

## 6. Zusammenfassung

MHC Moleküle der Klasse II haben eine zentrale Aufgabe in der Induktionsphase einer Immunantwort, weil der Antigenrezeptor der T Zelle antigene Peptide nur dann erkennen und auf sie reagieren kann, wenn sie ihm von MHC Klasse II Molekülen präsentiert werden. Um den Polymorphismus dieser wichtigen MHC Klasse II Moleküle zu erfassen, wurde ein nicht-radioaktives Markierungsverfahren - die in situ Biotinylierung - daraufhin geprüft, ob es, im Vergleich zur radioaktiven metabolischen Markierung mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin, für den biochemischen Nachweis mittels Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und eindimensionaler isoelektrischer Fokussierung (1D-IEF) geeignet ist.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß NHS-LC-Biotin bovine MHC Klasse II Moleküle markiert, jedoch mit unterschiedlicher Effizienz für alle Formen dieses polymorphen Systems. Dies wurde nach Immunpräzipitation und 1D-IEF demonstriert. In durchflußzytometrischen Analysen, sowie im Immunoblotting nach SDS-PAGE und in der Immunpräzipitation zeigte sich keine Beeinträchtigung der Avidität des monoklonalen Antikörpers Bo139 für sein Epitop auf bovinen MHC Klasse II-DR Molekülen nach in situ Biotinylierung. Das relative Molekulargewicht biotinylierter MHC Klasse II Moleküle blieb in der SDS-PAGE unverändert. Anhand einer Doppelmarkierung boviner mononukleärer Blutzellen (MNC) durch metabolische Markierung mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin und nachfolgende Biotinylierung, konnte im Vergleich der Bandenmuster nach Immunpräzipitation und 1D-IEF keine Veränderung des isoelektrischen Punktes von  $\beta$ -Ketten boviner MHC Klasse II Moleküle durch die Biotinylierung festgestellt werden. In einer 1D-IEF mit MHC Klasse II Präzipitaten 13 unverwandter Rinder wurden die qualitativen Aussagen der beiden Markierungsformen bezüglich der darstellbaren Banden verglichen. Hierbei konnten insgesamt 34 polymorphe Banden dargestellt werden, von denen jedoch nur 14 mit beiden Markierungsverfahren nachweisbar waren. 12 bzw. 8 Banden ließen sich nur mit der metabolischen Markierung durch  $^{35}\text{S}$ -Methionin bzw. nur durch Biotinylierung darstellen.

Somit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, daß sich die in situ Biotinylierung boviner MNC als Markierungsverfahren zur Darstellung polymorpher BoLA Klasse II Moleküle in der 1D-IEF eignet. Die alleinige Biotinylierung kann zwar nicht als Alternative für die radioaktive Markierung boviner MHC Klasse II Moleküle dienen, sie erlaubt jedoch die Demonstration exprimierter alleler Formen, die durch konventionelle metabolische Markierung mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin bisher nicht nachweisbar waren. Damit bietet diese Methode eine vollständigere Erfassung und erweiterte Analyse exprimierter boviner MHC Klasse II Produkte.

Als "Superantigene" bezeichnete Moleküle aus Bakterien, Mykoplasmen oder Viren können das Immunsystem bei Mensch und Labornagern über einen MHC Klasse II vermittelten Wirkungsmechanismus beeinflussen, der dem der klassischen Antigenpräsentation ähnelt, der aber erhebliche immunregulative Bedeutung hat. In dieser Arbeit wurde erstmals die Interaktion von Superantigen mit Zellen und Molekülen des bovinen Immunsystems näher untersucht.

Mit Hilfe der Membrandoppelfluoreszenz und auf Westernblots nach SDS-PAGE konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) bovine Klasse II Moleküle als primäre Liganden auf der Zelle benutzt. Die Korrelation der Bindungsstärke von SEB mit der von bovinen Klasse II DQ- und DR-Subklassenprodukten bot erste Hinweise auf die unterschiedliche Bindung an einzelne BoLA-DR Allele.

Eine *in vitro* Stimulation boviner MNC mit den Superantigenen SEA, SEB und SEC2 resultierte bei allen 23 untersuchten Tieren in einer Blastentransformation. Die Stärke der individuellen Blastenbildung war unterschiedlich. Sie korrelierte jedoch nicht mit der Anzahl MHC Klasse II exprimierender Zellen in der Ausgangspopulation oder einzelnen polymorphen, biochemisch nachgewiesenen MHC Klasse II Banden in der 1D-IEF. Unter den geprüften Superantigenen zeigte SEA die stärkste blasteninduzierende Potenz (gefolgt von SEB und SEC2) bei einer minimal wirksamen Konzentration von 1 pg / ml.

Die drei verwendeten Superantigene führten zu einer deutlich unterschiedlichen Zusammensetzung der induzierten Blastenpopulation *in vitro*. In allen Fällen kam es zu einer starken Entwicklung von CD8<sup>+</sup> T Zellblasten, die die der CD4<sup>+</sup> Zellen deutlich übertraf. Dieses Phänomen war nach Stimulation mit SEA schwächer ausgeprägt als nach SEB und SEC2. Der Anteil an B Lymphoblasten nahm hingegen mit steigender Stimulationsdauer kontinuierlich ab. Am stärksten geschah dies in den Ansätzen mit SEB, gefolgt von SEC2 und SEA. Eine deutliche Blastentransformation von  $\gamma\delta$ -T Zellen wurde durch diese Superantigene nicht induziert.

In einer Gruppe von Tieren, die an Kokkenmastitis erkrankt und somit potentiell mit Superantigenen in Kontakt gekommen waren, konnte eine insgesamt stärkere Blastentransformation auf Superantigenstimulation *in vitro* mit einem insgesamt höheren Anteil an B Lymphoblasten und einer veränderten Zusammensetzung der Blastenpopulation nach SEA Stimulation gegenüber der gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden.

Damit liegen für die bakteriellen Enterotoxine SEA, SEB und SEC2 erstmalig orientierende Daten vor, die sie auch beim Rind als potente Superantigene charakterisieren. Auf dieser Grundlage können nun Untersuchungen zur möglichen pathogenetischen Bedeutung von Superantigenen im bovinen System folgen.

## 7. Summary

### A. Lange: **Characterisation of bovine major histocompatibility complex (MHC) class II antigens: Biochemical investigations and interaction with superantigens.**

MHC class II molecules play a central role in the induction phase of the immune response. The T cell antigen receptor does only recognize and respond to antigenic peptides presented by MHC class II molecules. In order to characterize the polymorphism of these important MHC class II molecules, a non radioactive labelling method - in situ biotinylation - was tested for its suitability in comparison to radioactive metabolic labelling with  $^{35}\text{S}$ -methionine. Biochemical analysis included sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE) and onedimensional isoelectric focusing (1D-IEF).

Here it was demonstrated, that NHS-LC-biotin is suitable for labelling of bovine MHC class II molecules, however, not with the same efficiency for all allelic forms of this polymorphic system. This was shown by immunoprecipitation and 1D-IEF. The avidity of the monoclonal antibody Bo139 for its epitope on bovine MHC class II-DR molecules was not affected by in situ biotinylation of bovine blood mononuclear cells (MNC), as assessed by flow cytometric analyses, immunoblotting after SDS-PAGE, and immunoprecipitation. This biotinylation did not affect the apparent isoelectric points of polymorphic bovine MHC class II  $\beta$ -chains, as demonstrated by double labelling of cells with  $^{35}\text{S}$ -methionine and subsequently with biotin. Banding pattern obtained after immunoprecipitation and 1D-IEF provided identical results for MHC class II molecules with and without biotinylation. 1D-IEF of 13 unrelated animals resulted in 34 polymorphic bands out of which 14 were detectable by both labelling procedures, 8 only after biotinylation and 12 only after metabolic labelling with  $^{35}\text{S}$ -methionine.

Thus, it was shown for the first time that in situ biotinylation of bovine MNC is a suitable labelling method for the demonstration of polymorphic BoLA class II molecules after 1D-IEF. However, biotinylation alone cannot serve as an alternative for radioactive labelling of bovine MHC class II molecules but can provide access to expressed allelic forms not detectable by metabolic labelling with  $^{35}\text{S}$ -methionine. Therefore, this method allows a more complete demonstration and expanded analysis of expressed bovine MHC class II products.

Bacterial, mycoplasmal or viral components, known as „superantigens“, can influence the immune system of humans or rodents via MHC class II mediated mechanisms similar to the classical antigen presentation, however, with remarkable immunoregulative consequences. In this thesis, distinct interactions of superantigens with cells and molecules of the bovine immune system are described for the first time.

Based on flow cytometric analyses and western blot experiments after SDS-PAGE, it was shown, that staphylococcal enterotoxin B (SEB) utilizes bovine MHC class II molecules as primary ligands on the cell surface. Indications, that SEB binds variably to certain BoLA-DR alleles, came from correlation studies between the binding strength of SEB with expression densities of BoLA-DR and BoLA-DQ.

*In vitro* stimulation of bovine MNC with the superantigens SEA, SEB and SEC2 led to blastogenic transformation of the cells of all 23 animals tested. There were obvious individual differences by means of the amount of blasttransformed cells, which, however, correlated neither with the number of MHC class II positive cells before stimulation, nor with distinct polymorphic MHC class II bands after 1D-IEF. Among the superantigens tested, SEA proved to be the most potent in induction of blasts, followed by SEB and SEC2. The minimal effective concentration for SEA was 1 pg / ml.

These 3 superantigens provided different compositions of the induced blastcell populations *in vitro*. In all cases the development of CD8<sup>+</sup> T cellblasts was superior to that of CD4<sup>+</sup> blasts. This phenomenon was most prominently seen with SEB and SEC2, much less with SEA. Percentages of B cell blasts declined continuously during superantigen stimulation, with SEB having the strongest effect, followed by SEC2 and SEA. Significant blast formation of  $\gamma\delta$ -T cells was not induced by these superantigens.

Animals, suffering from clinical coccal mastitis, displayed a stronger blastogenic response after *in vitro* stimulation with superantigens. In addition to significantly higher percentages of B cell blasts, SEA stimulation induced a differently composed blastcell population in comparison to a group of healthy cows.

These data characterize the bacterial enterotoxins SEA, SEB and SEC2 as potent superantigens also in the bovine species. Thus, providing a basis for investigations of possible pathogenic implications of superantigens in cattle.