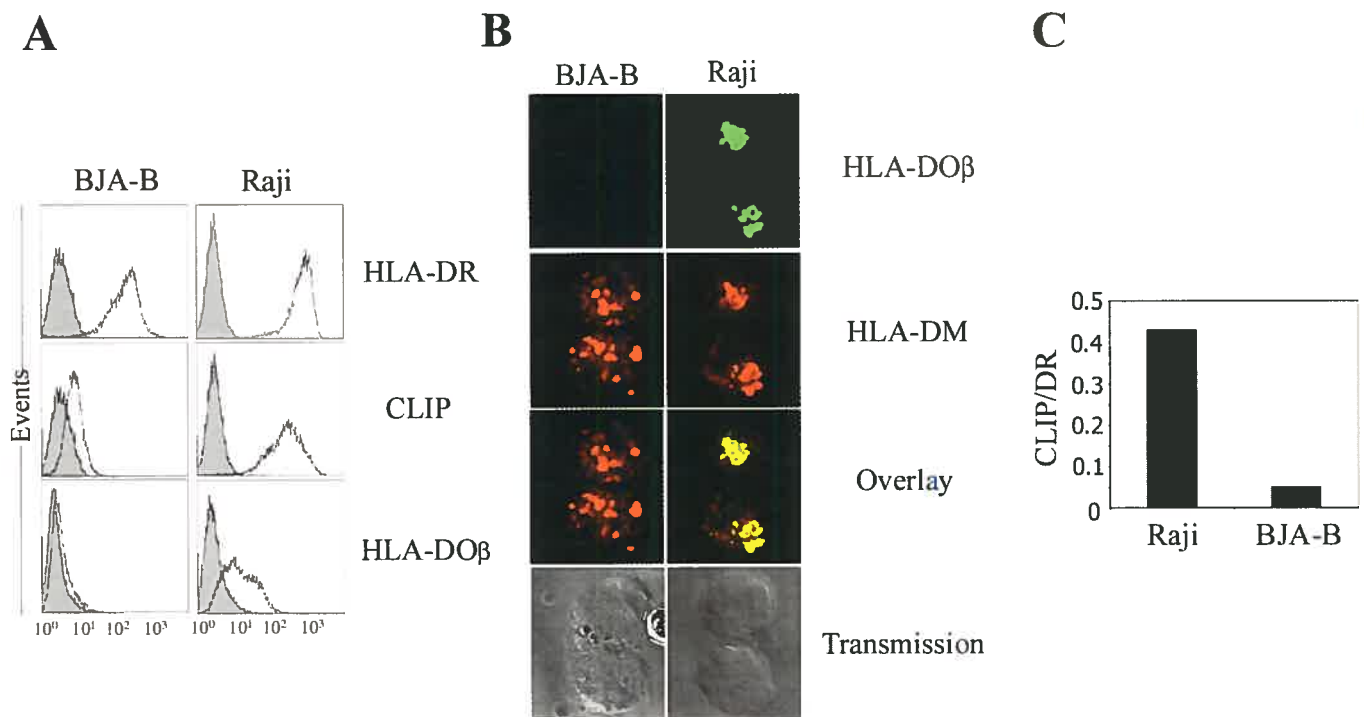


Fig. 4. Expression of HLA-DO β in B cell lines correlates with high levels of surface CLIP/class II complexes. (A) BJA-B and Raji cells were stained for cell surface HLA-DR, CLIP/class II complexes and intracellular HLA-DO β using L243, CerCLIP and HKC5, respectively. Secondary antibody was Alexa Fluor[®] 488-conjugated goat antimouse 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 antimouse 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 antimouse IgG for HKC5 and biotinylated goat antirabbit 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.

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 (55). Factors bound to the DO β S box might reduce the interaction with CIITA favoring 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 level of CIITA

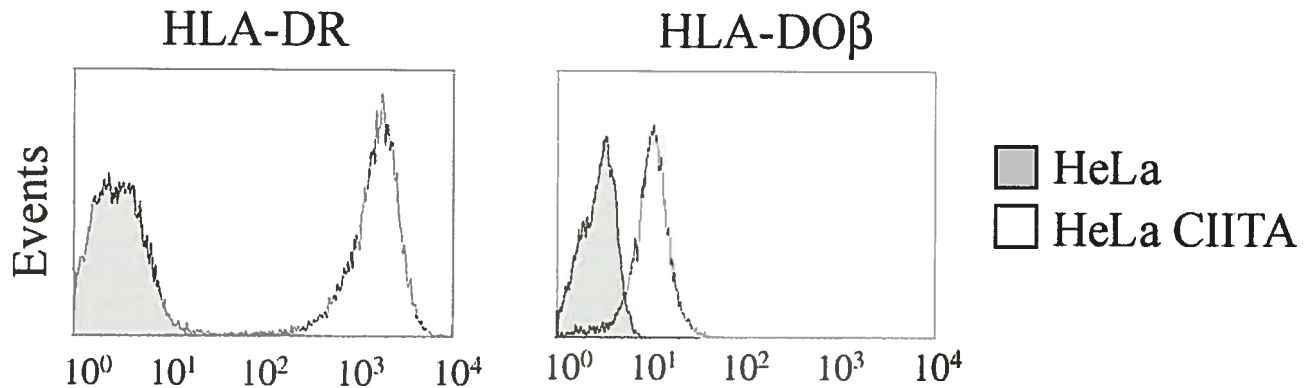
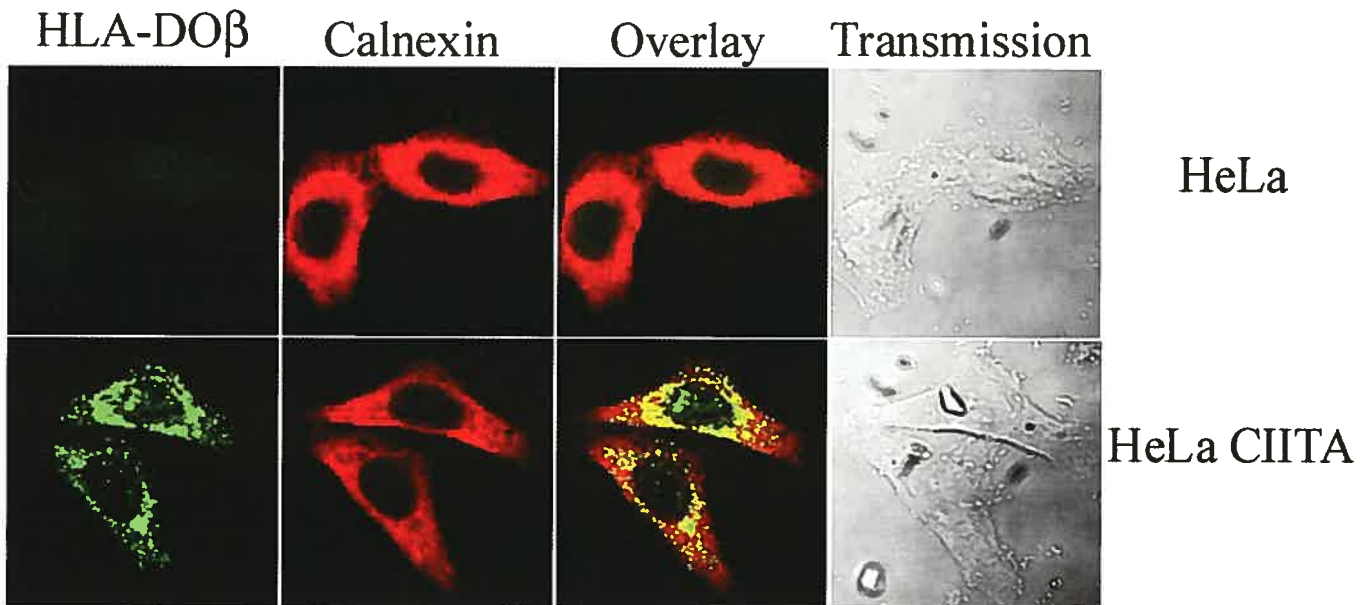
A**B**

Fig. 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. Secondary antibody was Alexa Fluor[®] 488-conjugated goat antimouse 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 antimouse IgG for HKC5 (green) and biotinylated goat antirabbit followed by Texas Red-coupled streptavidin for anticalnexin (red).

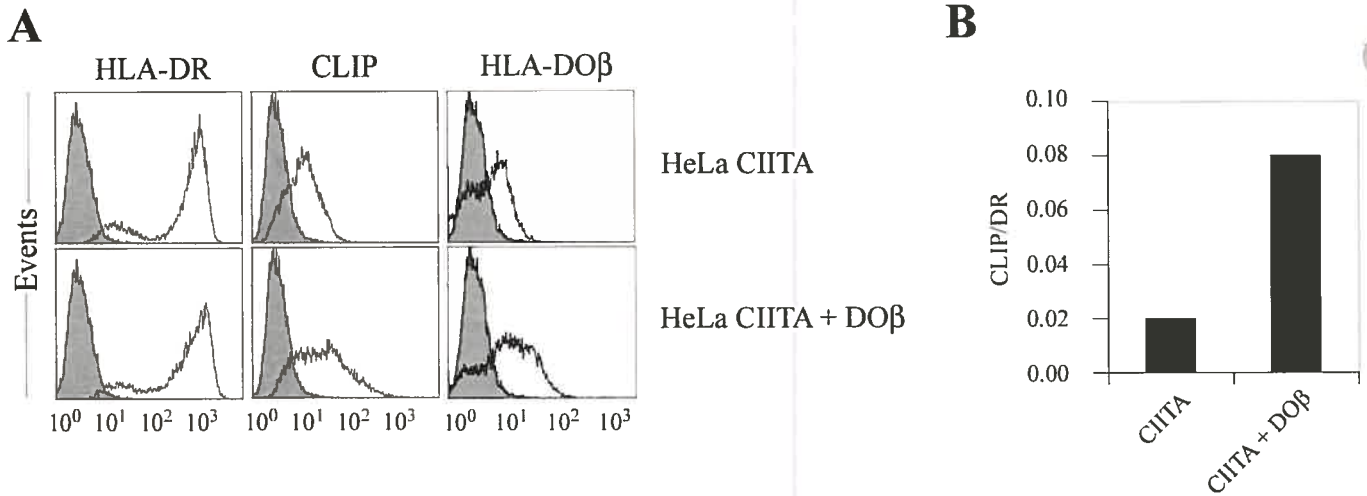


Fig. 6. Transfection of HLA-DO β in HeLa CIITA cells increases surface expression of CLIP. (A) HeLa CIITA cells were super-transfected with DO β (HeLa CIITA + DO β) and stained for surface HLA-DR (mAb L243) and CLIP/class II complexes (mAb Cer-CLIP) or for intracellular HLA-DO β (mAb HKC5). Filled histograms 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 Fig.4. The DO β mean fluorescence values for HeLa CIITA and HeLa CIITA+DO β were 8 and 21, respectively.

expression may directly influence the repertoire of class II-bound peptides. This could represent an important issue when considering

gene therapy based on de novo expression of CIITA in BLS or cancer patients (57).

References

- Cresswell P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 259-93.
- Roche PA, Marks MS, Cresswell P. Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein. *Nature* 1991; **354**: 392-4.
- Lamb CA, Cresswell P. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J Immunol* 1992; **148**: 3478-82.
- 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**: 831-46.
- 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**: 317-30.
- 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**: 474-7.
- Alfonso C, Karlsson L. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 113-42.
- Alfonso C, Liljedahl M, Winqvist O et al. The role of H2-O and HLA-DO in major histocompatibility complex class II-restricted antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 1999; **172**: 255-66.
- 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**: 267-78.
- Young JA, Trowsdale J. The HLA-DNA (DZA) gene is correctly expressed as a 1.1 kb mature mRNA transcript. *Immunogenetics* 1990; **31**: 386-8.
- Tonnelle 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**: 2839-47.
- Servenius 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**: 8759-66.
- 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**: 4817-24.
- Weber DA, Evavold BD, Jensen PE. Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* 1996; **274**: 618-20.
- Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II $\alpha\beta$ dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 1995; **82**: 155-65.

16. Roche PA. HLA-DM: an in vivo facilitator of MHC class II peptide loading. *Immunity* 1995; **3**: 259–62.
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**: 2019–24.
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**: 6144–54.
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 et al. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 1995; **375**: 802–6.
21. Douek DC, Altmann DM. HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *Int Immunol* 1997; **9**: 355–64.
22. Karlsson L, Surh CD, Sprent J, Peterson PA. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* 1991; **351**: 485–8.
23. Wake CT, Flavell RA. Multiple mechanisms regulate the expression of murine immune response genes. *Cell* 1985; **42**: 623–8.
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**: 106–9.
25. Van Ham SM, Tjin EPM, Lillemeir BF et al. HLA-DO is a negative regulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Current Biol* 1997; **7**: 950–7.
26. Liljedahl M, Winqvist O, Surh CD et al. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 1998; **8**: 233–43.
27. van Ham M, van Lith M, Griekspoor A, Neeffjes J. What to do with HLA-DO? *Immunogenetics* 2000; **51**: 765–70.
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**: 2231–7.
29. Steimle V, Siegrist C-A, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994; **265**: 106–9.
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**: 301–31.
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**: 1410–6.
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**: 817–23.
33. Nagarajan UM, Lochamy J, Chen X et al. Class II transactivator is required for maximal expression of HLA-DOB in B Cells. *J Immunol* 2002; **168**: 1780–6.
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**: 232–44.
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**: 276–84.
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**: 2501–6.
38. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973; **52**: 456–67.
39. Brunet A, Samaan A, Deshaies F, Kindt TJ, Thibodeau J. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DOBeta. *J Biol Chem* 2000; **275**: 37062–71.
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**: 1779–84.
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**: 177–88.
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 et al. A strategy for rational design of fully synthetic glycopeptide conjugate vaccines. *Infect Immun* 1997; **65**: 4918–25.
44. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; **256**: 495–7.
45. Lietzke R, Unsicker K. A statistical approach to determine monoclonality after limiting cell plating of a hybridoma clone. *J Immunol Meth* 1985; **76**: 223–8.
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 U S A* 1997; **94**: 6892–7.
47. Thibodeau J, Lavoie PM, Samaan A, Corre JP, Sekaly RP, Cazenave PA. Conserved structural features between HLA-DO β and DR β . *Mol Immunol* 1998; **35**: 885–93.
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**: 558–67.
50. Roucard C, Thomas C, Pasquier MA et al. In vivo and in vitro modulation of HLA-DM and HLA-DO is induced by B lymphocyte activation. *J Immunol* 2001; **167**: 6849–58.
51. Copier J, Kleijmeer MJ, Ponnambalam S et al. Targeting signal and subcellular compartments involved in the intracellular trafficking of HLA-DMB. *J Immunol* 1996; **157**: 1017–27.
52. Lindstedt R, Liljedahl M, Peleraux A, Peterson PA, Karlsson L. The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif. *Immunity* 1995; **3**: 561–72.

53. Marks MS, Roche PA, van Donselaar E, Woodruff L, Peters PJ, Bonifacio JS. A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the β chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J Cell Biol* 1995; **131**: 351–69.
54. 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**: 167–78.
55. Masternak K, Muhlethaler M, Ottet A et al. 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**: 1156–66.
56. Voliva CF, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. The function of the octamer-binding site in the DRA promoter. *Immunogenetics* 1995; **43**: 20–6.
57. 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**: 6663–70.
58. Robadey C, Ammerlaan W, Muller C et al. The processing routes determined by negatively charged residues in DR1-restricted T cell determinants. *J Immunol* 1997; **159**: 3238–46.

Functional Characterization of a Lysosomal Sorting Motif in the Cytoplasmic Tail of HLA-DO β *

Received for publication, June 13, 2000, and in revised form, August 10, 2000
Published, JBC Papers in Press, August 29, 2000, Doi 10.1074/jbc.M005112200

Alexandre Brunet \ddagger §, Angela Samaan \S ¶, Francis Deshaies \ddagger §, Thomas J. Kindt \S ¶,
and Jacques Thibodeau \ddagger **

From the \ddagger Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Québec H3C 3J7, Canada and the \S Laboratory of Immunogenetics, NIAID, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892

HLA-DO is an intracellular non-classical class II major histocompatibility complex molecule expressed in the endocytic pathway of B lymphocytes, which regulates the loading of antigenic peptides onto classical class II molecules such as HLA-DR. The activity of HLA-DO is mediated through its interaction with the peptide editor HLA-DM. Here, our results demonstrate that although HLA-DO is absolutely dependent on its association with DM to egress the endoplasmic reticulum, the cytoplasmic portion of its β chain encodes a functional lysosomal sorting signal. By confocal microscopy and flow cytometry analysis, we show that reporter transmembrane molecules fused to the cytoplasmic tail of HLA-DO β accumulated in Lamp-1⁺ vesicles of transfected HeLa cells. Mutagenesis of a leucine-leucine motif abrogated lysosomal accumulation and resulted in cell surface redistribution of reporter molecules. Finally, we show that mutation of the di-leucine sequence in DO β did not alter its lysosomal sorting when associated with DM molecules. Taken together, these results demonstrate that lysosomal expression of the DO-DM complex is mediated primarily by the tyrosine-based motif of HLA-DM and suggest that the DO β -encoded motif is involved in the fine-tuning of the intracellular sorting.

Major histocompatibility complex (MHC)¹ class II molecules are heterodimeric cell surface glycoproteins that present antigens to CD4⁺ T cells (1). The antigenic peptide-class II complexes are expressed on specialized antigen-presenting cells such as macrophages and B lymphocytes. Following their synthesis, the α and β subunits of the class II molecule associate in the endoplasmic reticulum (ER) together with the invariant

chain (Ii) (2). The latter folds in part through the groove of the class II molecule, stabilizing the $\alpha\beta$ heterodimer and preventing the undesirable binding of ER polypeptides (3–6). Studies using mice with inactivated Ii genes suggested that Ii is necessary for efficient exit of newly synthesized class II molecules from the ER (7, 8). However, it was later demonstrated that high levels of class II molecules reach the surface of Ii⁻ dendritic cells (9). Moreover, transfected cells express a substantial amount of class II molecules at their plasma membrane even in the absence of Ii (10). Such a phenotype probably results from the binding of endogenous peptides or polypeptides present in the ER (6, 11) and supports the notion that occupancy of the peptide-binding groove is sufficient to allow ER egress (12).

Another function of Ii is to direct efficiently MHC class II molecules to the endocytic antigen-loading compartments (13–15). Two short leucine-based sequences located in the cytoplasmic tail of Ii are responsible for trafficking through the endocytic pathway (16, 17). Similar motifs in many proteins are specifically recognized at the cell surface and trans-Golgi by elements of the sorting machinery (reviewed in Ref. 18).

Once the class II-Ii complex reaches the endosomal compartments, the invariant chain is progressively degraded by various proteinases depending on the cell type (19). A residual class II-associated Ii peptide (CLIP) must be removed from the peptide-binding groove to allow the binding of an antigen and the subsequent export of the MHC molecule to the cell surface (20, 21). Removal of the CLIP is catalyzed by the non-classical HLA-DM heterodimer (22–24). This intracellular chaperone plays three critical roles in antigen presentation as it facilitates the withdrawal of the residual CLIP peptide and stabilizes the empty class II prior to peptide loading (25–28). This loading occurs in late endosomal vesicles and, in particular, in the MHC class II-rich compartments (29). In addition, it was demonstrated that HLA-DM functions as a peptide editor limiting the repertoire of peptides bound to the class II molecule (23, 30–32). In this matter, HLA-DM favors the loading of high affinity peptides.

The activity of HLA-DM is regulated by another non-classical class II molecule called HLA-DO. Experiments using purified complexes demonstrated the ability of DO to inhibit DM-mediated CLIP release (33, 34). Furthermore, it was shown in transfected class II⁺ cells that overexpression of HLA-DO alters the peptide repertoire bound to class II molecules and caused the accumulation of CLIP. Subsequent studies demonstrated that HLA-DO regulates the activity of HLA-DM by limiting the pH range and thus probably the endosomal compartments, where HLA-DM is active (35, 36). Based on these results and on experiments using H-2O α knock-out mice, it was proposed that H-2O and HLA-DO favor presentation of antigens internalized by membrane immunoglobulins. This would

* This work was supported in part by grants from the Medical Research Council of Canada (to J. T.) and the Cancer Research Society Inc. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ These authors contributed equally to this work.

¶ Scholar of the Fonds des Chercheurs et Aides à la Recherche.

** Supported by a scholarship from the Medical Research Council of Canada. To whom correspondence should be addressed: Laboratoire d'Immunologie Moléculaire Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, CP 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada. Tel.: 514-343-6279; Fax: 514-343-5701; E-mail: [REDACTED]

¹ The abbreviations used are: MHC, major histocompatibility complex; BSA, bovine serum albumin; PBS, phosphate-buffered saline; Ii, invariant chain; ER, endoplasmic reticulum; FITC, fluorescein isothiocyanate; FACS, fluorescence-activated cell sorter; CLIP, class II-associated Ii peptide; PCR, polymerase chain reaction; RSV-LTR, Rous sarcoma virus-long terminal repeat.



be achieved by the selective inhibition of H-2M and HLA-DM in endocytic compartments rich in proteins internalized by fluid-phase endocytosis (35). However, the group of Hämmerling (37) suggested that HLA-DO is not involved in the release of CLIP but rather edits the repertoire of class II-bound peptides by chaperoning empty DR molecules through its interaction with HLA-DM. In addition to the controversial DM-related functions of HLA-DO, its role in classical class II-negative thymic epithelial cells remains elusive (38).

In HeLa cells and in murine B lymphocytes, under the experimental conditions tested so far, HLA-DO was shown to be totally dependent of its association with HLA-DM to egress the ER (39). The complex then moves through the Golgi network and traffics to endocytic compartments. Although the cytoplasmic tail of HLA-DM contains a functional tyrosine-based motif needed for its own targeting to lysosomal compartments (40–43), the sorting signals responsible for the intracellular localization of the DO-DM complex have not yet been characterized. Indeed, we have recently proposed that the HLA-DO β chain might also contain a sorting motif to the endocytic pathway (44). In these experiments, a mixed isotypic pair between the classical DR α chain and a recombinant DR/DO β chain specifically accumulated in lysosomal compartments of transfected HeLa cells. This phenotype was imparted by the DO β chain since the wild-type DR α -DR β heterodimer could only be detected at the cell surface. In the present report, we have used chimeric reporter molecules and site-directed mutagenesis to determine 1) the domain localization of the DO β -encoded lysosomal sorting motif, 2) the exact nature of this sorting signal, and 3) its role in the trafficking of the DO-DM complex.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

RSV.5neo DR α TM (45), coding for a HLA-DR α 0101 chain lacking its cytoplasmic domain, was a gift from Dr. R. P. Sékaly. RSV.3 DR β 008 (46), RSV.3 DO β (47), and RSV.3 DR $_{18}$ /DO β (44, 48) have been previously described. RSV.5gptDN1 (DO α) (49), 45.1 DO β , and 45.1 DR β 008 (47) cDNAs were obtained from Dr. E. Long.

pBS DR β 008 was generated by inserting the *Bam*HI insert of 45.1 DR β 008 into pBluescript KS⁺ vector (Stratagene). pBS DO α .9 was generated by inserting the *Sall*-*Pst*I fragment of RSV.5gptDN1 into pBluescript KS⁺ vector. This was then subcloned in RSV.5 neo by digesting with *Sall*/*Xba*I to generate RSV.5neoDO α . To construct pBS DO β , a *Bam*HI-fragment from 45.1 DO β was inserted into pBluescript KS⁺ vector. Before cloning HLA-DO α / β gene into pBudCE4 vector (Invitrogen, CA), we integrated a β -lactamase gene, which allows for selection by resistance to ampicillin, by inserting a 1-kilobase pair fragment from pBluescript KS⁺ digested with *Bsp*HI/blunt-ended into *Nhe*I/blunt-ended site of pBudCE4 (pBudCE4-A). The HLA-DO β cDNA was then cloned into pBudCE4-A by digesting pBS DO β with *Sal*I-*Xba*I. The HLA-DO α cDNA was inserted in the same vector by cutting pBS DO α .9 with *Bam*HI and cloning the fragment into the *Bgl*II site of the vector (pBudCE4-A DO α / β). The DO β cDNA in 45.1 was excised with *Bam*HI, and the 1.3-kilobase pair fragment was cloned in RSV.5neo plasmid to generate RSV.5neoDO β .

In order to generate the p305 DO β LL242-243AA, several subcloning steps were done to insert a unique *Hind*III restriction site in a 5' position of the gene. The first step consisted in subcloning a 5' portion of the RSV.5neoDO β , which contained a *Hind*III site, in the RSV.3DO β LL242-243AA vector by a *Mlu*VEcoRV digestion. From this construct, a *Hind*III fragment containing DO β LL242-243AA was then subcloned into p305 expression vector from which we had previously excised a *Xba*I stuffer to finally yield p305DO β LL242-243AA plasmid.

DO β Mutagenesis and Construction of the DR $_{18}$ /DO β Molecules

Introduction of mutations into the DO β cytoplasmic tail cDNA sequence was performed by PCR overlap extension (50). Briefly, a 5' PCR product was generated from RSV.3 DR $_{18}$ /DO β using the RSV LTR primer (5' to the coding region) and a mutagenic primer which included the desired mutation as well as a unique restriction site used to identify clones harboring the mutation (DO β Y227A Bsp E1b, 5'-CGT CCG GAC AGC TCC TTT CTG-3'; DO β T230L Pst Ib, 5'-C AGA CAT CTG CAG

CCT CAC ATA-3'; DO β LL242-243AA Xba Ib, 5'-TGA CTG AGG GGC CGC AAC AGC TCT AGA GAC-3'). The 3' PCR product was generated using the complementary mutagenic primers (DO β Y227A Bsp E1c, 5'-CAG AAA GGA GCT GTC CGG ACG-3'; DO β T230L Pst Ic, 5'-TAT GTG AGG CTG CAG ATG TCT G-3'; and DO β LL242-243AA Xba Ic, 5'-GTC TCT AGA GCT GTT GCG GCC CCT CAG TCA-3') and DR β 008 3' (5'-ACT CGA TCT TTG AGA AAC ATT-3') which hybridized to the non-coding 3' end of the cDNA. The two overlapping PCR products were mixed, and a final PCR was performed using the flanking primers. This product was subsequently subcloned into *Sac*I and *Hind*III sites of RSV.3 DO β , thereby replacing the wild-type fragment with the PCR product containing the various mutations. The nucleotide sequence was confirmed by DNA sequencing using T7 polymerase (Amersham Pharmacia Biotech) before the mutations were introduced into RSV.3 DR $_{18}$ /DO β (RSV.3 DR $_{18}$ /DO β T230L, RSV.3 DR $_{18}$ /DO β Y227A, RSV.3 DR $_{18}$ /DO β LL242-243AA) by replacing the *Eco*RV-*Hind*III fragment with the equivalent fragment from mutated DO β cDNA in RSV.3 described above. Underlined nucleotides in primer sequences correspond to mutations introduced in the PCR products.

DR/DO β cyto and DR/DM β cyto Reporter Molecules

The cytoplasmic tail of HLA-DR β was replaced by that of either HLA-DO β or HLA-DM β . To construct RSV.3 DR/DO β cyto chimeric reporter molecule, we used the PCR overlap extension method. A first fragment was amplified from RSV.3 DR β 008 using the RSV-LTR primer and a mutagenic primer overlapping the end of the DR β transmembrane and the N-terminal region of the HLA-DO β cytoplasmic tail (oligonucleotide DR β /DO β Cyto222 Bss HIIB, 5'-ATA TCC TTT CTG CGC GCG GAA GTA GAT GAA C-3'). A second reaction was made on RSV.3 DR $_{18}$ /DO β using a complementary fusion primer (DR β /DO β Cyto222 Bss HIIC, 5'-G TTC ATC TAC TTC CGC GCG CAG AAA GGA TAT-3') and the DR β 008 3' primer. Following the overlap reaction, the PCR product was subcloned into *Stu*I and *Hind*III sites of RSV.3 DR β 008. In order to introduce mutations in the cytoplasmic tail of the chimeric molecule, we used a similar strategy to the one described above but used RSV.3 DR $_{18}$ /DO β T230L and RSV.3 DR $_{18}$ /DO β LL242-243AA plasmids as templates for the amplification of the DO β cytoplasmic regions. Briefly, the DR β portion was amplified from pBS DR β 008 with the reverse primer and DR β /DO β Cyto222 Bss HIIB primer which makes the junction between DR β and DO β cytoplasmic regions. The mutated DO β cytoplasmic region was amplified from the RSV.3 DR $_{18}$ /DO β mutant with complementary fusion primer DR β /DO β Cyto222 Bss HIIC and the DR β 008 3' primer. The product of the overlapping reaction was digested with *Sty*I to generate a fragment containing the mutated DR/DO β cyto fusion region and subcloned into *Sty*I-digested pBS DR β 008 to replace the wild-type sequence. The resulting construction was sequenced, excised with *Bam*HI, and subcloned into the SR α vector (51) which allows for selection by resistance to puromycin (puroSR α was kindly provided by Dr. François Denis). To generate SR α puro DR/DO β cytoY227A, a different strategy was used. A first PCR product was made from RSV.3 DR $_{18}$ /DO β using the RSV-LTR primer and the mutagenic primer (DO β Y227A Bsp E1b, 5'-CGT CCG GAC AGC TCC TTT CTG-3'). The second PCR product was done using the complementary mutagenic primer (DO β Y227A Bsp E1c, 5'-CAG AAA GGA GCT GTC CGG ACG-3') and DR β 008 3'. The overlapping PCR product was subcloned into *Sty*I of pBS DR β 008 to replace the wild-type sequence. The resulting construct was sequenced, excised with *Bam*HI, and cloned into the SR α vector as above. In order to generate the triple mutant DR/DO β cytoLL242-243AA/T230L, we performed two successive overlap PCRs. The first overlap PCR was done as described above to generate a DR/DO β cytoLL242-243AA PCR fragment. By using the latter PCR product as a template, we subsequently introduced the third mutation at position T230L. The 5' overlap fragment was amplified with the reverse primer and the DO β T230L Pst Ib primer. The 3' fragment was obtained using DO β T230L Pst Ic primer and the universal primer. Following the overlap reaction, the PCR product was subcloned into *Sty*I of pBS DR β 008 to replace the wild-type sequence. The resulting construct was sequenced, excised with *Bam*HI, and cloned into the SR α vector (SR α puro DR/DO β cytoAA/T230L).

In order to make a fusion between the DR β and DM β cytoplasmic tails, we first cloned the HLA-DM β cDNA from Raji cells by PCR. Total mRNA was extracted using TRIZOL Reagent (Life Technologies, Inc.), and 10 μ g was used for cDNA synthesis in the presence of the DM β 5'*Sal*I (5'-CTG GAA GAG CTG GTC GAC GGG ACT G-3') and the DM β 3'*Eco*RI (5'-GAA GTT GTA GAA TTC TGC CTC TAG-3') oligonucleotides. The first strand cDNA was made using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies, Inc.) and *Taq*

polymerase at 42 °C for 15 min in *Taq* polymerase buffer (BIO/CAN, Canada). Double-stranded cDNA was then amplified by PCR for 20 cycles, digested with *Sa*II-*Eco*RI, and cloned in pBluescript KS⁺ (pBS 1-DM β .1). The complete DNA coding sequence was verified by sequencing, and the predicted amino acids sequence corresponds to the published sequence (52).

In order to mutate tyrosine 230 in the DM β cytoplasmic region, a first PCR was performed on pBS 1-DM β .1 using the reverse primer and a mutagenic primer (DM β Y230A*Eco*47IIIb, 5'-AGG AAG AGG AGT AGC GCT AGA GTG GCC AGC-3'). A second fragment was amplified from pBS 1-DM β .1 using a complementary mutagenic primer (DM β Y230A*Eco*47IIIc, 5'-GCT GGC CAC TCT AGC GCT ACT CCT CTT CCT-3') and the universal primer. The two overlapping PCR products were mixed, and a final PCR was completed using the flanking primers. This PCR product was subsequently digested with *Sac*I and *Hind*III, cloned into pBS 1-DM β .1, and sequenced (pBSDM β Y230A).

Fusion of the DM β cytoplasmic tail to the DR β transmembrane domain was performed by PCR. A first fragment was amplified from pBS DR β 008 using the reverse primer and a fusion primer (DR β /DM β cyto, 5'-GA GTG GCC AGC TCT GAA GTA GAT GAA CAG-3'), which makes the junction between the DR β and DM β cytoplasmic regions. The DM β cytoplasmic region was amplified from pBS 1-DM β .1 with a complementary fusion primer (DR β /DM β cyto, 5'-CTG TTC ATC TAC TTC AGA GCT GGC CAC TC-3') and the universal primer. The overlap product was digested with *Sty*I-*Xba*I to generate a fragment containing the DR/DM β cyto fusion region and subcloned into pBS DR β 008. The resulting cDNA was sequenced, excised with *Bam*HI, and cloned into the *Bam*HI site of SR α puro vector (SR α puro DR/DM β cyto). In order to generate a DM β cytoplasmic tail mutated at position Y230A and fused to the DR β molecule, we used a similar strategy to the one described above but using pBS DM β Y230A as template (instead of wild-type pBS 1-DM β .1) for the amplification of the DM β cytoplasmic region.

Antibodies

L243 monoclonal antibody (IgG_{2a}) binds a specific DR α conformational determinant (53). Coupling to biotin using biotin-7-NHS or to FITC using FLUOS was performed as suggested by the manufacturer (Roche Molecular Biochemicals). The anti-Lamp-1 (CD107a) monoclonal antibody H4A3 (IgG₁, κ) reacts with the heavy glycosylated 110-kDa lysosomal-associated membrane protein (Developmental Studies Hybridoma Bank, NICHD, University of Iowa, IA). XD5.117 is an anti-DR β (IgG₁) monoclonal antibody (54). DA6.147 monoclonal antibody (IgG₁) is directed at the cytoplasmic tail of the DR α chain (55). The anti-DO β serum was produced in C₃H mice (H-2^d) by repeated intraperitoneal injections of DAP fibroblasts transfected with DR α and DR18/DO β cDNA (48). Rabbit antisera were raised against keyhole limpet hemocyanin conjugated to peptides corresponding to the cytoplasmic tail of HLA-DO α (CMGTYVSSVPR) or HLA-DM β (CRAGHSSYTPLPG-SNYSEGWHIS).

Cells Lines and Transfections

HeLa DR1 (DR α + DR β 0101) and HeLa DR α TM +DR β cells were kindly provided by Dr. R. P. Sékaly. HeLa DR α +DR β /DO β and HeLa DR α TM + DR β /DO β have been described previously (44). HeLa DM.5 is a clone from HeLa DM⁺ cells (a gift from Dr. R.P. Sékaly) obtained after transfection of the DM α and DM β cDNAs (22). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% fetal bovine serum (Wisent, St.-Bruno, Quebec, Canada), and appropriate selective agents (see below). HeLa cells were co-transfected by the calcium phosphate precipitation method as described (57) using 2 μ g of truncated DR α cDNA (DR α TM) along with 10 μ g of the different β chain chimeras. Independently, duplicate transfections were done using Eugene6 (Roche Molecular Biochemicals). Selective agents were added to a final concentration of 500 μ g/ml G-418 (Life Technologies, Inc.), 400 μ g/ml puromycin (Sigma), 50 units/ml hygromycin (Cederlane Laboratories, Ontario, Canada) or 100 μ g/ml Zeocin[®] (Cayla, Toulouse, France). Cells expressing the desired class II molecules were sorted using magnetic beads (Dyna Inc.) coated with L243 monoclonal antibody, except for HeLa DR/DM β cyto which was cloned by limiting dilutions, and for the HeLa DR α TM+DR β , HeLa DR/DO β cyto T230L, HeLa DR/DO β cyto AA/T230L, HeLa DM.5/DO α +DO β , HeLa DM.5/DO α +DO β AA cells which represent unsorted populations. The nature of the different reporter molecules expressed in transfected cells was confirmed by Western blot using antibodies specific for the different cytoplasmic tails (data not shown).

Flow Cytometry Analysis

Cell Surface Staining—Cells were harvested using trypsin, washed and incubated with FITC-conjugated L243 antibody or L243-bio in complete medium. After 45 min at 4 °C, cells were washed twice in PBS, and L243-bio-stained cells were incubated for another 45 min at 4 °C with phycoerythrin-conjugated streptavidin (SA-PE) in PBS. Cells were washed twice in PBS and analyzed by flow cytometry on a FACS[®] caliber (Becton Dickinson). As negative control, cells were stained using only FITC-conjugated goat anti-mouse antibody (Cederlane, Canada) or SA-PE (Coulter, Ontario, Canada).

Intracellular Staining—Cells were harvested using trypsin, rinsed in PBS, and fixed in 4% formaldehyde for 20 min at room temperature. After two washings in PBS, cells were treated with 50 mM NH₄Cl for 15 min in 0.05% saponin (Sigma) in PBS containing 1% BSA (Bioshop, Canada). Intracellular staining was performed using L243-FITC. After 30 min at room temperature, cells were washed twice, fixed in 1% formaldehyde, and analyzed by flow cytometry. As negative control, untransfected HeLa cells were stained under the same conditions. In order to analyze by flow cytometry the total (surface and intracellular) versus surface expression of the various class II molecules, the profiles obtained for DR1 were first precisely superimposed, and the other samples of transfected cells were acquired under the same exact settings. A shift between the two curves for a given reporter molecule indicates a cellular redistribution. When unsorted populations were analyzed, the peaks of negative cells were used to align the staining profiles and define the settings.

Fluorescence Microscopy

Cells were plated on coverslips in 24-well plates and cultivated for 3 days before intracellular staining. The coverslips were rinsed in PBS and cells were cold-fixed in pre-cooled (-80 °C) methanol/acetone (80:20%, v/v) for 20 min at -20 °C. Subsequent manipulations were done at room temperature. After four washings of 10 min in PBS, the coverslips were immersed in blocking solution (PBS containing 0.2% BSA and 0.2% gelatin) for 10 min. Intracellular staining was performed by using L243-bio- and Lamp-1-specific antibodies. After 1 h, cells were washed twice in PBS, 1% BSA buffer and incubated for 1 h with Texas Red-coupled streptavidin (Amersham Pharmacia Biotech) and anti-mouse IgG₁ coupled to fluorescein (PharMingen, San Diego, CA). Cells were washed twice, and the coverslips were mounted using Gelvatol (polyvinyl alcohol, a gift from Dr. M. Desjardins).

When stained with mouse DO β - and/or rabbit DM-specific antibodies, cells were washed twice in PBS, 1% BSA buffer and incubated at room temperature for another 20 min with a biotinylated goat anti-mouse antibody and/or FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody (Bio/Can Scientific, Ontario, Canada). When necessary, cells were washed twice and incubated with Texas Red-coupled streptavidin (Amersham Pharmacia Biotech) for 20 min.

Cells were then analyzed by fluorescence microscopy on a Zeiss axioscope microscope (Carl Zeiss, Germany). Photographs were taken with a Zeiss microscope camera MC 100 on Kodak elite chrome 400 film. Confocal laser microscopy was performed on a Zeiss LSM 410 system equipped with a PLAN-APOCHROMAT 63 \times oil immersion lens and a Ar/Kr laser.

Immunoprecipitations and Western Blotting

Cells (1.2 \times 10⁷) were trypsinized, washed in PBS and lysed into Triton X-100 1% as described previously (58). After centrifugation, supernatants were harvested and incubated with 20 μ l (50% beads) of CL-6B Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) for 1 h at 4 °C with agitation. Cell lysates were transferred into a new microtube containing 20 μ l (50% beads) of protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) coupled to HLA-DO β antibody. Samples were agitated overnight at 4 °C. Beads were centrifuged, washed four times with lysate buffer, and resuspended in Laemmli buffer. Samples were boiled and loaded on 10% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred to Hybond ECL membranes (Amersham Pharmacia Biotech) and blotted with the rabbit anti-DO α serum overnight at 4 °C with agitation. Secondary antibody (peroxidase-coupled goat anti-rabbit; BIO/CAN Scientific, Ontario, Canada) was used at 1:1000 dilution for 2 h at room temperature. After washings, the membrane was developed by chemiluminescence (Roche Molecular Biochemicals) on Kodak XAR-5 films.

RESULTS

The Cytoplasmic Tail of HLA-DO β Encodes a Lysosomal Sorting Signal—We recently described the lysosomal and cell

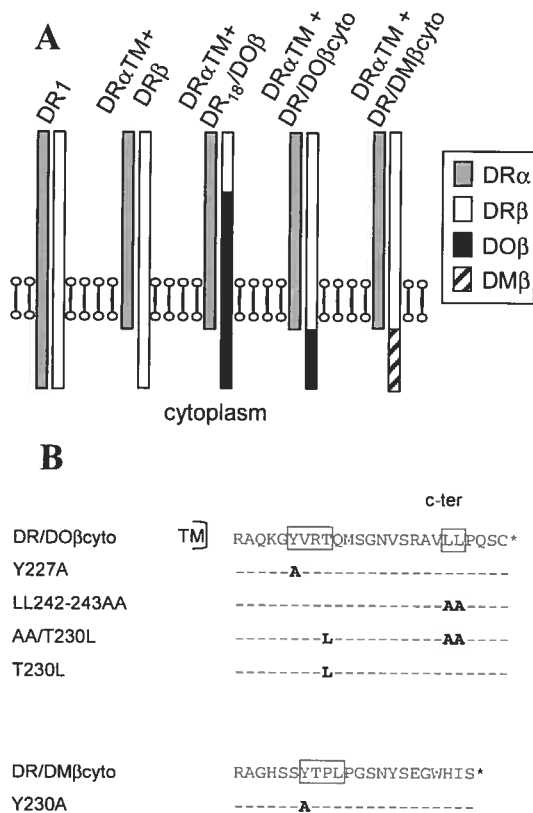


FIG. 1. Chimeric molecules and mutants. A, schematic representation of the different molecules used in this study. These reporter molecules consist of heterodimers between different α and β chains. Cytoplasmic domain truncations and recombinant molecules are described under "Materials and Methods." B, amino acid sequence of the chimeric molecules and derived mutants. The asterisk indicates the end of the protein. The first amino acid in DO β corresponds to the first amino acid of the cytoplasmic tail. Dashed lines represent identity in the amino acid sequence. Squares represent a potential or documented sorting motif. Bold amino acids identify introduced mutations.

surface localization of a mixed isotopic pair between DR α and a chimeric recombinant DR₁₈/DO β chain (44, 48). As wild-type DR α /DR β (DR1) molecules did not accumulate in intracellular compartments under the same experimental conditions, we concluded that a lysosomal sorting motif was encoded in the HLA-DO β chain. In an effort to localize such a signal and to evaluate the relative importance of the cytoplasmic tail in lysosomal transport as compared with the other domains of HLA-DO, we have designed a new reporter molecule where the cytoplasmic tail of the DR β chain was replaced by that of DO β (DR/DO β cyto) (Fig. 1). To eliminate any possible contribution from the cytoplasmic tail of the DR α chain partner, HeLa cells were stably transfected with the DR/DO β cyto construction together with a HLA-DR α chain cDNA encoding a stop codon immediately after the transmembrane domain (DR α TM). Since this chimeric heterodimer can be detected at the plasma membrane, cells were incubated with the DR α chain-specific L243 antibody and sorted using magnetic beads. Surface expression was compared with the wild-type DR β or DR₁₈/DO β -expressing HeLa cells (Fig. 2) (44). The structural integrity of the DR/DO β cyto reporter molecule was confirmed by its ability to bind superantigens and various DR-specific antibodies (data not shown).

The intracellular expression pattern of expression of the DR/DO β cyto molecule was analyzed by confocal microscopy using L243. This monoclonal antibody recognizes a conformational epitope on the DR α chain apparent only upon association with the β chain and maturation through the Golgi apparatus

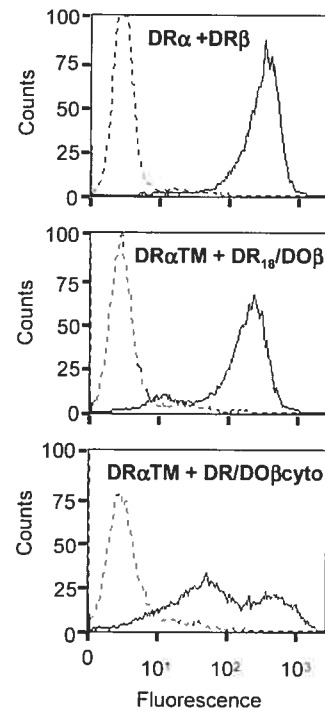


FIG. 2. Cell surface expression of the class II chimeric molecules in transfected HeLa cells. Flow cytometry analysis was performed using FITC-labeled DR α chain-specific L243 antibody (solid line). Dotted lines represent the control fluorescence of cells incubated with a FITC-conjugated goat anti-mouse serum.

(3). Fig. 3A shows that the class II staining was characterized by the presence of large, well defined perinuclear vesicles reminiscent of endosomal/lysosomal compartments. The endocytic nature of these vesicles was confirmed using a Lamp-1-specific monoclonal antibody (H4A3) as described (Fig. 3B) (44). Fig. 3C shows a perfect co-localization between the Lamp⁺ and class II⁺ vesicles, as was reported previously for cells expressing the mixed isotopic pair between DR α TM and DR₁₈/DO β (Fig. 3, D-F) (44). The concomitant cell surface expression and intracellular sorting of these molecules is reminiscent of the Ii expression pattern in B lymphocytes (see "Discussion"). On the other hand, DR1-transfected HeLa cells displayed the highest level of surface expression as determined by flow cytometry (Fig. 2) but failed to show strong intracellular accumulation (Fig. 3G). As described previously by other groups (14, 44, 59, 60), the intracellular class II staining in Ii⁻ HeLa cells was rather diffuse (Fig. 3G) with, occasionally, a few cells showing small faint vesicles. No co-localization of DR1 and Lamp-1 was detected by confocal microscopy under the exact same settings used above for the analysis of reporter molecules (Fig. 3, H and I). Moreover, it is interesting to note the absence of enlarged, swelled Lamp-1⁺ lysosomal compartments in cells expressing the wild-type DR1 molecule as compared with those containing the DO β cytoplasmic tail (Fig. 3, H and E). This important observation was consistent through all the independent transfections generated and supports the conclusions that 1) the wild-type DR1 does not accumulate in large amounts in lysosomes and 2) the DO β tail is responsible for the redistribution and accumulation of the reporter molecules to the endocytic pathway, affecting the morphology of the compartments.

Taken together these results show that the cytoplasmic tail of HLA-DO β is responsible and sufficient for the efficient targeting of these reporter molecules to Lamp⁺ lysosomal compartments. This was confirmed by the diffuse staining and the lack of vesicular accumulation of a mixed isotopic heterodimer between an intact DR α chain and a truncated chimeric DR₁₈/

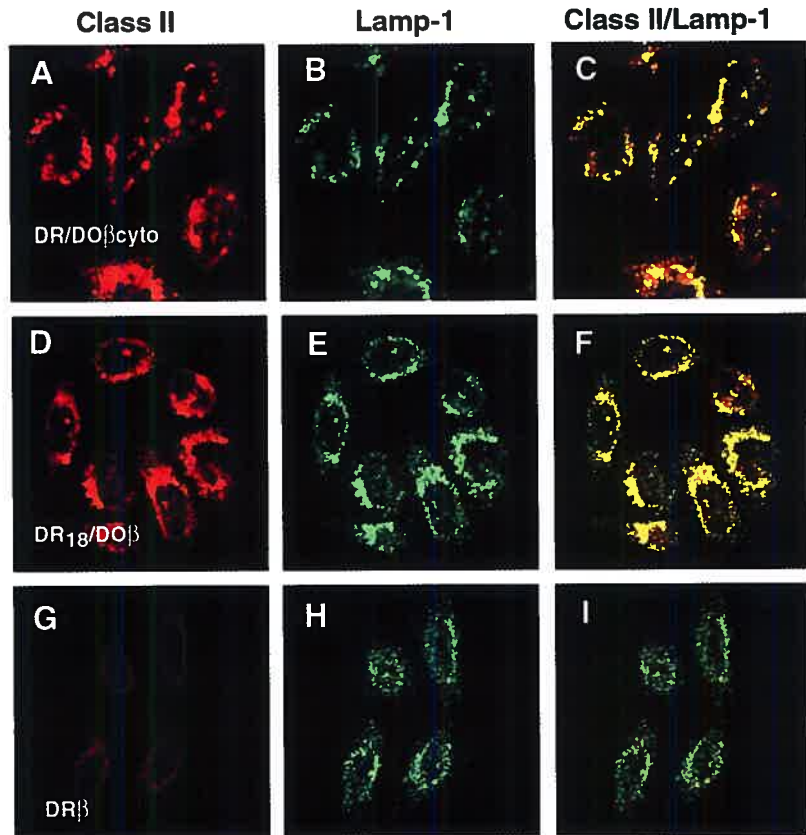


FIG. 3. The cytoplasmic tail of HLA-DO β is responsible for the lysosomal localization of reporter molecules. Permeabilized cells expressing the DR/DO β cyto (A–C) or the DR₁₈/DO β (D–F) molecules paired with the truncated DR α chain (DR α TM) devoid of its cytoplasmic tail were stained intracellularly to analyze lysosomal sorting. A, D, and G show staining with the class II-specific L243 antibody (red), and B, E, and H highlight the lysosomal staining using the H4A3 antibody specific for Lamp-1 (green). Co-localization of the two antibodies is shown in C, F, and I (yellow). Control cells express wild-type DR α +DR β (G–I). Immunofluorescence was monitored by confocal microscopy.

DO β chain devoid of its DO β cytoplasmic tail (data not shown).

Tyrosine 227 in HLA-DO β Is Not Involved in Lysosomal Sorting—The cytoplasmic tail of the DO β chain contains two putative sorting signals that have been shown in other molecules to mediate the intracellular targeting to various cellular compartments (Fig. 1B). The first signal is an imperfect tyrosine-based GYVRT motif reminiscent of the GYXXL (where *X* is any amino acid) motif found, for example, in LgpA protein (reviewed in Ref. 61). It has been suggested that the glycine preceding the tyrosine residue might mediate the direct sorting of proteins from the trans-Golgi network to the endocytic pathway (62). Although in HLA-DO β a polar threonine is found instead of the typical hydrophobic or aromatic residues at the end of the putative sequence, some reports have suggested that the GY alone is sufficient to mediate intracellular sorting events (61). The second signal is a leucine-leucine motif analogous to those found in Ii and that mediate the transport of associated class II molecules to the endocytic pathway (14, 16, 63). It is not known which of these two signals in the mixed pairs is responsible for their lysosomal distribution.

To dissect further the intracellular signals of the DO β cytoplasmic tail, we next introduced point mutations in the cDNA sequence coding for these putative motifs. First, the potentially critical tyrosine residue in the GYVRT sequence was changed to an alanine in both the DR/DO β cyto and the DR₁₈/DO β chains (Fig. 1B). HeLa cells stably transfected with these DR/DO β cytoY227A or DR₁₈/DO β Y227A cDNAs together with DR α TM were sorted on magnetic beads, and flow cytometry analysis confirmed high levels of surface expression (Fig. 4, A and C). The confocal microscopy analysis using class II- and Lamp-specific antibodies showed a perfect co-localization between the two markers for both Y227A reporter molecules, containing either the cytoplasmic tail (Fig. 5, A–C) or the almost entire DO β chain (Fig. 5, D–F). This phenotype was similar to that of DR/DO β cyto-expressing cells suggesting that

tyrosine 227 is not involved in lysosomal targeting or the generation of enlarged vesicles.

The Cytoplasmic Tail of HLA-DO Encodes a Functional LL Signal—We then examined the importance of the di-leucine motif in the lysosomal sorting. The DR/DO β cytoLL242–243AA cDNA (Fig. 1B) was co-transfected with DR α TM, and the distribution of this class II molecule was monitored by flow cytometry (Fig. 4B) and immunofluorescence (Fig. 5, G–I). This molecule was expressed at high levels at the cell surface, but in contrast to the wild-type DR/DO β cyto or DR/DO β cytoY227A phenotypes observed above (Fig. 3A and 5A), confocal microscopy revealed a diffuse intracellular labeling and the absence of vesicular accumulation (Fig. 5G). The pattern was similar to the one observed using the DR1-transfected HeLa cells (Fig. 3G). There was a clear loss of the enlarged perinuclear class II⁺ vesicles such as those found in DR/DO β cyto cells. In addition, the Lamp-1 pattern is made principally of small discrete vesicles scattered all over the cytoplasm. This pattern is reminiscent of the signal obtained using DR1-expressing cells (Fig. 3H (44, 60)) and further demonstrates that the di-leucine motif is functional and necessary for lysosomal sorting of the reporter molecule.

The critical role of the di-leucine motif was confirmed in independent experiments using the mutated mixed pair DR α TM+DR₁₈/DO β . The di-leucine mutation (DR₁₈/DO β LL242–243AA) (Fig. 4D) inhibited lysosomal accumulation of this reporter molecule as judged by the diffuse intracellular staining and the lack of co-localization with the Lamp-1 molecule (Fig. 5, J–L). Altogether, these results clearly establish that the cytoplasmic tail of HLA-DO β contains a functional di-leucine lysosomal sorting motif.

Mutation-induced Cell Surface Redistribution—Lack of lysosomal sorting caused by mutation of the leucine-leucine motif must result in cell surface accumulation, and flow cytometry was used to evaluate this redistribution within a cell popula-

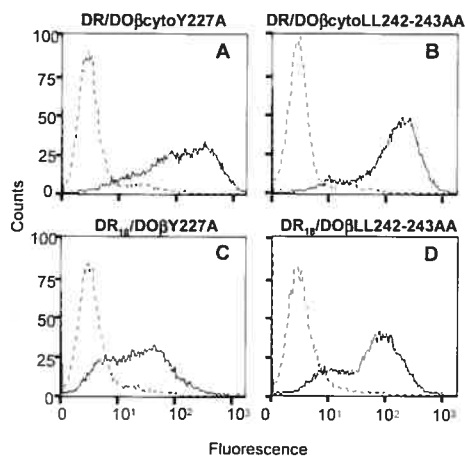


FIG. 4. Cell surface expression of the mutated reporter molecules in transfected HeLa cells. HeLa cells were transfected with DR α TM and the indicated cDNAs. Positive cells were sorted and analyzed by flow cytometry using FITC-labeled L243 antibody (filled line). Dotted lines represent the control fluorescence of cells incubated with a FITC-conjugated goat anti-mouse serum.

tion. Similar analysis were previously reported by others (64) to highlight the plasma membrane redistribution of class II molecules upon dendritic cell maturation. To analyze the distribution of the reporter molecule, the staining obtained at the cell surface was compared with the total amount of class II molecules as determined by staining simultaneously the cell surface and the intracellular content following membrane permeabilization with saponin. To validate this assay in our system, we first used DR molecules fused with the well characterized DM β and DM β Y230A cytoplasmic tails (Fig. 1, A and B). Indeed, it has been shown previously that the tyrosine motif encoded in the cytoplasmic tail of HLA-DM β mediates trafficking to lysosomal compartments and that disruption of this tyrosine motif results in enhanced cell surface expression (40–42). In accordance with these previously published data, Fig. 6 shows that the mutation of the tyrosine 230 to an alanine in DR/DM β cyto (DR/DM β cytoY230A) causes a dramatic redistribution of the molecules to the cell surface. Such stably transfected populations contain negative cells that serve as an internal control. These cells probably express only one or the other chain of the heterodimer and did not stain with L243. Under these conditions, given the high background obtained with the intracellular staining method used for flow cytometry, there is an apparent underestimation of the total number of class II molecules.

We then analyzed the DO β cytoplasmic tail mutants in this assay. When compared with the superimposed total and surface profiles of the DR1-expressing cells (Fig. 7A), the curves obtained for the cells expressing the DR/DO β cyto reporter molecules (Fig. 7B) showed a distinct pattern; the signal for the surface amount of class II molecules is much weaker than the one for total class II. This result is consistent with an intracellular accumulation of the reporter molecules and the role of the cytoplasmic tail of DO β in the sorting to the endocytic pathway. These results have been reproduced consistently using either unsorted and sorted populations expressing low or high levels of reporter molecules, as well as with the mixed DR α TM+DR $_{18}$ /DO β pair (data not shown). The data corroborate the confocal microscopy analysis presented above showing the existence of a lysosomal sorting signal in reporter molecules containing the DO β cytoplasmic tail. We next determined the distribution of class II molecules in cells expressing DR/DO β cytoY227A. The intracellular and surface staining profiles were similar to those of the wild-type DR/DO β cyto chimera

inasmuch as the intracellular and cell surface curves did not overlap under these conditions (Fig. 7C). The experiment confirmed that the Y227A mutation does not alter lysosomal sorting.

Finally, we examined the effect of the LL \rightarrow AA mutations in this assay. Fig. 7D shows that the DR/DO β cytoLL242–243AA molecules were clearly redistributed to the cell surface as the patterns for total *versus* surface expression are comparable between cells expressing DR β or DR/DO β cytoLL242–243AA molecules. This result confirmed the critical role of the di-leucine motif in sorting the reporter molecules to the endocytic pathway.

A Consensus Tyrosine-based Motif Rescued the Lysosomal Expression of the LL \rightarrow AA Reporter Molecule—By having generated a mutated reporter molecule that is defective in lysosomal sorting (DR/DO β cytoLL242–243AA), it became feasible to characterize further the potential role of tyrosine 227. Indeed, the possibility remained that our cellular or experimental settings did not allow the efficient recognition of the GYVRT sequence. Thus, to test if a known functional tyrosine-based motif would have been recognized in our chimeras, we designed a “gain” experiment by reconstructing a consensus YXXL signal around the pre-existing Tyr-227 of the DR/DO β cytoLL242–243AA molecule. This was performed by replacing the threonine 230 by the critical hydrophobic leucine residue to create the YVRL sequence (DR/DO β cytoAA/T230L) (Fig. 1B). The mutated cDNA was transfected in HeLa cells together with the DR α TM cDNA, and the pattern of expression of this heterodimer was verified in the bulk population. Wild-type DR β and DR/DO β cyto molecules were detected mostly at the cell surface by fluorescence microscopy (Fig. 8, A and B). However, analysis of the HeLa DR/DO β cytoAA/T230L cells revealed a defined intracellular staining for the class II molecule with the presence of many enlarged vesicles (Fig. 8C). Little if any surface expression was detected on these cells (and see below), and this pattern is similar to the one observed for the DR/DM β cyto molecule (Fig. 8D). These results confirmed the efficient intracellular sorting of molecules containing a functional tyrosine motif. The reduced surface expression of these molecules was confirmed by flow cytometry using unsorted cells from a series of independent transfections (Fig. 9). The weak but detectable surface expression of the DR/DO β cytoAA/T230L molecules could be due to the location of the tyrosine with respect to the transmembrane region. When compared with the cytoplasmic tail of HLA-DM, the tyrosine residue in DR/DO β is closer to the transmembrane (Fig. 1B) probably resulting in less stringent sorting toward lysosomes (61, 65). Taken as a whole, these results confirm that the tyrosine 227 in wild-type DO β is not part of a classical if any tyrosine-based sorting signal.

We then tested the phenotype of cells expressing a reporter class II molecule bearing both the di-leucine and tyrosine motifs. The presence of two distinct signals is reminiscent of the situation in the DM-DO complex that displays two motifs on separate cytoplasmic tails. The YXXL motif was introduced in the “wild-type” DR/DO β cyto molecule that contains the original LL sequence (Fig. 1B), and stable transfectants were generated (DR/DO β cytoT230L). The class II staining patterns obtained by flow cytometry or fluorescence microscopy were comparable to the ones observed for HeLa DR/DM β cyto or DR/DO β cytoAA/T230L (Figs. 8 and 9). Again, the presence of a tyrosine motif precluded high levels of surface expression of a DR/DO β reporter molecule demonstrating that the two families of motifs, LL and YXXL, are not equivalent and suggesting that the tyrosine-based sorting signal is dominant over the di-leucine motif.

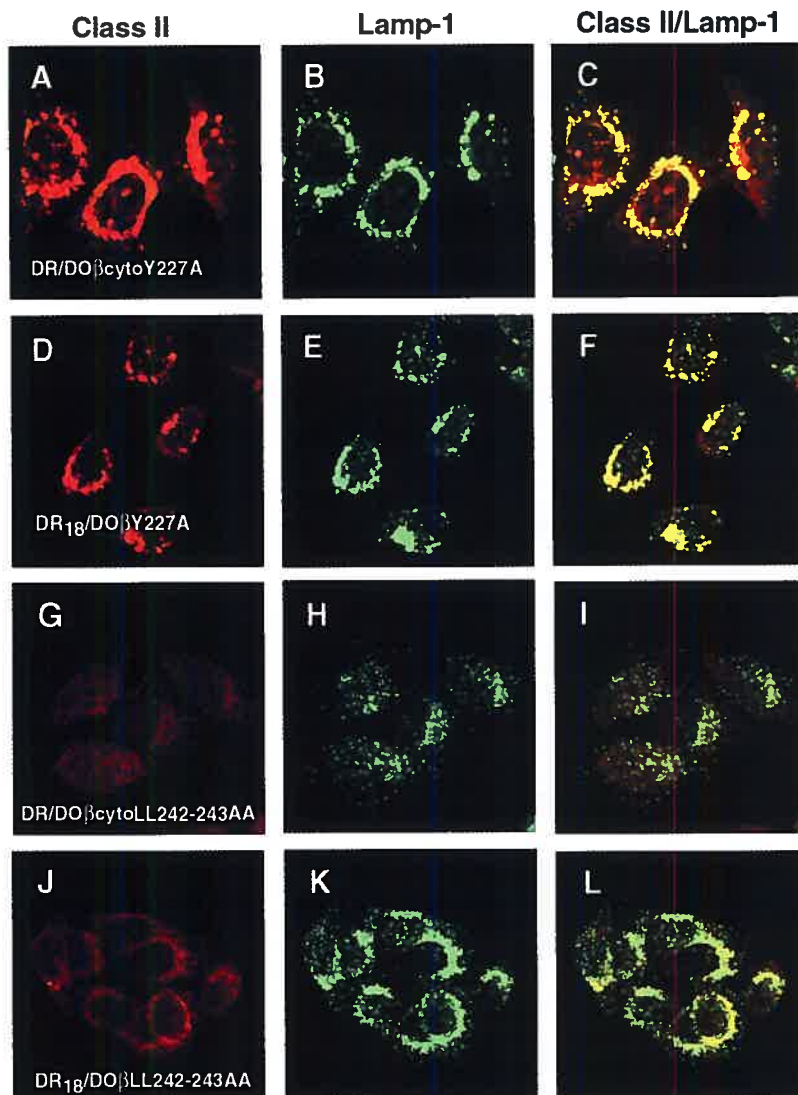


FIG. 5. The di-leucine motif in DO β mediates lysosomal targeting. Permeabilized cells expressing the DR/DO β cytoY227A (A–C), DR₁₈/DO β Y227A (D–F), DR/DO β cytoLL242–243AA (G–I), and DR₁₈/DO β LL242–243AA (J–L) molecules paired with the truncated-DR α chain (DR α TM) were stained to analyze the intracellular localization. A, D, G, and J show staining using the L243 antibody (red). B, E, H, and K represent the lysosomal staining obtained using H4A3 (green), and C, F, I, and L illustrate the co-localization of the two proteins (yellow). Fluorescence was monitored by confocal microscopy.

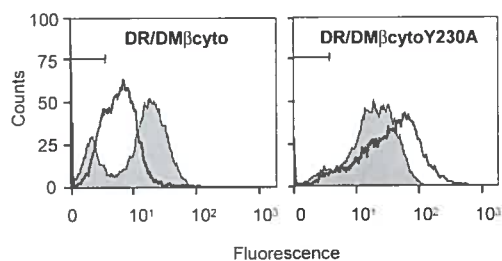


FIG. 6. Redistribution of the DR/DM β cytoY230A molecule to the cell surface. Flow cytometry analysis using the L243 illustrates the surface (empty region) and total expression (filled region) of the DR/DM β cyto molecule and mutant DR/DM β cytoY230A in unsorted HeLa-transfected cells. Cells were recovered using trypsin, split, and stained separately either at the cell surface or fixed, permeabilized, and stained with the FITC-conjugated L243. Marker indicates the boundary between negative or positive cells for surface expression of the chimeric molecules.

The Di-leucine Motif of HLA-DO β Is Not Absolutely Required for Lysosomal Sorting of the DO-DM Complex—A previous study showed that HLA-DO must first associate with HLA-DM to egress the ER and gain access to the lysosomal compartments (39). Since both DO and DM contain a sorting motif susceptible to target the complex to the lysosomes, we sought to determine if the di-leucine motif of HLA-DO was necessary in this process. We reasoned that surface expression of the DM-DO complex and loss of intracellular vesicles would result

from mutation of the DO β LL sequence if this motif was indeed critical for the sorting. To this end, we compared in HeLa cells the intracellular localization of the HLA-DO-DM complex with that obtained for the same complex but formed with an HLA-DO mutated at its di-leucine motif. We transfected wild-type HLA-DO or HLA-DOAA into HeLa DM⁺ cells and performed co-immunoprecipitations to confirm by Western blotting the presence of associated DO α and - β chains in these cells (Fig. 10A). We then analyzed the localization of the DO-DM complexes by fluorescence microscopy using antibodies specific for DO β or DM β . Immunostaining revealed well defined vesicles for both the DM-DO and DM-DOAA complexes (Fig. 10A). These patterns were similar to the one described previously in HeLa cells for the wild-type DM-DO complex and clearly different from the ER staining obtained for HeLa cells expressing DO alone (Fig. 10B (39)). Contrary to the drastic effect of the di-leucine mutation introduced in reporter molecules, this amino acid change did not affect the vesicular accumulation of DO in the presence of HLA-DM. Interestingly, both the HeLa DM.5 cells expressing HLA-DO and HLA-DOAA were negative when assayed by flow cytometry for the class II surface expression using the polyclonal mouse serum against DO β (data not shown). Together, these results agree with the observation described above that the tyrosine motif seems to dominate over the LL signal and suggest that the di-leucine is not critical for the lysosomal delivery of the DO-DM complex.

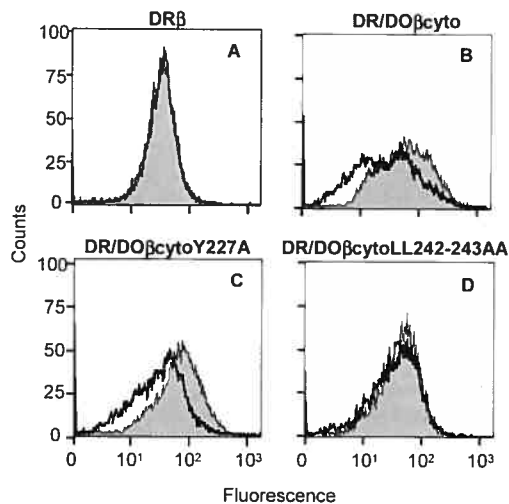


FIG. 7. Cell surface redistribution of the DR/DO β cytoLL242-243AA. Surface (*bold line*) and total (*dark region*) class II expression was monitored in stably transfected cells using FITC-conjugated L243: DR β (A), DR/DO β cyto (B), DR/DO β cytoY227A (C), and DR/DO β cytoLL242-243AA (D) transfectants. Cells were treated as in Fig. 6. All these cells were transfected with DR α TM. Data acquisition was performed under the same settings for all comparable samples after matching the surface and total profiles obtained for the DR β cells.

DISCUSSION

The first indication that DO β contains targeting information came from experiments on the expression of a mixed isotypic pair between DR α and DR $_{18}$ /DO β (44). Immunofluorescence microscopy revealed that this heterodimer was localized in Lamp $^+$ vesicular structures. However, we were concerned that these molecules might accumulate in intracellular compartments nonspecifically as a result of increased stability conferred by the luminal portion of DO. Indeed, HLA-DO normally resides in the lysosomal compartments and must therefore be highly stable in this harsh environment (39). To circumvent this problem and as a first step toward the disclosure of potential DO β -encoded sorting signals, we addressed the importance of the cytoplasmic domain by constructing a chimeric DR1 molecule where the cytoplasmic tail of the β chain was replaced by the one of HLA-DO β (Fig. 1). Our results clearly demonstrate that this portion of DO β is sufficient to bring the reporter molecule to Lamp $^+$ compartments (Fig. 3A). However, we cannot rule out that amino acids motifs in DO α and DO β chains might cooperate to increase sorting efficiency of the native HLA-DO molecule.

The two most common endosomal sorting signals are tyrosine- or leucine-based sequences (18). The former is found in the cytoplasmic tail of such protein as HLA-DM and are usually responsible for specific, rapid internalization from the cell surface. The di-leucine motif is thought to direct proteins to the endosomal/lysosomal compartments principally from the trans-Golgi network (reviewed in Ref. 66). Interestingly, the cytoplasmic tail of the HLA-DO contains two such sequences, one imperfect tyrosine motif centered around position 227 and one di-leucine motif at position 242-243 (Fig. 1). Our site-directed mutagenesis analysis revealed that the di-leucine motif is responsible for the localization of reporter molecules in lysosomal compartments. Furthermore, our results demonstrate that the putative tyrosine signal is not recognized as such by the cellular machinery. Since functional tyrosine motifs impede plasma membrane accumulation, the conclusion that the tyrosine 227 of DO plays no role in sorting probably holds true for B lymphocytes as well. Indeed, expression of a mixed DR α +DO β heterodimer in a class II negative mutant B cell line also resulted in significant surface expression (not shown).

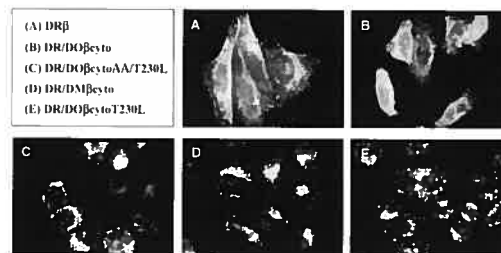


FIG. 8. Characterization of the putative tyrosine motif in HLA-DO β . Total class II expression was analyzed simultaneously on permeabilized cells by fluorescence microscopy using biotinylated-L243 followed by Texas Red-coupled streptavidin: DR β (A), DR/DO β cyto (B), DR/DO β cytoAA/T230L (C), DR/DM β cyto (D), and DR/DO β cytoT230L (E). These β chains were transfected together with DR α TM.

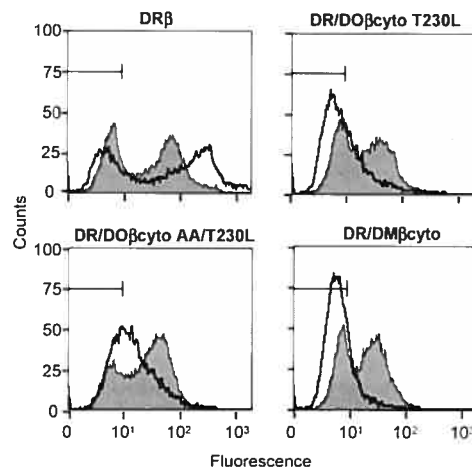


FIG. 9. Reduced surface expression of reporter molecules containing a consensus tyrosine motif. Surface (*bold line*) and total (*dark region*) class II expression was monitored in independent, stably transfected, unsorted cell populations using FITC-conjugated L243. All these cells were transfected with DR α TM. Cells located *left* of the marker in the DR β panel are negative for class II expression and served as internal controls to adjust acquisition settings.

The exact route taken by molecules of the antigen presentation machinery is still a matter of debate (reviewed in Ref. 66). Early experiments in HeLa cells showed that the AP1 adaptor was responsible for the transport of the Ii-class II complex to the endocytic compartment suggesting that this process is clathrin-dependent (67). AP-1 would mediate sorting at the trans-Golgi network, and it would be recruited by the leucine-based motifs in Ii. It remains to be determined if our reporter molecules are also sorted by AP-1 adaptor proteins.

Although the bulk of the Ii-class II complexes reaches the endocytic pathway directly from the trans-Golgi, a significant proportion of the proteins would first access the cell surface (68-70). Then, AP-2 is probably recruited at the plasma membrane for integration of Ii-class II complexes in clathrin-coated vesicles that mediate transport to the endocytic pathway (66). Plasmon resonance experiments confirmed the interactions between Ii and both AP1 and AP2 chains of the clathrin-coated vesicles (71). We cannot rule out that reporter molecules containing DO β reach the lysosomes only after transiting at the cell surface. However, these molecules are internalized and recycle back to the cell surface in HeLa cells with similar kinetics as DR1 which does not accumulate in intracellular compartments (44) (data not shown). This suggests that sorting, at least in HeLa cells, does not operate from the surface but rather directly at the trans-Golgi. Also, it is not clear if plasma membrane expression conferred by the cytoplasmic tail of HLA-DO β is the result of trafficking through the default pathway or

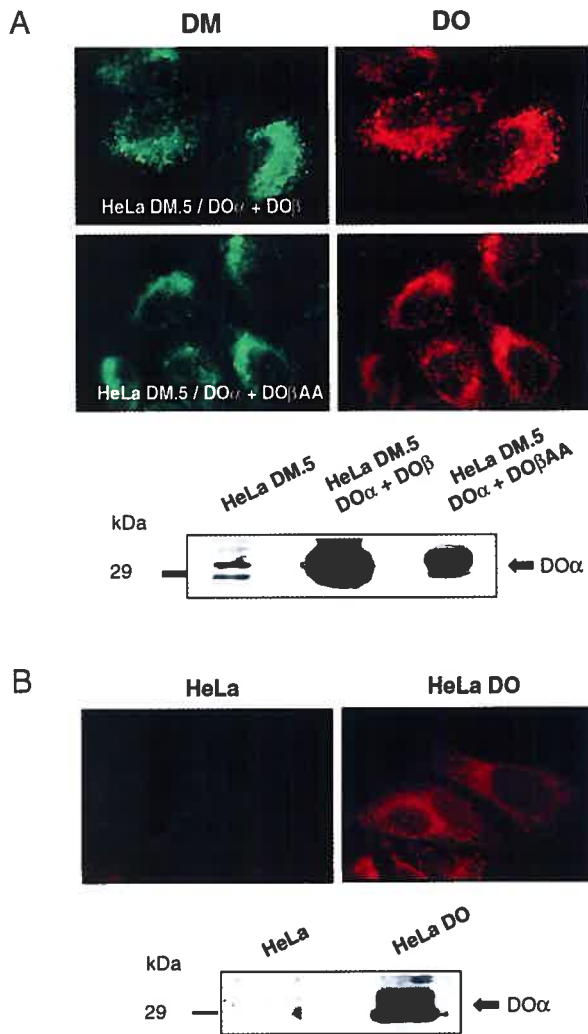


FIG. 10. Mutation of the LL motif in DO β does not prevent lysosomal accumulation of the DO-DM complex. *A*, immunofluorescence microscopy showing the pattern of expression of DO and DM. Permeabilized HeLa DM.5 cells expressing either the full-length DO α + DO β or the full-length DO α + DO β AA molecules were stained intracellularly to analyze localization. Cells were stained with the DM-specific antibody (green) and with the mouse serum specific for HLA-DO β (red). The presence of both the DO α and DO β chains in transfected DM.5 HeLa cells was confirmed by Western blot analysis of samples immunoprecipitated with the mouse DO β -specific serum and revealed with a DO α -specific rabbit serum. *B*, intracellular staining of control HeLa cells expressing HLA-DO molecules alone revealed a weak localized ER pattern but no scattered endosomal vesicles. Western blot analysis as above revealed the presence of both the DO α and DO β chains in transfected HeLa DO cells.

exocytosis from lysosomes (72). Whatever the mechanism, cell surface expression of our reporter molecule or of Ii in B lymphocytes suggests that sorting directed by the di-leucine motif is not very stringent. It is unlikely that the surface accumulation of our chimeric molecules results from the overexpression of the transfected proteins. Indeed, saturation of the sorting machinery in cells expressing the DR/DM β cyto would have resulted in the surface expression of molecules such as Lamp-1 which also contain a tyrosine-based motif (73, 74). No such expression could be detected by flow cytometry (data not shown).

It is intriguing that mouse and rabbit O β chains do not include an LL motif (75, 76). This suggests a more specialized function for this molecule in humans. However, it might explain why some H-2O was detected at the surface of splenocytes by radioiodination studies (77). Upon dissociation from DM,

few H-2O molecules might escape endosomal retention (see below) and end up at the cell surface.

Although HLA-DO contains a functional sorting signal, association with HLA-DM is an obligatory step in its maturation. Karlsson and co-workers (39) showed that the DO α and DO β chains associate in the ER, but that egress and acquisition of complex sugars require an interaction with HLA-DM. DM most probably assists in the folding of DO allowing its release from ubiquitous ER chaperones. From there, however, the relative importance of DO- and DM-encoded motifs in directing the complex to lysosomes was not known. Our results show that substitution of the two leucines for alanines in HLA-DO β has no significant effect on vesicular accumulation and suggest that the tyrosine-based signal of DM is indeed the functional motif in this complex. Again, the fact that the DO-DM complex does not accumulate at the plasma membrane of B lymphocytes or transfected cells (on the contrary to the reporter molecules relying on the di-leucine motif of DO) suggests that the tyrosine motif of DM is recognized by the sorting machinery.

The fact that no DM-free HLA-DO has been found outside the ER (39) and that the tyrosine motif of DM is sufficient to sort the complex to lysosomes suggests that the role of the LL motif of HLA-DO needs to be reconsidered. Maybe this di-leucine motif has a complementary role by targeting some of the DO-DM complexes to earlier, less acidic compartments than MHC class II-rich compartments where it might also modulate class II loading. Presentation of antigens that are independent of Ii expression and are dependent on the capacity of MHC molecules to recycle could be sensitive to the expression of DO (78). This alternate pathway allows a wider repertoire of peptides to be loaded on class II molecules, probably favoring presentation of epitopes that require limited proteolysis of the antigenic protein (79). The passage of DO through such early compartments would be in agreement with the recent suggestion that this molecule prevents peptide loading of antigens taken up by fluid phase endocytosis but not of those internalized via surface immunoglobulins and transported to highly acidic compartments (35). Future experiments should address the effect of HLA-DO expression on these different antigen loading pathways.

Another possible function for the di-leucine motif of DO was brought up by studies on Ii which, in HeLa cells, was shown to delay the progression of proteins from early endosome to late endosomes (80). A second group suggested that the Ii chain might even retain class II molecules and endocytosed antigens in early endocytic compartments probably to favor peptide loading (81). In light of these reports, we might envisage that HLA-DO slows down the progression of HLA-DM through the early stages of the endocytic pathway. This may serve to edit or inhibit peptide loading in compartments that are otherwise not very restrictive for peptide loading.

Alternatively, DO could compensate for the lack of signaling of DMs in cellular conditions where the tyrosine motif of DM is hidden or fails to be recognized by the sorting machinery. By analogy, Ii was shown to interact with DM and to restore the function of a DM molecule lacking its sorting signal (41). The interplay between multiple sorting motifs, for example, in multimolecular structures, including HLA-DM/DO and tetraspan proteins such as CD82, will require further investigation (82).

Acknowledgments—We thank Drs. R. P. Sékaly and Eric Long for helpful discussions, antibodies, and cell lines; M. Hugo Dilhuidy for confocal microscopy; M. Serge Sénéchal for FACS analysis and cell sorting; and Dr. Eric Cohen for the use of the fluorescence microscopy facility. We thank Georges Azar for constructing the DR/DO β cyto cDNA and for helpful discussions. The H4A3 monoclonal antibody developed by J. T. August and J. E. K. Hildreth was obtained from the developmental studies hybridoma bank developed under the auspices of the

NICHD, National Institutes of Health, and is maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242.

REFERENCES

1. Cresswell, P. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 259–293
2. Kvist, S., Wiman, K., Claesson, L., Peterson, P. A., and Dobberstein, B. (1982) *Cell* **29**, 61–69
3. Roche, P. A., and Cresswell, P. (1990) *Nature* **345**, 615–618
4. Romagnoli, P., and Germain, R. N. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 1107–1113
5. Stumptner, P., and Benaroch, P. (1997) *EMBO J.* **16**, 5807–5818
6. Busch, R., Cloutier, I., Sekaly, R.-P., and Hammerling, G. J. (1996) *EMBO J.* **15**, 418–428
7. Bikoff, E. K., Huang, L.-Y., Episkopou, V., van Meerwijk, J., Germain, R. N., and Robertson, E. J. (1993) *J. Exp. Med.* **177**, 1699–1712
8. Viville, S., Neeffes, J. J., Lotteau, V., Dierich, A., Lemeur, M., Ploegh, H., Benoist, C., and Mathis, D. (1993) *Cell* **72**, 635–648
9. Rovere, P., Forquet, F., Zimmermann, V. S., Trucy, J., Ricciardi-Castagnoli, P., and Davoust, J. (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.* **417**, 195–201
10. Sekaly, R.-P., Tonnelle, C., Strubin, M., Mach, B., and Long, E. O. (1986) *J. Exp. Med.* **164**, 1490–1504
11. Runnels, H. A., Weber, D. A., Moore, J. C., Westerman, L. E., and Jensen, P. E. (1997) *Mol. Immunol.* **34**, 471–480
12. Zhong, G. M., Castellino, F., Romagnoli, P., and Germain, R. N. (1996) *J. Exp. Med.* **184**, 2061–2066
13. Bakke, O., and Dobberstein, B. (1990) *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) *Nature* **348**, 600–605
15. Romagnoli, P., Layet, C., Yewdell, J., Bakke, O., and Germain, R. N. (1993) *J. Exp. Med.* **177**, 583–596
16. Odorizzi, C. G., Trowbridge, I. S., Xue, L., Hopkins, C. R., Davis, C. D., and Collawn, J. F. (1994) *J. Cell Biol.* **126**, 317–330
17. Pieters, J., Bakke, O., and Dobberstein, B. (1993) *J. Cell Sci.* **106**, 831–846
18. Heilker, R., Spiess, M., and Crottet, P. (1999) *BioEssays* **21**, 558–567
19. Nakagawa, T. Y., and Rudensky, A. Y. (1999) *Immunity* **12**, 121–129
20. Ericson, M. L., Sundstrom, M., Sansom, D. M., and Charron, D. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 26531–26538
21. Jensen, P. E., Weber, D. A., Thayer, W. P., Westerman, L. E., and Dao, C. T. (1999) *Immunity* **11**, 229–238
22. Denzin, L. K., Robbins, N. F., Carboy-Newcomb, C., and Cresswell, P. (1994) *Immunity* **1**, 595–606
23. Sloan, V. S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., and Zaller, D. M. (1995) *Nature* **375**, 802–806
24. Weber, D. A., Evavold, B. D., and Jensen, P. E. (1996) *Science* **274**, 618–620
25. Denzin, L. K., and Cresswell, P. (1995) *Cell* **82**, 155–165
26. Sherman, M. A., Weber, D. A., and Jensen, P. E. (1995) *Immunity* **3**, 197–205
27. Denzin, L. K., Hammond, C., and Cresswell, P. (1996) *J. Exp. Med.* **184**, 2153–2165
28. Kropshofer, H., Arndt, S. O., Moldenhauer, G., Hammerling, G. J., and Vogt, A. B. (1997) *Immunity* **6**, 293–302
29. Neeffes, J. (1999) *Eur. J. Immunol.* **29**, 1421–1425
30. Kropshofer, H., Vogt, A. B., Moldenhauer, G., Hammer, J., Blum, J. S., and Hammerling, G. J. (1996) *EMBO J.* **15**, 6144–6154
31. Van Ham, S. M., Grueneberg, U., Malcherek, G., Broeker, I., Melms, A., and Trowsdale, J. (1996) *J. Exp. Med.* **184**, 2019–2024
32. Robbins, A. R., and Roff, C. F. (1987) *Methods Enzymol.* **138**, 458–470
33. Denzin, L. K., Sant'Angelo, D. B., Hammond, C., Surman, M. J., and Cresswell, P. (1997) *Science* **278**, 106–109
34. 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 Neeffes, J. (1997) *Curr. Biol.* **7**, 950–957
35. 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) *Immunity* **8**, 233–243
36. 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 Neeffes, J. (2000) *J. Exp. Med.* **191**, 1127–1136
37. Kropshofer, H., Vogt, A. B., Thery, C., Armandola, E. A., Li, B. C., Moldenhauer, G., Amigorena, S., and Hammerling, G. J. (1998) *EMBO J.* **17**, 2971–2981
38. Douek, D. C., and Altmann, D. M. (1997) *Int. Immunol.* **9**, 355–364
39. Liljedahl, M., Kuwana, T., Fung-Leung, W. P., Jackson, M., Peterson, P. A., and Karlsson, L. (1996) *EMBO J.* **15**, 4817–4824
40. Marks, M. S., Roche, P. A., van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P. J., and Bonifacio, J. S. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 351–369
41. Lindstedt, R., Liljedahl, M., Peleraux, A., Peterson, P. A., and Karlsson, L. (1995) *Immunity* **3**, 561–572
42. Copier, J., Kleijmeer, M. J., Ponnambalam, S., Oorschot, V., Potter, P., Trowsdale, J., and Kelly, A. (1996) *J. Immunol.* **157**, 1017–1027
43. Copier, J., Potter, P., Sacks, S. H., and Kelly, A. P. (1998) *Immunology* **93**, 505–510
44. Samaan, A., Thibodeau, J., Mahana, W., Castellino, F., Cazenave, P. A., and Kindt, T. J. (1999) *Int. Immunol.* **11**, 99–111
45. Robadey, C., Ammerlaan, W., Muller, C., Cloutier, I., Sékaly, R. P., Haefliger, J. A., and Demotz, S. (1997) *J. Immunol.* **159**, 3238–3246
46. Jacobson, S., Sekaly, R.-P., Jacobson, C. L., McFarland, H. E., and Long, E. O. (1989) *J. Virol.* **63**, 1756–1762
47. Tonnelle, C., DeMars, R., and Long, E. O. (1985) *EMBO J.* **4**, 2839–2847
48. Thibodeau, J., Lavoie, P. M., Samaan, A., Corre, J. P., Sékaly, R. P., and Cazenave, P. A. (1998) *Mol. Immunol.* **35**, 885–893
49. Rosen-Bronson, S., and Long, E. O. (1991) *Immunogenetics* **33**, 124–131
50. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) *Gene (Amst.)* **77**, 51–59
51. Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J. I., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K. I., Yoshida, M., and Arai, N. (1988) *Mol. Cell Biol.* **8**, 466–472
52. Kelly, A. P., Monaco, J. J., Cho, S., and Trowsdale, J. (1991) *Nature* **353**, 571–573
53. Panina-Bordignon, P., Fu, X., Lanzavecchia, A., and Karr, R. W. (1992) *J. Exp. Med.* **176**, 1779–1784
54. Radka, S. F., Machamer, C. E., and Cresswell, P. (1984) *Hum. Immunol.* **10**, 177–188
55. Guy, K., Van Heyningen, V., Cohen, B. B., Deane, D. L., and Steel, C. M. (1982) *Eur. J. Immunol.* **12**, 942–948
56. Deleted in proof
57. Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973) *Virology* **52**, 456–467
58. Lavoie, P. M., Thibodeau, J., Cloutier, I., Busch, R., and Sekaly, R. P. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 6892–6897
59. Lamb, C. A., Yewdell, J. W., Bennis, J. R., and Cresswell, P. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 5998–6002
60. Simonsen, A., Momburg, F., Drexler, J., Hammerling, G. J., and Bakke, O. (1993) *Int. Immunol.* **5**, 903–917
61. Sandoval, I. V., and Bakke, O. (1994) *Trends Cell Biol.* **4**, 292–297
62. Harter, C., and Mellman, I. (1992) *J. Cell Biol.* **117**, 311–325
63. Motta, A., Bremnes, B., Morelli, M. A., Frank, R. W., Saviano, G., and Bakke, O. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27165–27171
64. Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997) *Nature* **388**, 782–787
65. Potter, P. K., Copier, J., Sacks, S. H., Calafat, J., Janssen, H., Neeffes, J. J., and Kelly, A. P. (1999) *Eur. J. Immunol.* **29**, 3936–3944
66. Nordeng, T. W., Gorvel, J. P., and Bakke, O. (1998) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **232**, 179–215
67. Salamero, J., Le Borgne, R., Saudrais, C., Goud, B., and Hoflack, B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30318–30321
68. Roche, P. A., Teletski, C. L., Stang, E., Bakke, O., and Long, E. O. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8581–8585
69. Benaroch, P., Yilla, M., Raposo, G., Ito, K., Miwa, K., Geuze, H. J., and Ploegh, H. L. (1995) *EMBO J.* **14**, 37–49
70. Wang, K., Peterson, P. A., and Karlsson, L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17055–17060
71. Hofmann, M. W., Honing, S., Rodionov, D., Dobberstein, B., von Figura, K., and Bakke, O. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 36153–36158
72. Wubbolts, R., Fernandez-Borja, M., Oomen, L., Verwoerd, D., Janssen, H., Calafat, J., Tulp, A., Dusseljee, S., and Neeffes, J. (1996) *J. Cell Biol.* **135**, 611–622
73. Marks, M. S., Woodruff, L., Ohno, H., and Bonifacio, J. S. (1996) *J. Cell Biol.* **135**, 341–354
74. Nordeng, T. W., and Bakke, O. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 21139–21148
75. Larhammar, D., Hammerling, U., Rask, L., and Peterson, P. A. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 14111–14119
76. Chouchane, L., Brown, T. J., and Kindt, T. J. (1993) *Immunogenetics* **38**, 64–66
77. Karlsson, L., Surh, C. D., Sprent, J., and Peterson, P. A. (1991) *Nature* **351**, 485–488
78. Pinet, V. M., and Long, E. O. (1998) *Eur. J. Immunol.* **28**, 799–804
79. Zhong, G., Romagnoli, P., and Germain, R. N. (1997) *J. Exp. Med.* **185**, 429–438
80. Gorvel, J.-P., Escola, J.-M., Stang, E., and Bakke, O. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2741–2746
81. Loss, G. E. J., and Sant, A. J. (1993) *J. Immunol.* **150**, 3187–3197
82. Hammond, C., Denzin, L. K., Pan, M., Griffith, J. M., Geuze, H. J., and Cresswell, P. (1998) *J. Immunol.* **161**, 3282–3291

