

Dissertation
der
Biologischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Dr.rer.nat.

Die MHC-Klasse-I-regulatorische Funktion
des 48 kDa Glykoproteins
des murinen Cytomegalovirus

vorgelegt
von
Uwe Reusch
am
26. Juni 2000

Erstgutachter: Prof. Lutz Gürtler
Zweitgutachterin: Prof. Elisabeth Weiß
Sondergutachter: Prof. Ulrich H. Koszinowski
Tag der mündlichen Prüfung: 8.12.2000

1 Einleitung	1
1.1 Virale Strategien der Immunevasion	1
1.1.1 Die Immunantwort gegen virale Erreger	1
1.1.2 Antigenpräsentation	2
1.1.3 MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation	2
1.1.4 Virale Interferenz mit der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation	6
1.1.4.1 Prozessierung antigener Peptide durch das Proteasom	7
1.1.4.2 Peptidtransport	7
1.1.4.3 Retention von MHC-Klasse-I-Komplexen	9
1.1.4.4 ER-assoziierte Degradation von MHC-Klasse-I-Molekülen	10
1.1.4.5 Internalisierung und lysosomale Degradation von MHC-Klasse-I-Molekülen	11
1.1.4.6 Virale Inhibition der Natürlichen Killer Zellen	11
1.2 Herpesviren	12
1.2.1 Der Replikationszyklus der Herpesviren	14
1.3 Cytomegaloviren	15
1.3.1 Die klinische Bedeutung der CMV-Infektion	16
1.3.2 Murines Cytomegalovirus	17
1.3.2.1 Kontrolle der MCMV Infektion durch das Immunsystem	17
1.3.2.2 Beeinträchtigung der Antigenpräsentation durch CMV	18
1.3.2.3 Identifikation des 48 kDa Glykoproteins von MCMV	19
1.3.2.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Allgemeine Materialien	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Chemikalien	23
2.1.3 Weitere Verbrauchsmaterialien	24
2.1.4 Oligonukleotide	25
2.1.5 Antikörper	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Herstellung von DNA-Konstrukten	27
2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.1.2 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren	29
2.2.1.2.1 Präparation des Vektors	29
2.2.1.2.2 Präparation des DNA-Fragments	29
2.2.1.2.3 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	30
2.2.1.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.1.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	31
2.2.1.2.6 Ligation	31
2.2.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien	31
2.2.1.4 Transformation kompetenter Bakterien durch Elektroporation	32

2.2.1.5 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	33
2.2.1.5.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA (Minipräparation)	33
2.2.1.5.2 Großpräparation von Plasmid-DNA (Maxipräparation)	34
2.2.1.6 Überblick über die klonierten Konstrukte und verwendeten Primer	35
2.2.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	35
2.2.2.1 Zellen und Zellkultur	35
2.2.2.2 Isolierung und Kultur von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)	36
2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
2.2.2.4 Stabile Transfektion	38
2.2.3 Murines Cytomegalovirus und Mutanten	38
2.2.3.1 Virusvermehrung und Reinigung von Virionen	39
2.2.3.2 Bestimmung des MCMV-Titers	40
2.2.3.3 Experimentelle Infektion mit MCMV	40
2.2.4 Vaccinia Virus	40
2.2.4.1 Produktion eines Vaccinia-Virusstocks	40
2.2.4.2 Bestimmung des Virustiters eines Vacciniastocks	41
2.2.4.3 Experimentelle Infektion mit Vaccinia-Rekombinanten	41
2.2.5 Immunfluoreszenz	41
2.2.6 Cytofluorometrische Analyse	42
2.2.6.1 Nachweis von Oberflächenantigenen	42
2.2.6.2 Nachweis von intrazellulären Antigenen	43
2.2.7 Immunpräzipitation	44
2.2.7.1 Metabolische Markierung	44
2.2.7.2 Immunpräzipitation	44
2.2.7.3 Re-Immunpräzipitation	46
2.2.7.4 Glycosidase-Verdau	46
2.2.7.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.2.8 Cytotoxizitätstest (⁵¹ Chrom-Freisetzungstest)	49
3 Ergebnisse	50
3.1 Das MCMV Gen <i>m06</i> kodiert für gp48	50
3.2 Die Expression von MCMV <i>m06</i> führt zum Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Plasmamembran	52
3.3 MCMV gp48 reduziert die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation	53
3.4 MHC-Klasse-I-Moleküle und gp48 haben eine reduzierte Halbwertszeit in <i>m06</i> -exprimierenden Zellen	55
3.5 MCMV gp48 bildet einen Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen und Calnexin	57
3.6 β_2 -Mikroglobulin ist für die Bindung von gp48 an MHC-Klasse-I-Moleküle notwendig	59
3.7 Für die Bindung von gp48 an MHC-Klasse-I-Moleküle ist Peptidbeladung nicht erforderlich	61
3.8 Die Degradation von MHC-Klasse-I-Molekülen und gp48 kann durch lysosomale Inhibitoren blockiert werden	63
3.9 Gp48 Moleküle, die nicht mit MHC-Klasse-I-Komplexen assoziiert sind, werden durch das Proteasom abgebaut	65

3.10 Inhibition des lysosomalen Abbaus führt zur Akkumulation von MHC-Klasse-I-Molekülen und gp48 in einem Lamp-1-positiven Kompartiment	66
3.11 Das membrannahe di-Leucin-Motiv im cytoplasmatischen Anteil von gp48 ist für die Proteolyse von MHC-Klasse-I-Molekülen essenziell	68
3.12 Die Transportfunktion, die durch den cytoplasmatischen Anteil von gp48 vermittelt wird, kann auf ein heterologes Protein übertragen werden	72
3.13 Die luminal Domäne von gp48 ist ausreichend für die Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle - eine Membranverankerung ist notwendig	76
3.14 Die gp48 Funktion ist nicht Spezies-spezifisch	79
3.15 Eine N-terminale Epitop-Markierung zerstört die Funktion von gp48	81
3.16 Der Effekt von <i>m06</i> bei der MCMV Infektion	83
4 Diskussion	87
4.1 Das MCMV <i>m06</i> Genprodukt gp48 vermittelt den Transport von MHC-Klasse-I-Molekülen in die Lysosomen	87
4.2 Die Transportfunktion von gp48	89
4.3 MHC-Klasse-I-Assoziation als Vorbedingung für gp48 ER Export und lysosomalen Transport	92
4.4 Die MHC-Klasse-I-bindende Domäne von gp48 im Vergleich mit anderen viralen MHC-Klasse-I-bindenden Proteinen	93
4.5 Vergleich der MHC-spezifischen Funktion von MCMV gp48 mit der von HIV Nef	96
4.6 MCMV gp48 im Viruskontext	98
5 Zusammenfassung	100
6 Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen	101
7 Literaturverzeichnis	104
8 Publikationen	115
9 Danksagung	116
10 Lebenslauf	117

1 Einleitung

1.1 Virale Strategien der Immunevasion

1.1.1 Die Immunantwort gegen virale Erreger

Das Immunsystem von Vertebraten enthält Elemente angeborener und erworbener Immunität. Die angeborene Immunantwort umfasst vor allem die Erkennung von allgemeinen molekularen Mustern wie Kohlenhydrat- und anderer posttranslationaler Modifikationen auf Seiten der Pathogene oder der infizierten Zellen. Eine Hauptrolle spielen dabei Zellen, wie z.B. eosinophile Zellen, Monozyten, Makrophagen und lösliche Mediatoren, wie z.B. Komponenten des Komplementsystems, die entweder selbst bakterizid sind oder zelluläre Funktionen aktivieren, welche zur Elimination der Pathogene führen. Außerdem können virale Infektionen eine sehr effektive antivirale Interferonantwort induzieren. Bei Kontakt des angeborenen Immunsystems mit einem Pathogen, wird es einerseits selbst aktiviert, führt aber andererseits dazu, dass das Immunsystem auf eine spezifische Reaktion gegen das Pathogen vorbereitet wird, d.h. eine erworbene Immunantwort aufbaut. Die erworbene Immunität umfasst zelluläre und humorale Elemente. B- und T-Lymphozyten erkennen über ihre antigenspezifischen Rezeptoren Pathogene oder Komponenten von Pathogenen, die von Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert werden, und werden daraufhin aktiviert. Erhalten die B-Zellen zudem positive Signale von aktivierten T-Helferzellen und von T-Lymphozyten sezernierten Interleukinen, beginnen sie mit der Produktion von antigenspezifischen Antikörpern. Diese Antikörper, zusammen mit Komponenten aus dem Komplementsystem, markieren Pathogene für die Elimination durch spezialisierte Zellen. Auf ähnliche Weise können infizierte Zellen für die Zerstörung durch cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) oder Natürliche Killer- (NK-) Zellen bestimmt werden. Für eine effektive Bekämpfung und Elimination von Pathogenen ist eine Interaktion zwischen angeborener und erworbener Immunität notwendig, welche durch eine Vielzahl von Zellen und durch unterschiedliche lösliche Faktoren vermittelt wird.

Das Vertebratenimmunsystem ist jedoch nicht perfekt; im Laufe der Evolution haben pathogene Organismen, insbesondere Viren, unter hohem Selektionsdruck Strategien entwickelt, um der Immunantwort ihres Wirtes zu entkommen. Die molekulare Analyse solcher Viren offenbart eine Anzahl von viruskodierten Genfunktionen, die auf unterschiedlichste Weise mit dem Immunsystem interferieren. Zum Teil handelt es sich dabei um Genprodukte mit Homologie zu zellulären Immunkomponenten. Es gibt aber auch eine Vielzahl von Virusgenen, für die bisher keine zellulären Homologe beschrieben wurden (Ploegh, 1998).

1.1.2 Antigenpräsentation

Für den Aufbau einer spezifischen Immunreaktion ist zuerst die Präsentation von Peptiden aus Proteinen des Pathogens durch Produkte des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) notwendig. MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren in der Regel cytosolische Peptide den antigenspezifischen Rezeptoren auf CD8⁺ cytolytischen T-Lymphozyten (CTL). Neben der Präsentation von endogenen Peptiden, die aus Proteinen stammen, welche in der Zelle selbst synthetisiert wurden, können auch Peptide aus exogenen Proteinen über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden (Rock, 1996). Im Gegensatz dazu sind MHC-Klasse-II-Komplexe auf die Präsentation von Peptiden, die aus endozytierten Proteinen stammen, spezialisiert. MHC-Klasse-II-Komplexe werden von CD4⁺ T-Helferzellen erkannt, die durch Ausschüttung von Cytokinen B-Lymphozyten zur Proliferation und Produktion von Antikörpern und Makrophagen zur Phagozytose anregen.

1.1.3 MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation

Die Funktion von MHC-Klasse-I-Komplexen ist die Präsentation von Peptiden gegenüber CD8⁺ CTL. Der Zusammenbau und der intrazelluläre Transport der MHC-Klasse-I-Komplexe sind kritische Prozesse im Antigenpräsentationsweg, da nur funktionelle MHC-Klasse-I-Komplexe ihr gebundenes Peptid an der Zellmembran präsentieren können. In der Zelle existieren daher bei jedem Schritt des Zusammenbaus Mechanismen, die gewährleisten, dass Moleküle, die der Qualitätskontrolle nicht entsprechen, nicht an die Zellmembran transportiert werden (Abb. 1).

Die MHC-Klasse-I schwere Kette (hc) und β_2 -Mikroglobulin (β_2 M) werden während der Translation in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Das ER enthält ein Netzwerk von molekularen Chaperonen, die bei der Proteinfaltung, bei der posttranslationalen Modifikation und beim Zusammenbau Hilfsfunktionen übernehmen, ohne selbst Teil des Komplexes zu werden. Die ersten Schritte der Faltung und der Zusammenlagerung von MHC hc und β_2 M werden durch die ER-Chaperone Calnexin (CNX), Calretikulin (CRT) und ER-60 unterstützt (Abb. 1). Calnexin, ein Typ I ER Membranprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 88 kDa, war das erste Protein, welches in einem Komplex mit der MHC hc gefunden wurde (Degen and Williams, 1991). Das luminaire ER Protein Calretikulin weist eine starke Homologie zu der Ektodomäne von Calnexin auf und bindet, wie Calnexin, über seine Lectin-artige Domäne bevorzugt an monoglukosylierte Glykoproteine (Zhang et al., 1995); beide Chaperone sind aber auch in der Lage, Peptidsubstrate zu erkennen und zu binden. Das dritte molekulare Chaperon, die Thiol-abhängige Reduktase ER-60 (Erp57) kann in sehr frühen Komplexen aus MHC hc und Calnexin gefunden werden (Lindquist et al., 1998). ER-60 ist wahrscheinlich bei der Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücken der MHC hc beteiligt, die vor der Assemblierung der MHC hc mit β_2 M stattfindet (Tector et al., 1997). Während Calnexin und ER-60 schon früh nach der

Synthese der MHC hc in einem Komplex mit der hc gefunden werden, bindet Calreticulin bevorzugt an MHC-Moleküle, die bereits mit β_2M -assoziiert sind (van Leeuwen and Kears, 1996). Die Assoziation der hc mit β_2M ist für den Erhalt der intramolekularen Disulfidbrücken und die Stabilisierung der hc notwendig. Steht der MHC hc kein β_2M zur Verfügung, wird sie ins Cytosol transportiert und durch das Proteasom abgebaut (Hughes et al., 1997). Über ein weiteres Chaperon, Tapasin, assoziieren die MHC hc/ β_2M Komplexe mit dem Peptidtransporter TAP (*transporter associated with antigen processing*) (Sadasivan et al., 1996). Tapasin, ein MHC-kodiertes 48 kDa Glykoprotein, kann unabhängig voneinander an TAP und MHC hc/ β_2M /Calretikulin Komplexe binden. In Tapasin-defizienten Zellen ist die MHC-Klasse-I hc-TAP-Assoziation und die Peptidbeladung der MHC-Moleküle gestört (Sadasivan et al., 1996). Die Peptidbeladung der MHC-Moleküle im TAP/Tapasin/MHC hc/ β_2M /Calretikulin-Komplex ist für die Auflösung des Assemblierungskomplexes nicht ausreichend. Es konnte gezeigt werden, dass erst nach Deglukosylierung der *N*-Glykane der MHC hc die trimeren MHC-Klasse-I-Moleküle aus hc, β_2M und Peptid von Calretikulin und TAP dissoziieren und über den sekretorischen Weg an die Zellmembran transportiert werden (van Leeuwen and Kears, 1996).

Neben der Assoziation der MHC hc mit β_2M ist die Bindung hochaffiner Peptide entscheidend für die Stabilität und Transport der MHC-Klasse-I-Komplexe. MHC-Klasse-I-Moleküle ohne gebundenes Peptid werden im ER zurückgehalten und sind bei 37°C instabil (Hughes et al., 1997; Jackson et al., 1992). Die Peptide, die im ER für die Assemblierung der MHC-Klasse-I-Komplexe zur Verfügung stehen, stammen vorwiegend aus cytosolischen Proteinen, die durch Verknüpfung mit dem Polypeptid Ubiquitin (Ub) durch Ubiquitin-konjugierende Enzyme (Ubc) zur Degradation bestimmt wurden. Das Proteasom, ein multikatalytischer Enzym-Komplex, erkennt polyubiquitinierte Proteine und spaltet sie in Peptide nach vorheriger Deubiquitinierung (Coux et al., 1996; Hochstrasser, 1996; Jentsch and Schlenker, 1995). Die ersten Hinweise, dass die Ubiquitin/Proteasom-vermittelte Proteolyse bei der Herstellung antigener Peptide eine entscheidende Rolle spielt, stammen aus der Beobachtung, dass Zellen, die ein defektes Ubiquitin-aktivierendes Enzym E1 haben, nicht in der Lage sind, Peptide über MHC-Klasse-I-Moleküle zu präsentieren (Michalek et al., 1993). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass nach spezifischer Hemmung des Proteasoms, die Klasse-I-restringierte Präsentation von Peptiden inhibiert wurde (Rock et al., 1994). Die cytosolischen Peptide werden durch den MHC-kodierten Peptidtransporter TAP, der sich aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2 zusammensetzt, in ATP-abhängiger Weise in das Lumen des ER transportiert (Momburg and Hämmerling, 1998). TAP transportiert bevorzugt Peptide aus 8 bis 13 Aminosäuren (Momburg et al., 1994), die in ihrer Länge ungefähr den Anforderungen für eine optimale Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle entsprechen (Heemels and Ploegh, 1995). Die Peptidlänge ist letztendlich auf 8 bis 10

Aminosäuren beschränkt, da die Peptid-bindende Grube, die durch die $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domäne der MHC hc gebildet wird, an beiden Enden geschlossen ist (Falk et al., 1991). Sogenannte Ankerpositionen des Peptides bestimmen, ob eine Bindung an ein gegebenes MHC-Klasse-I-Allel möglich ist. Die meisten Peptide enthalten Ankerseitenketten an Position P2, P3 oder P5/P7 und eine C-terminale Ankerseitenkette, die je nach MHC Allel entweder hydrophob oder geladen sein muss (Rammensee, 1995).

Korrekt gefaltete MHC-Klasse-I-Moleküle, die ein Peptid mit geeigneten Ankerpositionen gebunden haben, werden über den konstitutiv sekretorischen Transportweg an die Zellmembran transportiert. Während des Transports werden die Oligosaccharidseitenketten durch Enzyme, welche im ER bzw. im Golgi lokalisiert sind, modifiziert. Die Oligosaccharidseitenketten von Molekülen, die sich vor dem medialen Golgi befinden, sind sensitiv gegenüber Endoglykosidase H (Endo H), d.h. sie können experimentell durch Endo H abgespalten werden. Werden die Mannose-reichen Oligosaccharidseitenketten im Golgi zu komplexen Seitenketten modifiziert, sind sie Endo H resistent (Tarentino and Plummer-TH, 1994).

Neben der Präsentation von endogenen Peptiden, dem „klassischen“ MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentationsweg, sind MHC-Klasse-I-Moleküle auch in der Lage, Peptide aus exogenen Proteinen zu binden und zu präsentieren und dadurch eine CTL Antwort hervorzurufen (Jondal et al., 1996; Rock, 1996). Makrophagen und Dendritische Zellen können z.B. antigene Partikel, Viren und Bakterien aufnehmen und in einem endosomalen/lysosomalen Kompartiment prozessieren. Wie MHC-Klasse-I-Moleküle mit Peptiden aus Endosomen/Lysosomen beladen werden ist noch nicht klar. Es gibt jedoch Hinweise, dass MHC-Klasse-I-Moleküle in T-Zellen (Tse and Pernis, 1984) und in Makrophagen (Dasgupta et al., 1988) von der Zellmembran in das endozytische Kompartiment transportiert werden können. Außerdem ist ein Teil der neusynthetisierten MHC-Klasse-I-Moleküle in der Lage, nach Assoziation mit der MHC invarianten Kette (Ii) direkt in Endosomen/Lysosomen zu gelangen (Sugita and Brenner, 1995). In B-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass ein Teil der internalisierten MHC-Klasse-I-Komplexe vorübergehend im endosomalen/lysosomalen Kompartiment lokalisiert ist und wieder an die Zellmembran transportiert wird, und dass während diesem Recycling der MHC-Klasse-I-Moleküle ein Austausch der gebundenen Peptide stattfindet (Gromme et al., 1999).

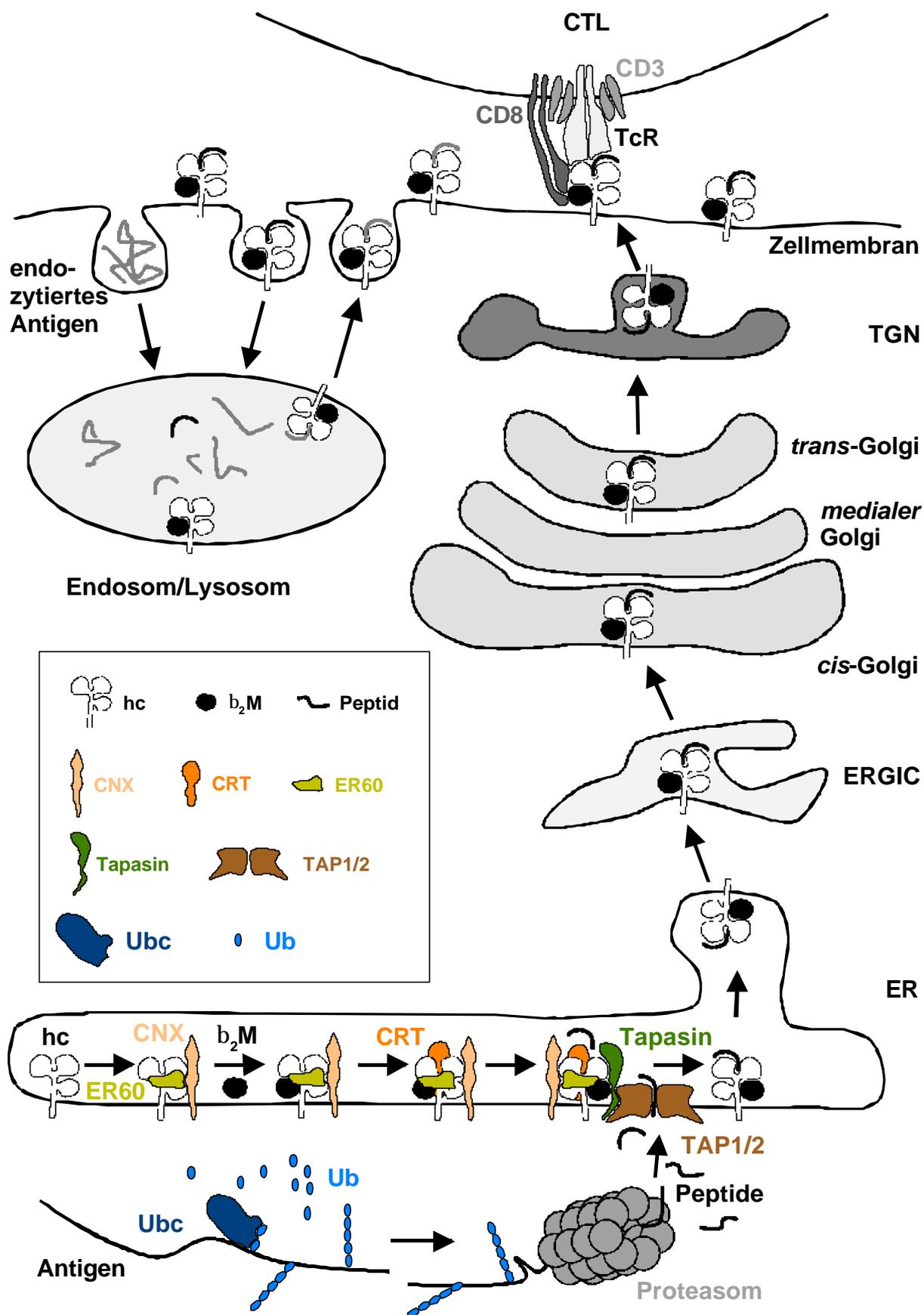


Abb. 1: Der MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentationsweg

Im Cytosol der Zelle werden die zum Abbau bestimmten Proteine durch Ubiquitin-konjugierende Enzyme (Ubc) mit Ubiquitin (Ub) markiert. Das Proteasom erkennt polyubiquitinierte Proteine und spaltet sie in Peptide. Diese werden über den *transporter associated with antigen processing* TAP1/2 in das Lumen des ER transportiert. Im ER erfolgt der Zusammenbau der MHC-Klasse-I-Komplexe aus der MHC-Klasse-I schweren Kette (hc), β_2 -Mikroglobulin (β_2M) und Peptid. Bei der Faltung und Assemblierung der trimolekularen MHC-Klasse-I-Komplexe sind die ER Chaperone Calnexin (CNX), die Thiol-abhängige Reduktase ER-60, Calretikulin (CRT) und Tapasin beteiligt. Korrekt gefaltete und assemblierte Komplexe verlassen das ER und werden über den konstitutiv sekretorischen Transportweg durch das ER/*cis*-Golgi *intermediate compartment* (ERGIC) und den Golgi an die Zellmembran transportiert. Dort erfolgt die Erkennung der MHC-Klasse-I-Moleküle über den T-Zellrezeptor (TcR)-Komplex des cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Der TcR-Komplex besteht aus zwei TcR-Untereinheiten, dem Korezeptor CD8-Heterodimer und vier CD3-Untereinheiten.

Alternativ können in bestimmten Zelltypen (Makrophagen, T- und B-Zellen) MHC-Klasse-I-Moleküle, die internalisiert wurden, in einem endosomalen/lysosomalen Kompartiment mit Peptiden beladen werden, die aus endozytiertem Antigen stammen.

An der Zellmembran können MHC-Klasse-I-Komplexe durch CD8⁺ cytotoxische T-Lymphozyten (CTL), die den geeigneten T-Zellrezeptor (TcR) tragen, erkannt werden und eine Lyse der Zelle durch die CTL induzieren (Abb. 1). Die Erkennung der MHC-Klasse-I-Komplexe erfolgt über die zwei TcR Untereinheiten, die das gebundene Peptid im Kontext der $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domäne der MHC hc binden. Ein CD8-Heterodimer, welches als Korezeptor dient, steigert die Sensitivität einer T-Zelle gegenüber einem über MHC-Klasse-I-präsentiertem Peptid um mehr als das 100-fache. Für den effektiven Transport der TcR-Untereinheiten an die Zellmembran der T-Zelle und für die Signaltransduktion vom TcR in das Zellinnere ist ein CD3 Komplex aus vier Untereinheiten notwendig (Townsend and Bodmer, 1989).

1.1.4 Virale Interferenz mit der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation

Für die Immunkontrolle vieler viraler Infektionen ist die Aktivität von MHC-Klasse-I-restringierten CD8⁺ cytotoxischen T-Lymphozyten entscheidend. Intrazelluläre Pathogene, die die Oberflächenexpression von Klasse I-Molekülen reduzieren, können die Erkennung der infizierten Zelle durch CD8⁺ T-Zellen verhindern, und sich daher für einen längeren Zeitraum in ihrer Wirtszelle vermehren. Die Reduktion von Oberflächen-MHC-Klasse-I-Molekülen ist jedoch nicht ohne Nachteil für das Pathogen, da Zellen mit weniger oder ohne MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran suszeptibel für NK-Zellen sind.

Viren haben im Verlauf der Evolution Strategien entwickelt, um die Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle zu unterbrechen. Die Analyse dieser Virusfunktionen zeigt, dass die viralen Interventionsmechanismen äußerst vielfältig sind und auf den unterschiedlichsten Ebenen des MHC-Klasse-I-Wegs wirken (Abb. 2).

1.1.4.1 Prozessierung antigener Peptide durch das Proteasom

Der erste Schritt in der Generierung antigener Peptide ist die Proteolyse von intrazellulären Proteinen durch einen multikatalytischen Enzymkomplex, dem Proteasom. Bisher gibt es zwei Beispiele für die virale Interferenz mit der cytosolischen Proteolyse.

Die Expression des Phosphoproteins pp65 (ORF *UL83*) des humanen Cytomegalovirus (HCMV) hemmt die Prozessierung des HCMV *immediate-early* Proteins pp72 (*UL123*) zu antigenen T-Zellepitopen. Ein mutiertes pp65 Protein, das seine Kinase-Aktivität verloren hat und daher pp72 nicht mehr phosphorylieren kann, erlaubt die Prozessierung von pp72. Es wird deshalb angenommen, dass die pp65-vermittelte Phosphorylierung von pp72 dessen Proteolyse zu antigenen Peptiden limitiert (Abb. 2) (Gilbert et al., 1996).

Als zweites Protein, welches mit der proteasomalen Degradation interferiert, wurde das Epstein-Barr Virus-kodierte Kernprotein EBNA-1 beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Glycin-Alanin-Wiederholungen aus EBNA-1 *in cis* die ATP/Ubiquitin/Proteasom-abhängige Degradation von EBNA-1 hemmen (Abb. 2). Die Insertion der Glycin-Alanin-Wiederholungen in EBNA-4 führte unabhängig der Insertionsstelle zu einer Hemmung des proteasomalen Abbaus von EBNA-4. Die Ubiquitinierung von EBNA-4 wurde jedoch durch die Insertion der Glycin-Alanin-Sequenz nicht beeinträchtigt (Levitskaya et al., 1997).

1.1.4.2 Peptidtransport

Die im Cytosol prozessierten Peptide müssen, um an Klasse I-Moleküle binden zu können, über den Peptidtransporter TAP1/2 ins Lumen des ER transportiert werden. Herpes simplex virus Typ 1 (HSV-1) und HSV-2 kodieren für einen Polypeptidinhibitor von TAP, das *ICP47* Genprodukt (Abb. 2). Das cytosolische ICP47-Polypeptid bindet kompetitiv mit hoher Affinität an die einzige Peptidbindestelle von TAP. Da die natürlich prozessierten Peptide meist eine geringere Affinität zu TAP aufweisen, werden sie mit viel geringerer Frequenz von TAP ins ER Lumen transportiert. Die Folge ist ein Mangel an geeigneten Peptiden im ER-Lumen und die Retention von Klasse I Komplexen (Früh et al., 1995; Hill et al., 1995; Tomazin et al., 1996; York et al., 1994).

HCMV inhibiert den TAP-medierten Transport cytosolischer Peptide in das ER auf eine andere Weise. Das *US6*-kodierte Typ-1 Membranglykoprotein, welches an den Assemblierungskomplex bestehend aus TAP1/2, MHC-Klasse-I/ β_2 M, Calreticulin und Tapasin, und an Calnexin bindet, hemmt den TAP-Komplex von der Seite des ER Lumens (Abb. 2). Die Hemmung von TAP durch gpUS6 ist unabhängig von der Assoziation von TAP mit MHC-Klasse-I schwerer Kette und Tapasin (Ahn et al., 1997; Hengel et al., 1997).

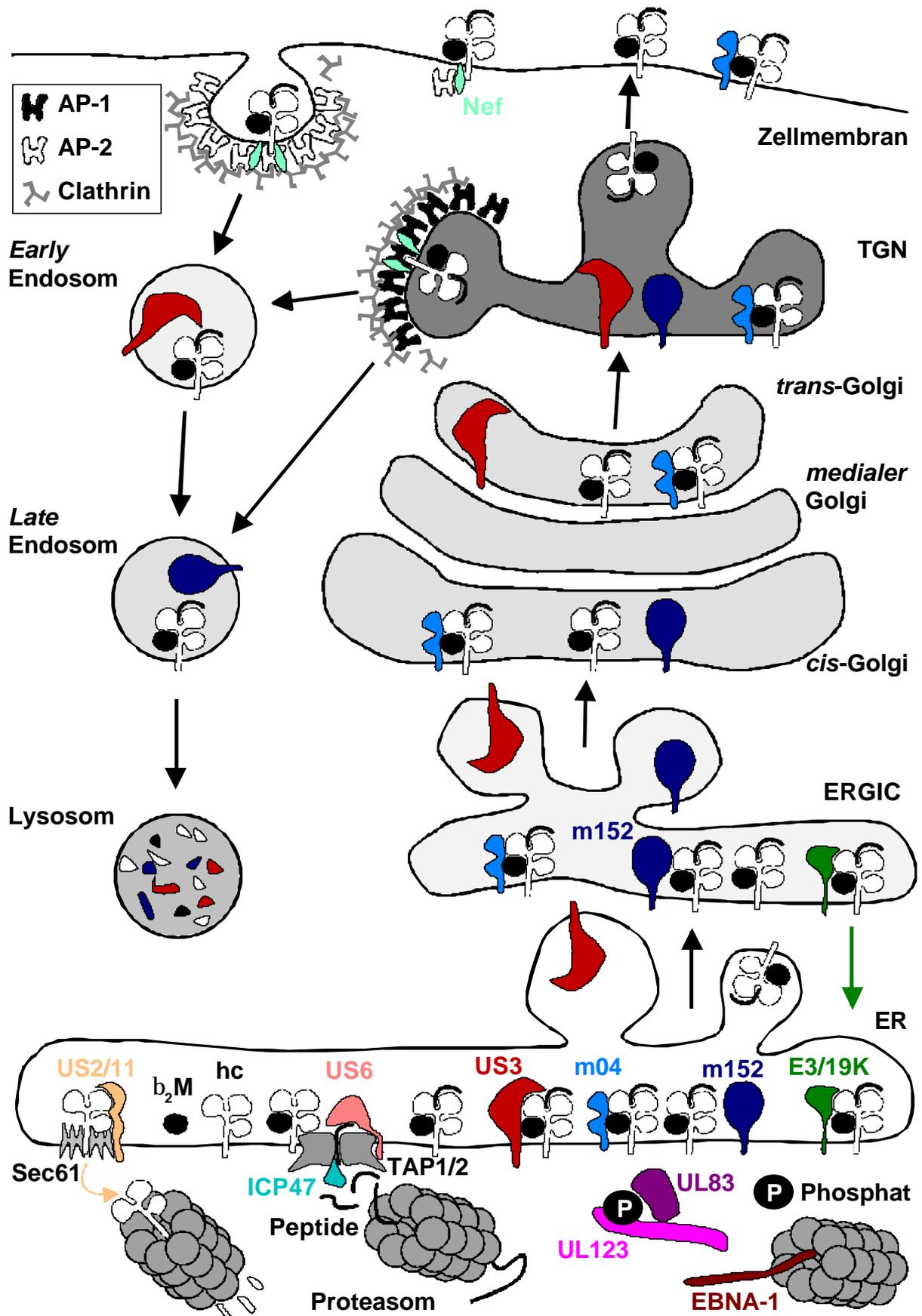


Abb. 2: Virale Interferenz mit der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation

Cytosolische Proteine werden durch die proteolytische Aktivität des Proteasoms zu kurzen Peptiden prozessiert, die über den TAP1/2 Komplex (*transporter associated with antigen processing*) in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert werden. Im ER werden MHC-Klasse-I-Heterodimere, bestehend aus MHC-Klasse-I schwerer Kette (hc) und β_2 -Mikroglobulin (β_2M), mit geeigneten Peptiden beladen. Nur trimolekulare MHC-Klasse-I-Komplexe sind in der Lage, das ER zu verlassen, über den konstitutiv sekretorischen Transportweg durch den Golgi-Apparat an die Zellmembran transportiert zu werden, und die gebundenen Peptide dem T-Zell-Rezeptor von $CD8^+$ Zellen zu präsentieren. Das *UL83* Genprodukt (pp65) des humanen Cytomegalovirus (HCMV) phosphoryliert das *immediate-early* HCMV Protein pp72 (*UL123*), und verhindert dadurch die proteasomale Prozessierung von pp72. Ein Glycin-Alanin Repeat des Epstein-Barr Virus Kernproteins EBNA-1 hemmt in *cis* die Degradation durch das Proteasom. ICP47 von Herpes Simplex Virus Typ 1 und 2 hemmt den TAP-Transporter indem es mit den cytosolischen Peptiden um die Peptidbindestelle des TAP Transporters kompetitiert. Das US6 Glykoprotein des humanen Cytomegalovirus (HCMV) hemmt, ebenfalls den Peptidtransport via TAP1/2 jedoch von Seiten des ER-Lumens. Die von HCMV *US2* und *US11* kodierten Glykoproteine führen unabhängig voneinander zur Dislokation der neusynthetisierten MHC-Klasse-I schweren Kette über den Sec61-Komplex (Translokon) zurück ins Cytosol, wo die schwere Kette durch das Proteasom degradiert wird. Das HCMV *immediate-early* Protein US3 retentiert vollständig assemblierte MHC-Klasse-I-Komplexe im ER über einen bislang unbekanntem Mechanismus. Das US3 Protein selbst verlässt das ER und wird lysosomal degradiert. Über ein di-Lysin-Signal in seinem cytoplasmatischen Anteil führt das Adenovirus 2 Protein E3/19K MHC-Klasse-I-Komplexe aus post-ER Vesikeln zurück in das ER. Das Mauscytomegalovirus (MCMV) Protein gp34, kodiert durch *m04*, bindet im ER an vollständig assemblierte MHC-Moleküle und geht als Komplex an die Zellmembran, um eine bisher unbekannt Funktion auszuüben. Das Genprodukt von MCMV *m152*, gp40, welches selbst in den Lysosomen degradiert wird, führt zur Retention von MHC-Klasse-I-Komplexen im ER/*cis*-Golgi *intermediate compartment* (ERGIC), wobei eine permanente Interaktion zwischen gp40 und MHC-Molekülen nicht notwendig ist. Die Expression von HIV-1 Nef führt zur Endozytose und lysosomalen Degradation von MHC-Klasse-I-Molekülen, indem es über Adaptorprotein-2 Komplexe (AP-2) die Ausbildung von Clathrin-coated Vesikeln an der Zellmembran vermittelt. Außerdem konnten in Nef-exprimierenden Zellen MHC-Moleküle am *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) mit AP-1 Komplexen kolokalisiert werden, die für die Ausbildung von Clathrin-coated Vesikeln am TGN notwendig sind.

1.1.4.3 Retention von MHC-Klasse-I-Komplexen

Nach dem vollständigen Zusammenbau von MHC-Klasse-I schwerer Kette, β_2M und Peptid zu einem trimolekularen Komplex im ER, haben Klasse I Komplexe alle Voraussetzungen, um das ER zu verlassen und über den sekretorischen Weg an die Zellmembran transportiert zu werden. Verschiedene Viren kodieren jedoch für Proteine, die auf ganz unterschiedliche Weise den anterograden ER-Golgi Transport von Klasse I Komplexen unterbinden.

Als erstes Protein, welches mit dem MHC-Klasse-I-Transport interferiert, wurde das Protein E3/19K von Adenovirus Typ 2 beschrieben. E3/19K bindet über seinen luminalen Teil an neu assemblierte MHC-Klasse-I-Komplexe und führt über das ER-*retrieval* Signal di-Lysin (KKXX) in seinem cytoplasmatischen Carboxyterminus zum Rücktransport von MHC-Klasse-I-Komplexen, welche das ER bereits verlassen haben (Abb. 2)(Burgert and Kvist, 1985; Jackson et al., 1990). Auf ganz ähnliche Weise führt die Expression von HCMV *US3* zur Retention von Klasse I-Komplexen im ER. Das US3 Protein, welches ebenfalls direkt an MHC-Moleküle binden kann, verlässt zumindest zu einem gewissen Anteil das ER. Es konnte jedoch noch kein Retentions- oder *retrieval* Signal gefunden werden, das zur permanenten Retention von MHC-Molekülen führt

(Abb. 2)(Ahn et al., 1996; Jones et al., 1996). Für die Retention von MHC-Klasse-I-Molekülen nach Infektion mit dem murinen Cytomegalovirus (MCMV) wurde das Genprodukt von *m152*, gp40, als verantwortliches Virusprotein beschrieben (Abb. 2)(Ziegler et al., 1997). Phänotypisch verhalten sich MHC-Klasse-I-Komplexe in der Gegenwart von gp40 wie Moleküle in E3/19K- oder US3-positiven Zellen: sie sind mit Peptid beladen, ihre Halbwertszeit ist nicht verkürzt, und ihre N-verknüpften Oligosaccharidseitenketten bleiben sensitiv gegenüber Endoglykosidase (Endo) H, d.h. sie wurden nicht durch Golgi-residente Enzyme zu komplexen Oligosaccharidseitenketten modifiziert. Im Gegensatz zu E3/19K und US3 verbleiben die durch gp40 retentierten Moleküle nicht im ER, sondern im ER/*cis*-Golgi *intermediate* Kompartiment. Außerdem konnte für MCMV gp40 noch keine direkte oder indirekte Interaktion mit MHC-Molekülen gezeigt werden. gp40 verlässt wie das US3 Protein das Kompartiment der MHC-Retention und wird Endo H-resistent (Ziegler et al., 1997).

1.1.4.4 ER-assoziierte Degradation von MHC-Klasse-I-Molekülen

Die Produkte der zwei HCMV Gene *US2* und *US11* inhibieren den MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg über einen Mechanismus, der auf einen bis dahin nicht beschriebenen Transportweg beruht. Beide Proteine binden an neusynthetisierte MHC-Klasse-I schwere Ketten und leiten sie über den Sec61-Komplex zurück ins Cytosol, wo schwere Kette und das *US2*-, nicht aber das *US11*-Genprodukt zuerst deglykosyliert und dann durch das Proteasom abgebaut werden (Abb. 2)(Wiertz et al., 1996a; Wiertz et al., 1996b). Das Vorhandensein des cytoplasmatischen Anteiles der schweren Kette ist für die *US2*- und *US11*-vermittelte Dislokation der MHC-Klasse-I schweren Kette essenziell, nicht jedoch für die Bindung von *US2* bzw. *US11* an das MHC-Klasse-I-Genprodukt (Story et al., 1999). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression dieser beiden Proteine des humanen CMV nicht nur zur Degradation von humanen MHC-Klasse-I-Molekülen führen, sondern auch die Stabilität von murinen MHC-Klasse-I-Moleküle beeinträchtigen, wobei sich *US2* und *US11* in ihrer Allelpräferenz unterscheiden (Machold et al., 1997).

Das HIV-1 integrale Phosphoprotein Vpu, welches auch in der Lage ist, ER-assoziierte Degradation des viralen Korezeptors CD4 zu vermitteln, führt zum rapiden Verlust von neusynthetisierten MHC-Klasse-I-Molekülen, die noch nicht das ER verlassen haben (Kerkau et al., 1997). Der molekulare Mechanismus, über den Vpu den Klasse I Antigenpräsentationsweg behindert, ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

1.1.4.5 Internalisierung und lysosomale Degradation von MHC-Klasse-I-Molekülen

Wenn MHC-Klasse-I-Moleküle über den sekretorischen Transportweg die Zellmembran erreicht haben, präsentieren sie ihr gebundenes Peptid CD8⁺ Lymphozyten und können bei geeignetem Antigen eine cytotoxische T-Zellantwort induzieren. Die Präsentation antigener Peptide über Klasse I-Moleküle kann jedoch durch virale Proteine beeinträchtigt werden, wenn die MHC-Moleküle bereits die Zellmembran erreicht haben.

HIV-1 Nef, das die Endozytose von CD4 vermittelt (Oldridge and Marsh, 1998), führt in lymphoiden Zellen zur Endozytose und Degradation von oberflächenresidenten MHC-Klasse-I-Molekülen (Schwartz et al., 1996). In Nef-exprimierenden Fibroblasten dagegen werden Klasse I-Moleküle internalisiert und akkumulieren im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) (Greenberg et al., 1998). Für die MHC-Klasse-I-spezifische Funktion ist auf der Seite von Nef ein Prolin-Motiv, welches SH3-Domänen binden kann, und eine Reihe saurer Aminosäurereste essenziell (Greenberg et al., 1998). Für die humanen MHC-Klasse-I-Moleküle HLA-A und -B, nicht aber für HLA-C und -E, ist ein auf Tyrosin basierendes Transportmotiv (YXX ϕ , wobei X für eine beliebige und ϕ für eine hydrophobe Aminosäure steht) im cytoplasmatischen Anteil gefunden worden, das in der Gegenwart von Nef als Internalisierungssignal dient (Cohen et al., 1999; Le Gall et al., 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass Nef mit der μ 1 und μ 2 Untereinheit der tetrameren Adaptor (AP)-Komplexe AP-1 bzw. AP-2 interagiert (Le Gall et al., 1998). Vermutlich verändert Nef diese Adaptor Komplexe, die einerseits Transmembranproteine, wie z.B. Rezeptoren, andererseits auch Clathrin an Membranen zur Formierung von Clathrin-*coated pits* und schließlich zur Ausbildung Clathrin-*coated* Vesikeln rekrutieren, dass es zur Endozytose von CD4 bzw. MHC-Klasse-I-Molekülen kommt (Abb. 2).

1.1.4.6 Virale Inhibition der Natürlichen Killer Zellen

NK-Zell-Reaktivität besteht unabhängig von bereits vorhandener Infektion oder Immunisierung des Wirtes. NK-Zellen sind vor allem in der frühen Phase einer Infektion für die Zerstörung von infizierten Zellen wichtig. Sie sind nicht MHC-restringiert und exprimieren keinen T-Zell-Rezeptor (TcR). Die Lyse durch NK-Zellen wird normalerweise durch inhibitorische Signale verhindert, die durch die Erkennung von autologen MHC-Molekülen über NK-inhibitorische Rezeptoren (KIR) vermittelt werden (Kärre and Welsh, 1997). Führt die Virusinfektion zum Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Plasmamembran, wird die Zelle suszeptibel gegenüber NK-Zellen. Viren haben jedoch auch Mechanismen entwickelt, eine NK-Antwort zu verhindern.

Für HIV-1 konnte *in vitro* gezeigt werden, dass, nach selektivem Verlust von HLA-A und -B durch Nef, die nicht von Nef beeinträchtigten Moleküle HLA-C und -E ausreichen, um eine Lyse der infizierten Zellen durch NK-Zellen zu verhindern (Cohen et al., 1999).

Sowohl das murine als auch das humane Cytomegalovirus kodiert für ein MHC-Klasse-I-Homolog, welches als inhibitorischer Ligand für NK-Rezeptoren dient. *In vivo* Experimente mit einer MCMV-Mutante, bei der das MHC-Homolog *m144* deletiert ist, haben gezeigt, dass das Virus ohne *m144* in der akuten Phase der Infektion nur sehr limitiert replizieren kann. Wurden die Mäuse vor der Infektion für NK-Zellen depletiert, war der attenuierte Phänotyp der Mutante im Vergleich zu Wildtyp (wt)-Virus aufgehoben (Farrell et al., 1997). Kontrovers diskutiert wird der Effekt des HCMV MHC Homologs *UL18*. Mit *UL18*-transfizierten lymphoiden Zellen konnte gezeigt werden, dass das HCMV MHC Homolog über CD94, ein C-Typ Lectin, welches auf den meisten NK-Zellen exprimiert wird, eine Lyse der Zelle durch NK-Zellen verhindert (Reyburn et al., 1997). Ein weiterer Rezeptor für UL18 stellt LIR-1 (*leucocyte immunoglobulin-like receptor*) dar, welcher vor allem in Monozyten und B-Zellen exprimiert wird (Cosman et al., 1997). Welche Funktion die UL18-LIR-1 Interaktion hat, ist jedoch noch nicht geklärt.

Im Gegensatz dazu haben Infektionsexperimente mit einem *UL18 knockout* Virus und Experimente mit *UL18*-transfizierten Epithelzellen gezeigt, dass die Expression von *UL18* die Lyse der Zielzellen durch NK-Zellen erhöht, und dass es *UL18*-abhängige und -unabhängige Mechanismen gibt, die die Suszeptibilität CMV-infizierter Zellen gegenüber NK-Zellen vermitteln, bei der weder KIR noch CD94 eine Rolle spielen (Leong et al., 1998).

1.2 Herpesviren

Die Familie der *Herpesviridae* umfaßt mehr als 100 verschiedene tier- und humanpathogene Viren. Ein typisches Herpesvirion besteht aus vier Strukturkomponenten. Im Zentrum befindet sich ein Kernbereich (core), der die doppelsträngige, lineare DNA enthält. Dieser Kernbereich wird von einem 100 bis 110 nm großen ikosadeltahedralen Kapsid umschlossen, das aus 12 pentameren und 150 hexameren Kapsomeren aufgebaut ist. Kernbereich und Kapsid werden auch als Nukleokapsid bezeichnet. Das Kapsid wird umhüllt von einer amorphen Substanz (Tegument), die aus elektronendichtem Material besteht und in ihrer Dicke variieren kann; sie ist höchst wahrscheinlich für den unterschiedlichen Durchmesser der verschiedenen Herpesvirionen (von 120 nm bis fast 300 nm) verantwortlich. Eine Membran zellulärer Herkunft bildet eine Hülle (*envelope*) um Nukleokapsid und Tegument und enthält eingelagert viruskodierte Glykoproteine (*spikes*).

Die Genome der Herpesviren unterscheiden sich sowohl in der Größe als auch im GC-Gehalt. Der GC-Gehalt variiert zwischen 32% beim Caninen Herpesvirus und 75% beim Herpesvirus simiae. Das Varizella Zoster Virus (VZV) besitzt unter den bisher beschriebenen Herpesviren mit

ca. 125 kbp das kleinste, das humane und das murine Cytomegalovirus (HCMV bzw. MCMV) mit 229,354 kbp (Stamm AD169) bzw. 230,278 kbp (Stamm Smith) das größte Genom mit einer Kodierkapazität für ca. 200 Proteine (Chee et al., 1990; Rawlinson et al., 1996). Obwohl die Länge der DNA für jedes Herpesvirus spezifisch ist, können die Unterschiede in der Genomgröße innerhalb einer Virusspezies bei unabhängigen Isolaten bis zu 10 kbp betragen, was meist eine unterschiedliche Anzahl an terminalen oder internen repetitiven Sequenzen widerspiegelt. Solche terminalen und/oder internen repetitiven Sequenzen sind typisch für bestimmte Herpesviren (z.B. Epstein-Barr Virus (EBV), VZV, Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1), HCMV). Durch Inversionen von Genomsegmenten an diesen Repetitionen können isomere Formen des Virusgenoms entstehen; beispielsweise sind bei VZV zwei isomere Formen des Genoms möglich, bei HSV-1 und HCMV vier.

Eine weitere Eigenheit aller Herpesviren ist das Vorhandensein von virusspezifischen Enzymen und anderen Faktoren, die an der Nukleinsäuresynthese (z.B. DNA-Polymerase, Helicase, Primase) und am DNA-Stoffwechsel (z.B. Thymidin-Kinase, dUTPase) beteiligt sind. Außerdem kodieren alle Herpesviren für mindestens eine Protease und eine unterschiedliche Anzahl an Proteinkinasen.

Die virale DNA-Synthese und der Zusammenbau des Kapsids findet bei den Herpesviren im Nukleus der Wirtszelle statt. Beim Durchtritt des Kapsids durch die Kernmembran kommt es zu einer Umhüllung des Kapsids; bei manchen Herpesviren wird diese erste Hülle entfernt und durch eine neue Membran aus cytoplasmatischen Organellen (z.B. endosomale Zisterne bei HCMV) ersetzt. Ein weiteres typisches Kennzeichen der Herpesviren ist die irreversible Zerstörung der Wirtszelle bei der Produktion von infektiösen Virusnachkommen. Das wohl wichtigste und bei allen Herpesvirusspezies nachgewiesene Charakteristikum ist die Fähigkeit, zumindest im natürlichen Wirt nach einer oftmals symptomlosen Erstinfektion in den Zustand der Latenz überzugehen und lebenslang im Wirt zu verbleiben. In latent infizierten Zellen liegt das Virusgenom als geschlossener Ring vor, und es werden nur wenige virale Gene exprimiert. Während der Latenz können aus dem infizierten Gewebe keine infektiösen Virionen isoliert werden. Durch bestimmte endogene und exogene Faktoren (z.B. Stress, Immunsuppression) kann es zu einer Reaktivierung der Infektion und gegebenenfalls zu einer Entwicklung von Krankheitssymptomen kommen.

Die Familie der *Herpesviridae* kann vor allem aufgrund verschiedener biologischer Eigenschaften in die drei Unterfamilien *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* und *Gammaherpesvirinae* aufgeteilt werden. Die α -Herpesviren sind dadurch charakterisiert, dass sie ein breites Wirtsspektrum und einen kurzen Replikationszyklus aufweisen. Die Infektion breitet sich in Zellkultur schnell aus und führt zu einer effizienten Zerstörung von infizierten Zellen. α -Herpesviren etablieren in sensorischen Ganglien eine latente Infektion. Wichtige humanpathogene Vertreter der α -Herpesviren sind die

Herpes simplex Viren Typ 1 (HSV-1) und Typ 2 (HSV-2), die Bläschenbildung im Lippen- und Genitalbereich verursachen, und das Varizella Zoster Virus (VZV), der Erreger von Windpocken und Gürtelrose.

Die β -Herpesviren zeigen im Gegensatz zu den α -Herpesviren eine ausgeprägte Wirtsspezifität, einen langen Vermehrungszyklus und eine langsame Ausbreitung in der Zellkultur. Die infizierten Zellen sind häufig vergrößert (Cytomegalie), was bei der Namensgebung einiger β -Herpesviren (z.B. HCMV, MCMV) zum Ausdruck kommt. Die β -Herpesviren können in verschiedenen Zellen und Geweben Latenz etablieren.

Die γ -Herpesviren zeichnen sich durch eine enge Wirtsspezifität aus; meist beschränkt sich ihr Wirtsspektrum auf die Familie, aus der ihr natürlicher Wirt stammt. In vitro können alle γ -Herpesviren in lymphoblastoiden Zellen replizieren und führen teilweise zu lytischen Infektionen in Epithelzellen und Fibroblasten. Diese Herpesvirusgruppe hat eine Selektivität für T- bzw. B-Lymphozyten, in denen bevorzugt latentes Virus nachgewiesen werden kann. Als bekannteste humanpathogene Vertreter sind das Epstein-Barr Virus (EBV) und das humane Herpesvirus 8 (HHV-8) zu erwähnen. Das B-Zell-spezifische Epstein-Barr Virus, der Erreger des Pfeifferschen Drüsenfiebers, wird im afrikanischen Raum mit der Entwicklung des Burkitt-Lymphoms und in Süd-Ost-Asien mit dem Nasopharynxkarzinom assoziiert. Das HHV-8 wurde erstmals aus einem AIDS-assoziierten Kaposi Sarkom isoliert, und wird seither als kausales Agens von Kaposi Sarkomen, bestimmten B Zell-Lymphomen (*primary body cavity-based lymphoma*) und der lymphoproliferativen Castleman'schen Krankheit angesehen (Ganem, 1997); (Roizman, 1996).

1.2.1 Der Replikationszyklus der Herpesviren

Die Infektion einer Zelle beginnt mit der spezifischen Bindung von Virushüllproteinen an Rezeptormoleküle auf der Oberfläche der Wirtszelle. Nach der Adsorption des Virions kommt es zur Fusion der Virushülle mit der Zellmembran und zur Freisetzung des Nukleokapsids ins Cytoplasma. Das enthüllte Virusgenom wird zirkularisiert und in den Zellkern transportiert, dem Ort der Transkription und Replikation. Die replizierte Virus-DNA wird in Kapside eingelagert, die durch Knospung (*budding*) an der inneren Kernmembran ihre erste Hülle erhalten. Die erste Membranhülle wird je nach Herpesviruspezies an einem anderen cytoplasmatischem Membrankompartimenten durch eine neue Hülle ersetzt, und das Nachkommenvirion kann anschließend durch Exocytose ausgeschleust werden.

Die Genexpression bei Herpesviren ist kaskadenartig reguliert und kann in drei zeitlich koordinierte Phasen eingeteilt werden: *immediate-early* (IE), *early* (E) und *late* (L) Phase (Hones and Roizman, 1974). Die *immediate-early* Phase beginnt unmittelbar nach der Infektion. Für die Transkription der IE Gene ist keine *de novo* Synthese viraler Proteine notwendig. Die IE Proteine

besitzen vor allem regulatorische Funktionen, und zumindest ein IE Protein ist für die Initiation der *early* Phase notwendig (Hones and Roizman, 1975). Die Aktivierung der *early* Gene erfolgt vornehmlich auf transkriptioneller Ebene (Godowski and Knipe, 1986). Während der *early* Phase werden Proteine hergestellt, die für die Replikation des viralen Genoms benötigt werden (z.B. virale DNA-Polymerase). Der Beginn der DNA-Replikation definiert den Anfang der *late* Phase. In der *late* Phase werden vor allem Strukturproteine synthetisiert, die für die Bildung der Virionen notwendig sind.

Experimentell kann der Replikationszyklus in den einzelnen Phasen durch Inhibitoren arretiert werden. Erfolgt die Infektion in Gegenwart des Translationshemmers Cycloheximid (CHX), so werden nur die IE Gene transkribiert. Wird das CHX durch den Transkriptionshemmer Actinomycin D (ActD) ersetzt, können die akkumulierten IE Transkripte in IE Proteine translatiert, jedoch keine späteren Gene transkribiert werden. Bei Hemmung der viralen DNA-Polymerase durch Phosphonoessigsäure (PAA) werden IE und E Gene exprimiert, jedoch keine L Gene, da die Expression der L Gene erst nach Beginn der DNA-Replikation erfolgt (Cozzarelli, 1977).

1.3 Cytomegaloviren

Cytomegaloviren sind die am besten untersuchten Viren der β -Herpesvirusgruppe. Sie können eine Vielzahl an Zellen *in vivo* infizieren: Makrophagen/Monozyten, Endothelzellen, Epithelzellen u.a.. Cytomegaloviren besitzen eine Kodierungskapazität für mehr als 200 Proteine, mehr als doppelt so viel wie HSV. CMV besitzt ein großes Repertoire an Proteinen, die mit zellulären Funktionen des Immunsystems interferieren. Warum CMV so viele, z.T. redundante Mechanismen entwickelt hat, um das Immunsystem zu unterlaufen, ist noch unbekannt.

CMV sind ubiquitäre Vertreter der Herpesvirusfamilie und äußerst Spezies-spezifisch. Es gibt keinen Hinweis, dass es *in vivo* zu längeranhaltenden Infektionen über Speziesgrenzen hinweg kommt.

Auf Sequenzanalysen basierende Daten sprechen dafür, dass CMVs zusammen mit ihren Wirten und deren Immunsystem eine Koevolution durchlaufen haben. Gene im zentralen Bereich des MCMV Genoms und in der *unique long* (U_L) Region von HCMV kodieren v.a. für Funktionen, die für die Replikation essenziell sind und eine deutliche Homologie zu Genen anderer Herpesviren zeigen. In den terminalen Genomabschnitten von MCMV und der *unique short* (U_S) Region von HCMV liegen immunmodulatorische Gene, und solche Gene, die geringe oder keine Homologie zu anderen CMV oder Herpesvirusgenen aufweisen.

Viele Aspekte der Biologie von HCMV und MCMV sind vergleichbar. Beide infizieren ähnliche Organe (Leber und Milz bei einer Primärinfektion, Lunge bei einer wiederkehrenden Infektion,

und die Speicheldrüsen als Organe der Persistenz) und Zelltypen (Epithelzellen, Endothelzellen, Makrophagen/Monozyten), und beide Viren können aus diesen Organen während einer akuten Infektion isoliert werden. Außerdem rufen sowohl HCMV als auch MCMV im latent infizierten Wirt, der zunächst asymptomatisch war, nach Immunsuppression ernsthafte Krankheits Symptome hervor.

Es gibt jedoch auch Unterschiede zwischen HCMV und MCMV, die wahrscheinlich durch zelluläre als auch durch virale Faktoren bedingt sind. HCMV kann, im Gegensatz zu MCMV, die Plazenta passieren und congenitale Infektionen verursachen. HCMV und MCMV unterscheiden sich außerdem gravierend in der Dauer ihres Replikationszyklus: während der Zyklus von HCMV ca. 72 h dauert, benötigt MCMV nur ca. 24 h für eine Replikationsperiode.

1.3.1 Die klinische Bedeutung der CMV-Infektion

Serologische Untersuchungen zeigen, dass sich im Laufe ihres Lebens 50-95% der Menschen mit HCMV infizieren. Die Unterschiede in der Seroprävalenz können auf die geographische Lage, sozioökonomischen Status, und auf unterschiedliche Sexualpraktiken zurückgeführt werden. HCMV kann sowohl vertikal (intrauterin) als auch horizontal (extrauterin) übertragen werden. Virus konnte bisher in Speichel, Urin, Cervix- und Vaginalsekret, Samenflüssigkeit, Muttermilch, Tränenflüssigkeit, Stuhl und Blut nachgewiesen werden.

Wie bei anderen Herpesviren, folgt einer Primärinfektion mit HCMV eine persistente Infektion. Aus der Latenz, der nichtproduktiven Phase von HCMV, kann das Virus durch endogene und exogene Faktoren reaktiviert werden, und zu immer wiederkehrenden Infektionen und Virusfreisetzung führen.

Wie sich eine HCMV-Infektion entwickelt, d.h. ob es zu klinisch apparenten Symptomen kommt, wird vor allem durch den immunologischen Status des Individuums bestimmt. Die Primärinfektion eines immunkompetenten Wirtes verläuft in der Regel klinisch inapparent, und nur selten kommt es zu Mononukleose-ähnlichen Syndromen. Wird jedoch eine immunsupprimierte, immundefiziente oder immunologisch nicht ausgereifte Person infiziert, kann HCMV zu ernsten, zum Teil lebensbedrohlichen Komplikationen führen.

Intrauterine HCMV-Infektionen können, abhängig von der Dauer der Schwangerschaft, zu starken Schädigungen des Föten und eventuell zum Abort führen. Bei Neugeborenen mit kongenitalen Infektionen kann es besonders häufig zu Schädigungen des Gehirns (Mikrocephalie), der Augen (Chorioretinitis), des Gehörs und zur Hepatosplenomegalie kommen. Bei AIDS Patienten stellt HCMV einen der wichtigsten opportunistischen Infektionserregern dar. Etwa 90% der Patienten mit AIDS erfahren eine primäre oder rezidivierende HCMV-Infektion, was zu klinischen Symptomen in fast allen Organsystemen führt, wobei die Lunge, das ZNS und der

Gastrointestinaltrakt am stärksten befallen wird. Die CMV-Retinitis ist bei AIDS-Patienten die häufigste mit CMV assoziierte Komplikation.

Für allogene Knochenmarktransplantatempfänger stellt die CMV Infektion die häufigste virusbedingte Todesursache dar. Die Sterblichkeitsrate liegt bei einer unbehandelten CMV-Pneumonie zwischen 80 und 90%. Außerdem gibt es Hinweise, dass die CMV-Infektion mit der Abstoßungsreaktion *graft versus host disease* (GVHD) assoziiert sein kann. Aber auch bei Empfängern von soliden Organen kann eine CMV-Infektion zu Komplikationen nach der Transplantation und zum Organversagen führen. (Britt and Alford, 1996)

1.3.2 Murines Cytomegalovirus

1.3.2.1 Kontrolle der MCMV-Infektion durch das Immunsystem

Die MCMV-Infektion wird seit mehr als zwei Jahrzehnten als Modell einer CMV-Infektion untersucht und zeigt viele Vorteile gegenüber Arbeiten mit HCMV. Für das *in vivo* als auch das *in vitro* Studium der MCMV-Infektion stehen eine Reihe von Mäusestämmen und die unterschiedlichsten *knock out* Mäuse und transgene Mäuse bzw. Zelllinien zur Verfügung. Darüberhinaus ist die Replikation von MCMV im Vergleich zu HCMV schneller und effizienter. Da MCMV in einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen repliziert, ist die Immunkontrolle der MCMV-Infektion komplex. Das angeborene als auch das erworbene Immunsystem spielt dabei eine entscheidende Rolle (Koszinowski, 1991).

Verschiedene Komponenten des angeborenen Immunsystems, vor allem NK-Zellen, sind mit der Suszeptibilität des Wirtes für eine MCMV-Infektion assoziiert und bei der Kontrolle einer MCMV-Infektion *in vivo* beteiligt (Orange and Biron, 1996; Orange et al., 1995; Scalzo et al., 1992; Tay et al., 1995). Es gibt in der Maus mindestens zwei genetische Loci für Suszeptibilität gegenüber MCMV. Ein als *cmv-1* bezeichneter Locus liegt in der Region auf Chromosom 6, in der auch NK-Rezeptoren kodiert sind (Scalzo et al., 1995). Mäuse, die sich in diesem Locus unterscheiden, variieren in den Virustitern in der Milz in der akuten Phase um den Faktor 10^3 bis 10^4 , und wenn die NK-Zellen von resistenten Mäusen depletiert werden, erreichen sie Virustiter wie suszeptible Mäuse (Scalzo et al., 1992). Zwei murine NK-Rezeptoren, Ly-49A und NKR-P1, die MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen und inhibitorische Signale in NK-Zellen vermitteln, sind auf Chromosom 6 kodiert und mit *cmv-1* assoziiert.

Für eine effiziente Kontrolle einer MCMV Infektion ist jedoch der Aufbau einer spezifischen Immunantwort notwendig. Während einer akuten Infektion werden antivirale Antikörper produziert und spezifische T-Zellen aktiviert. MCMV spezifische Antikörper sind jedoch nicht essenziell für die Kontrolle einer akuten Infektion, sie verhindern aber die Virusausbreitung nach

Virusreaktivierung aus der Latenz (Jonjic et al., 1994). Bei der Beseitigung einer akuten Infektion in den Visceralorganen spielen cytolytische CD8⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle. Adoptive T-Zell-Transferexperimente und Immunisierungen mit rekombinanten Vacciniaviren zeigten, dass die MHC-Klasse-I-restringierte Präsentation eines Nonapeptids aus dem MCMV *ie1* Protein pp89 und die dafür spezifischen CD8⁺ T-Zellen ausreichen, um Mäuse vor einer lethalen MCMV-Infektion zu schützen (Del Val et al., 1991b; Jonjic et al., 1988; Reddehase et al., 1988; Reddehase et al., 1987). Im Gegensatz dazu sind vor allem CD4⁺ T-Zellen bei der Beseitigung einer akuten MCMV-Infektion der Epithelzellen in der Speicheldrüse beteiligt (Jonjic et al., 1990). Die antivirale Aktivität der CD4⁺ Zellen beruht entweder direkt auf MHC-Klasse-II-restringierten, cytotoxischen Effektormechanismen dieser Zellen, oder wird über die Produktion von Cytokinen, wie Interferon (IFN)- γ und Tumor Necrose Faktor (TNF)- α , vermittelt (Lucin et al., 1992; Pavic et al., 1993). Beide Cytokine hemmen - in synergistischer Weise - sehr effizient die Virusreplikation in der späten Phase und nehmen Einfluß auf die Bildung der viralen Nukleocapside (Lucin et al., 1994).

Obwohl der immunkompetente Wirt eine MCMV-Infektion kontrollieren und daher die Ausbildung von Krankheitssymptomen unterbinden kann, wird eine vollständige Viruselimination nicht erreicht und die Etablierung der Latenz nicht verhindert. MCMV kann aus der latenten Phase der Infektion reaktivieren und zu immer wiederkehrenden Infektionen führen. Bemerkenswerterweise wird die nichtproduktive Phase der Infektion durch eine zelluläre Immunkontrolle reguliert. Dabei verhindern sowohl CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen als auch CD4⁺ T-Zellen auf hierarchische und redundante Weise eine Virusreplikation und Ausbreitung nach Reaktivierung (Polic et al., 1998).

1.3.2.2 Beeinträchtigung der Antigenpräsentation durch CMV

Um permanent zusammen mit ihrem Wirt existieren zu können, haben CMV Strategien entwickelt, um eine Kontrolle durch das Immunsystems zu begrenzen. Hierzu zählt die Replikation in bestimmten Geweben, die einer weniger stringenten Immunkontrolle unterliegen, wie z.B. Epithelzellen der Speicheldrüse. Die geringere MHC-Klasse-I-Expression in solchen Zellen ermöglicht eine relativ ungestörte Produktion von Virusnachkommen, die dann in Körperflüssigkeiten, wie Speichel, Muttermilch, Samenflüssigkeit, freigesetzt werden, und dadurch auf andere Individuen übertragen werden können. Die Etablierung einer latenten Infektionsphase, während der die virale Genexpression sehr limitiert ist, verringert zusätzlich die Exposition von Antigenen gegenüber dem Immunsystem des Wirtes und ermöglicht die Persistenz des viralen Genoms für eine spätere Reaktivierung. Neben diesen eher passiven Strategien, haben CMV

Mechanismen entwickelt, aktiv mit einer Immunantwort des Wirtes zu interferieren, um die Zeitspanne der Virusreplikation, Freisetzung und Transmission zu verlängern.

Die MHC-Klasse-I-restringierte Präsentation von viralen IE-Antigenen wird durch *early* Funktionen von MCMV blockiert (Del Val et al., 1992). Es konnte gezeigt werden, dass das *early* Genprodukt von *m152*, gp40, MHC-Klasse-I-Komplexe, bestehend aus MHC schwerer Kette, β_2 -Mikroglobulin und Peptid im ERGIC zurückhält (Ziegler et al., 1997). Experimente mit der MCMV-Mutante Δ MS94.5, bei der die Gene *m151* bis *m165* deletiert sind, ergaben jedoch, dass MCMV noch weitere MHC-Klasse-I-reaktive Funktionen besitzt, welche die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation beeinträchtigen. Werden Mausfibroblasten mit dieser Mutante infiziert und in einem Cytotoxizitätsassay unter Verwendung von CD8⁺, pp89-spezifischen CTL auf ihre Antigenpräsentationskapazität getestet, so zeigt sich, dass zu frühen Zeitpunkten der *early* Phase (1,5 h) wieder Antigenpräsentation stattfindet, bei längerer *early* Genexpression (6-9 h) jedoch eine Inhibition eintritt. Durchflußcytometrische Untersuchungen bestätigen, dass die MCMV-Infektion in der *early* Phase auch in der Abwesenheit der Gene *m151* bis *m165* zu einem Verlust von oberflächenresidenten MHC-Klasse-I-Molekülen führt, obwohl der *m152*-vermittelte Transportblock der MHC-Klasse-I-Komplexe aufgehoben ist. In Δ MS94.5 infizierten Zellen werden MHC-Klasse-I-Moleküle durch den Golgi transportiert, und ihre mannosereichen Oligosaccharidseitenketten werden zu Endo H-resistenten, komplexen Seitenketten modifiziert, die aber die Zellmembran nicht erreichen (Thäle et al., 1995).

Als weiteres MHC-reaktives MCMV Protein konnte gp34, das Genprodukt von *m04*, identifiziert werden. gp34 bindet im ER an vollständig assemblierte MHC-Klasse-I-Moleküle, und nur Komplexe aus gp34 und MHC-Klasse-I verlassen das ER. Die Komplexe werden durch den Golgi transportiert, wo die N-Glykane der MHC-Moleküle vollständig, und die von gp34 zum Teil zu Endo H-resistenten Glykanen modifiziert werden, und erreichen dann die Zellmembran, um eine bisher noch unbekannte Funktion auszuüben (Kleijnen et al., 1997). (Hengel et al., 1999; Johnson and Hill, 1998)

1.3.2.3 Identifikation des 48 kDa Glykoproteins von MCMV

Aus den Befunden mit der MCMV-Mutante Δ MS94.5 ist zu schließen, dass MCMV neben *m152* und *m04* mindestens eine weitere MHC-Klasse-I-reaktive Genfunktion besitzen muss, die den Transport dieser Moleküle an die Zellmembran beeinträchtigt.

Zur Identifikation weiterer MHC-Klasse-I-reaktiver MCMV Proteine, wurden zwei Strategien gewählt. Zum einen wurden MCMV-Mutanten mit großen Deletionen auf ihre Fähigkeit getestet, die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I zu regulieren. Bei diesem Screeningverfahren wurde die MCMV-Mutante Δ MS94.7 gefunden, bei der die Gene *m01* bis *m17* deletiert sind. Die

Infektion von Zellen mit dieser Mutante resultiert - im Vergleich zu Infektionen mit wt MCMV oder der Mutante Δ MS94.5 - in einer partiellen Rekonstitution der Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen in der *early* Infektionsphase (Abb. 3). Dies bedeutet, dass im Bereich der Gene *m01* bis *m17* eine Genfunktion enthalten sein muss, welche mit der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran interferiert.

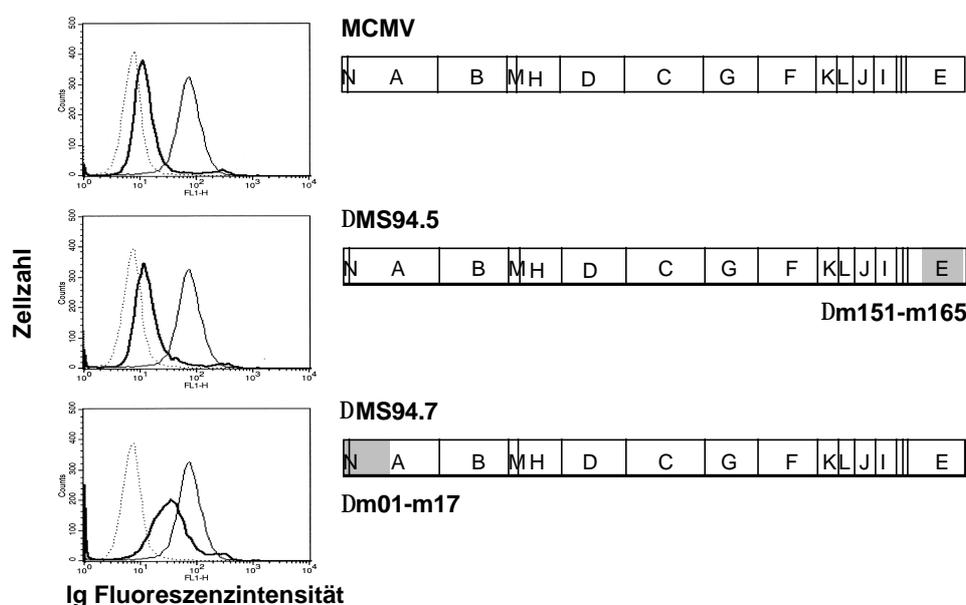


Abb. 3: Mehrere *early* Gene von MCMV beeinträchtigen die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen

BALB.SV-Fibroblasten wurden mit wt-MCMV, der Mutante Δ MS94.5 (Deletion der Gene *m151-m165*) oder Δ MS94.7 (Deletion der Gene *m01-m17*) infiziert. Die Virusgenome mit den gekennzeichneten *Hind*III-Fragmenten sind schematisch dargestellt; die deletierten Genomabschnitte sind grau unterlegt. Nach 24 h Infektion in der Gegenwart von PAA (250 μ g/ml) wurden die Zellen auf ihre MHC-Klasse-I-Expression an der Zellmembran cytofluorometrisch analysiert. H-2K^d-Moleküle wurden mit dem monoklonalen Antikörper (mAk) SF1.1.1 angefärbt. Die dünne Linie repräsentiert jeweils die K^d-Expression mock-infizierter Zellen; die Anfärbung der Zellen mit dem Fluorescein-konjugiertem Zweitantikörper allein ist durch eine gepunktete Linie dargestellt. Nach Anfärbung der infizierten Zellen (jeweils dicke Linie) ist zu sehen, dass die Infektion mit wt-MCMV als auch die mit Δ MS94.5 zu einem Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran führt, während die Infektion mit Δ MS94.7 nur in einer partiellen Abnahme von H-2K^d resultiert.

Parallel dazu wurden MCMV-Proteine identifiziert, die in infizierten Zellen an MHC-Klasse-I-Moleküle binden. Zu diesem Zweck wurden mit einem MHC-Klasse-I-Immunpräzipitat aus MCMV-infizierten Zellen monoklonale Antikörper virale Proteine, die an MHC-Klasse-I-Komplexe binden, hergestellt. Durch Testen der Hybridomazellkulturüberstände auf Antikörper mit MCMV-Reaktivität konnten zwei Klone, CROMA229 und CROMA231, identifiziert werden, die Antikörper mit Spezifität für ein MCMV-Glykoprotein sezernieren. Das Glykoprotein hat ein ungefähres Molekulargewicht von 48 kDa, welches nach Deglykosylierung auf ca. 34 kDa reduziert wird. Die Immunfluoreszenz von infizierten Fibroblasten mit CROMA231 bzw. CROMA229,

ergaben eine charakteristische vesikuläre Lokalisation von gp48, die nach Mikroinjektion von genomischer MCMV-DNA in Zellen reproduziert werden konnte. Die Mikroinjektion von viraler DNA bzw. von definierten viralen DNA-Fragmenten in Kombination mit der gp48-Immunfluoreszenz wurde zur Identifikation des für gp48 kodierenden MCMV Gens eingesetzt. Die gleiche Methode wurde bereits erfolgreich angewendet für die Lokalisierung des viralen Fc-Rezeptor Gens (*m138*) und *m152* (Thäle et al., 1994; Thäle et al., 1995). Nach Injektion von genomischen *HindIII*-Fragmentpools, einzelnen *HindIII*-Fragmenten und schließlich von *HindIII*A-Subfragmenten konnte gezeigt werden, dass das 3,4 kbp *XbaI*-*Clal* Fragment aus der *HindIII*A-Region des MCMV Genoms für die Expression von gp48 ausreicht. Dieses *XbaI*-*Clal* Fragment von Nukleotid 4162 bis 7528 des MCMV-Genoms (Rawlinson et al., 1996) umfasst die offenen Leseraster (ORF) *m05*, *m06* und *m07*. Basierend auf dem gemessenen Molekulargewicht in der SDS-PAGE konnte *m06* als Kandidaten-ORF identifiziert werden (Reusch, 1995).

1.3.2.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die Analyse von MCMV-Deletionsmutanten nach neuen MHC-Klasse-I-reaktiven MCMV-Genen führte zum *HindIII*A-Fragment mit den ORFs *m01* bis *m17*. Bei der Suche nach MHC-Klasse-I-bindenden MCMV-Proteinen konnte gp48, ein Glykoprotein, das durch das im *HindIII*A-Fragment gelegene Gen *m06* kodiert wird, identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das von MCMV *m06* kodierte gp48 biochemisch und funktionell beschrieben werden.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Materialien

2.1.1 Geräte

Bakterienschüttler	B.Braun, Melsungen
β -Counter LS6000TA	Beckman, Fullerton, USA
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Eagleeye (Geldokumentationssystem)	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Elektroporationsgerät	Bio-Rad, Richmond, USA
Entwicklermaschine	Amersham, Freiburg
FACSCalibur (Durchflußcytometer)	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenz-/LichtmikroskopAxiovert 35	Zeiss, Oberkochen
γ -Counter (COBRA, Auto-Gamma)	Packard, Groningen, Niederlande
Geltrockner	Bio-Rad, Richmond, USA
Invertmikroskop TMS	Nikon, Düsseldorf
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Leitz DM IRB, Wetzlar
Konfokaler Laser Scanner	Leica TCS NT, Heerbrugg, Schweiz
Kühlfälle	Christ, Osterode
Kühlzentrifuge	Heraeus, Hanau
Magnetrührer mit Heizplatte	Janke & Kunkel, Staufen
Microinjector 5242	Eppendorf, Hamburg
Micromanipulator 5170	Eppendorf, Hamburg
Mikrowellengerät	AEG, Berlin
Netzgeräte	Biotec-Fischer, Reiskirchen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer Gene Quant II	Pharmacia/LKB, Freiburg
Pipetten	Gilson, Villies Le Bel, Frankreich;
	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Technomara, Zürich, Schweiz
Rüttler	Eppendorf, Hamburg
Speed Vac Konzentrator	Savant, Farmingdale, USA
Sterile Bank Lamin Air	Heraeus, Hanau
Thermocycler	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermostat	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Branson Sonic Power Company, Danburg, USA
Ultrazentrifuge L5-75	Beckman, Palo Alto, USA
UV-Transilluminator (366 nm)	Vetter, Wiesloch
(254 nm)	Konrad Benda, Wiesloch
Vortex-Mixer	Janke & Kunkel, Staufen
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	Köttermann, Hängsingen
Zentrifuge GP	Beckman, Palo Alto, USA
Zentrifuge J2-21	Beckman, Palo Alto, USA

2.1.2 Chemikalien

β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
[³⁵ S]-Cystein/Methionin (Promix)	Amersham, Freiburg
5-Brom-2'-deoxyuridin (BUdR)	Roche Diagnostics, Mannheim
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal)	Biomol, Hamburg
Acrylamid/Bisacrylamid (Protogel)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Agar für Bakterienplatten	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Agarose (low melting point)	Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose Typ I	Sigma, München
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, Richmond, USA
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Bacto Hefe-Extrakt	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Bacto Trypton	Difco Lab., Detroit, USA
Bafilomycin A ₁	Sigma, München
Brefeldin A	Sigma, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, München
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	BRL, Bethesda Research Lab., USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chloroquin	Sigma, München
Concanamycin A	Sigma, München
Cycloheximid	Sigma, München
Digitonin	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
di-Natriumhydrogenphosphat	Riedel-de Haën, Seelze
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden
Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)	Gibco, NY, USA
E-64 (L-trans-epoxysuccinylleucylagmatin)	Fluka, Deisenhofen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (EtOH)	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylendiamintetraacetat-Na-Salz (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Marburg
Geneticinsulfat (G418)	Sigma, München
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Serva, Heidelberg
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Riedel-de Haën, Seelze
Isopropylthio- β -D-galactosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
Kaliumacetat	Riedel-de Haën, Seelze
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Lactacystin	Biomol, Hamburg
Leupeptin	Sigma, München
L-Glutamin	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland

Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Methionin (Met)	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Methylzellulose	Fluka, Buchs, Schweiz
MG-132 (ZL ₃ H)	Biomol, Hamburg
Minimal essential medium nach Eagle (MEM)	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Sigma, München
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
N,N-Methylenbisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Na ^[51Cr] O ₄	Amersham, Braunschweig
Natriumacetat	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	J.T.Baker B.V., Deventer, Holland
NCS (Serum aus neugeborenen Käbern)	PAA, Marburg
Nonidet P-40 (NP40)	Sigma, München
Paraformaldehyd	J.T.Baker B.V., Deventer, Holland
Penicillin	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Pepstatin	Sigma, München
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenolrot	Serva, Heidelberg
Phenylmethylsulfonfluorid (PMSF)	Sigma, München
Phosphonoessigsäure (PAA)	Sigma, München
Propidiumjodid	Sigma, München
Protein A Sepharose CL-4B	Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden
Protein G-Sepharose Fast Flow	Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden
Proteinase K	Merck, Darmstadt
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim
RPMI1640	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
RPMI1640 w/o Cys/Met	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarcosine-Na-Salz (Sarkosyl)	Merck, Darmstadt
Streptomycinsulfat	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Sucrose	Sigma, München
Szintillator (Aquasafe 300 plus)	Zinsser, Frankfurt
Tetracyclin	Sigma, München
Tris-hydroxymethylaminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Tunicamycin	Sigma, München
Tween 20	Merck, Darmstadt
ZL ₃ H (MG-132)	Biomol, Hamburg

2.1.3 Weitere Verbrauchsmaterialien

Deckgläser (rund, 12 mm Ø)	Roth, Karlsruhe
Dialysemembranen (0,025 µm Porengröße)	Millipore, Eschborn

Filterpapier (3 mm)	Whatman Ltd., Maidstone, Kent, England
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Bio-Rad, Richmond, USA
Elektroporationsküvetten (2 mm)	Bio-Rad, Richmond, USA
Röntgenfilme BIOMAX-MR	Eastman-Kodak, Rochester, USA
Objektträger	Marienfeld, Bad Mergentheim
Sterilfilter	Schleicher & Schüll, Dassel
Plastikwaren, Zellkulturmaterial	Greiner, Nürtingen; Nunc, Wiesbaden; Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.4 Oligonukleotide

Template; Bezeichnung; Orientierung; Restriktionsschnittstelle; Sequenz (5'→3')

FLAG, m06	FLAGm06for	for		ctc gat gac ttt cca gga cta caa aga cga tga cga taa gat ggg aga atc gc
FLAG, m06	FLAGm06rev	rev		gcg att ctc cca tct tat cgt cat cgt ctt tgt agt cct gga aag tca tcg ag
hCD4	CD4SalIfor	for	<i>Sal I</i>	cgc ggg gtc gac gcc gcc acc atg aac cgg gga gtc
hCD4	CD4SalIrev	rev	<i>Sal I</i>	cgc ggg gtc gac tta tca aat ggg gct aca tgt
hCD4, m06	CD4m06for	for		atc ttc ttc tgt gtc cgc gag ccg cta gct
hCD4, m06	CD4m06rev	rev		agc tag cgg ctc gcg gac aca gaa gaa gat
m04	m04SalIfor	for	<i>Sal I</i>	cgc ggg gtc gac gcc gcc acc atg tct ctc gta tgt
m04	m04SalIrev	rev	<i>Sal I</i>	cgc ggg gtc gac tca tta gtt act ctt aag cgg
m04, m06	m04TMm06CT	for		att tac ttg tac gga cgc gag ccg cta gct
m04, m06	m04TMm06CT	rev		agc tag cgg ctc gcg tcc gta caa gta aat
m06	m06XhoIEcoRIrev	rev	<i>Xho I</i> <i>EcoR I</i>	cgc ggg gaa ttc ctc gag ttt att att tgg taa gca agg g
m06	m06BamHIXhoIfor	for	<i>BamH I</i> <i>Xho I</i>	cgc ggg gga tcc ctc gag gcc gcc acc atg gac aca act gcg aga gga
m06	m06ΔTMCTrev	rev	<i>Xho I</i>	cgc ggg ctc gag ttt att act ggc ggc ggc ggc g
m06	#2154	rev	<i>Sal I</i>	cgc ggg gtc gac ttt att att tgg taa gca agg ggg aag tg
m06	#96/326	rev	<i>Xho I</i>	cgc ggg ctc gag ttt att att tgg taa gca agg ggg aag tg
m06	delta342-345	rev	<i>Xho I</i>	cgc ggg ctc gag ttt att agg ggg aag tga gtg att gat
m06	delta309-345	rev	<i>Xho I</i>	cgc ggg ctc gag ttt att agt agg tgt aga aca aca tag
m06	UR7/97	for		ccg cta gct aga gct gcc aag cga tac ggc
m06	UR8/97	rev		gcc gta tcg ctt ggc agc tct agc tag cgg
m06	UR6/97	rev	<i>Xho I</i>	cgc ggg ctc gag ttt att att tgg ttg ctg cgg ggg aag t
m06	#96/327	for	<i>Xho I</i>	cgc ggg ctc gag gcc gcc acc atg gac aca act gcg aga gga
m06, hCD4	m06CD4TMfor	for		cgc cgc cgc cgc cag atg gcc ctg att gtg
m06, hCD4	m06CD4TMrev	rev		cac aat cag ggc cat ctg gcg gcg gcg gcg

Die Oligonukleotide wurden bezogen von Prof. Dr. G. Darai (Hygiene-Institut, Heidelberg), Dr. G. Arnold (Genzentrum, München), GIBCO BRL Life Technologies (Karlsruhe), MWG-Biotech (Ebersberg), und metabion (Martinsried).

2.1.5 Antikörper

Primärantikörper

W6/32 (ATCC HB95)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Ascites und Überstand)
anti-HLA	
28-14-8s (ATCC HB27)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Ascites und Überstand)
anti-H-2L ^d , L ^q , D ^b	
SF1.1.1 (ATCC HB159)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Ascites und Überstand)
anti-H-2K ^d	
64-3-7	Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Ascites und Überstand)(Smith et al., 1993)
anti-H-2L ^d	
34-5-8s (ATCC HB102)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Ascites und Überstand)
anti-H-2D ^d	
R1-21.2	Monoklonaler Antikörper aus der Ratte (Momburg et al., 1986)
anti-H-2 Moleküle	
R17 217.1.3 (ATCC TIB219)	Monoklonaler Antikörper aus der Ratte (Ascites)
anti-murinen Transferrinrezeptor	
anti-Integrin β_1 (CD29)	gereinigte Rattenantikörper (Pharmingen, Hamburg)
anti-Calnexin	polyklonales Kaninchenserum (Biomol, Hamburg)
anti-Calretikulin	polyklonales Kaninchenserum (StressGen, Victoria, Kanada)
1D4B, anti-Lamp-1	Monoklonaler Antikörper aus der Ratte (Development studies hybridoma bank)
anti-humanes CD4	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, gereinigt, Klon Q4120 (Sigma, München)
CROMA229 und CROMA231	Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Ascites und Überstand)
M1, anti-FLAG	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, gereinigt (Sigma, München)
M2, anti-FLAG	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, gereinigt, (Eastman Kodak Company, USA)
IM7.8.1, anti-murines Pgp-1 (CD44) (ATCC TIB235)	monoklonaler Antikörper aus der Ratte (Überstand)
anti-m06-2	gereinigtes Kaninchenserum gegen Peptid aus MCMV <i>m06/gp48</i> (241-SGVIKLPDYSGPDTLLTDGVPFDYAC-265)
anti-m04-3	gereinigtes Kaninchenserum gegen Peptid aus MCMV <i>m04/gp34</i> (34-KEYKEKMKYRHSLGC-48)
anti-Kb	Kaninchenserum gegen Peptid aus dem cytoplasmatischem Anteil von H-2K ^b (CKVMVHDPHSLA)

Sekundärantikörper

Fluorescein (FITC)-konjugiert:

Ziege anti-Maus IgG

Sigma, München

Ziege anti-Ratte IgG

Dianova, Hamburg

Ziege anti-Kaninchen IgG

Dianova, Hamburg

Rhodamin-konjugiert:

Ziege anti-Maus IgG

Dianova, Hamburg

Ziege anti-Ratte IgG

Dianova, Hamburg

Ziege anti-Kaninchen IgG

Dianova, Hamburg

2.2 Methoden**2.2.1 Herstellung von DNA-Konstrukten****2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**Material :

Oligonukleotide

siehe 2.1.4

Template

Plasmid mit dem HindIII-A-Fragment aus dem
MCMV Genom (Ebeling et al., 1983)Plasmid mit humanem CD4 (zur Verfügung gestellt
von Dr. J. Haas)

Polymerase

Expand High Fidelity PCR System (Roche
Diagnostics Mannheim)10 × Reaktionspuffer
mit 15 mM MgCl₂Expand High Fidelity PCR System
(Roche Diagnostics Mannheim)

Desoxynukleotide (dNTP) Mix

je 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
(Pharmacia/LKB, Freiburg)

PCR-Reinigungs-Kit

QIAquick PCR Purification Kit,
(QIAGEN, Hilden)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur *in vitro*-Amplifikation definierter DNA-Sequenzen. Unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (*primer*), welche die Ziel-DNA (*template*) diametral zueinander flankieren, wird in einer sich mehrfach wiederholenden dreistufigen Reaktion (Denaturierung, *primer*-Hybridisierung, Polymerisierung) eine exponentielle Vervielfältigung (2^n Kopien bei n Zyklen) des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts erreicht (Saiki et al., 1988).

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, die zur Klonierung eingesetzt werden sollten, wurde im allgemeinen eine PCR in einem 100 µl Reaktionsansatz unter folgenden Bedingungen durchgeführt. Einen Überblick über die Amplifikate und verwendeten Primer bietet 2.2.1.6.

Reaktionsansatz:

50 μ M 5'-Primer50 μ M 3'-Primer1 \times Reaktionspuffer mit 1,5 mM MgCl₂200 μ M dNTP mix

10-20 U/ml Polymerase

~50 ng/ml *template*

Temperaturzyklen:

60 s	94°C	25 \times
45 s	94°C	
120 s	63°C	
180 s	72°C	
∞	4°C	

Nach einmaligem Erhitzen der Reaktion vor dem ersten Zyklus wurde im ersten Schritt der Ansatz für 45 s bei 95°C denaturiert. Anschließend konnten die entstandenen DNA-Einzelstränge für 2 min bei 63°C mit den entsprechenden Primern hybridisieren (*annealing*). Im dritten Schritt erfolgte die Polymerase-Reaktion bei 72°C für 90 s (*extension*). Nach Ende des ersten Zyklus wurde die Reaktionssequenz erneut mit der Denaturierung gestartet und insgesamt 25 \times durchlaufen. Nach dem letzten Zyklus wurde der Polymerase für 5 min bei 72°C die Möglichkeit gegeben, begonnene Stränge bis zum 3'-Ende zu synthetisieren (*final extension*).

5 μ l des ungereinigten PCR-Produktes wurden zur Überprüfung der Amplifikation in einem Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.2.1.2.4), der restliche Ansatz wurde mit einem QIAquick Purification Kit nach genauer Anleitung des Herstellers von Oligonukleotiden, dNTP und Enzym befreit und zur Klonierung eingesetzt. Sollte ein Fusionskonstrukt aus *m06* mit *m04* oder mit CD4 hergestellt bzw. interne Mutationen eingeführt werden (siehe 2.2.1.6), wurde eine Zweistufen-PCR durchgeführt. In der ersten PCR wurden die einzelnen Fragmente aus *m06*, *m04* bzw. CD4 mit überlappenden Primern amplifiziert und anschließend aufgereinigt. Für die zweite PCR wurden die Fragmente gemischt und als Template eingesetzt.

2.2.1.2 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren

(modifiziert nach (Sambrook et al., 1989))

2.2.1.2.1 Präparation des Vektors

Material :

Plasmidvektoren:

pCR3	Invitrogen, Leek, Niederlande
pBK-CMV	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
B45-Neo	zur Verfügung gestellt von Dr.E.R. Podack (Ohe et al., 1995)

Alkalische Phosphatase aus Shrimps (SAP)	5 000 - 10 000 U/ml; (USB/Amersham, Freiburg)
--	--

10 × SAP-Puffer	200 mM Tris/HCl (pH 8,8) 100 mM MgCl ₂ (USB/Amersham, Freiburg)
-----------------	--

1 bis 5 µg des Vektors, der für die Klonierung eines DNA-Fragmentes eingesetzt werden sollte, wurde durch Spaltung mit einem - bei Bedarf auch mit zwei - Restriktionsenzymen linearisiert (siehe 2.2.1.2.3). Anschließend erfolgte eine Gelreinigung, um nichtlinearisierte Plasmide und eventuell entstandene kurze DNA-Fragmente zu entfernen (siehe 2.2.1.2.4 und 2.2.1.2.5). Der gereinigte Vektor wurde dann zur Verhinderung einer Selbstligation mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps (SAP) dephosphoryliert. Dazu wurde die Vektor-DNA zusammen mit 2 µl 10×SAP-Puffer und 1 µl SAP in einem 20-µl-Ansatz für 1 h bei 37°C und anschließend 15 min bei 65°C zur Inaktivierung der SAP inkubiert. Der so präparierte Vektor konnte dann für die Ligation (siehe 2.2.1.2.6) eingesetzt werden.

2.2.1.2.2 Präparation des DNA-Fragments

5 µg DNA, aus der ein bestimmtes Fragment kloniert werden soll, wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten (siehe 2.2.1.2.3). Danach wurden die DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.2.1.2.4), um das gewünschte DNA-Fragment von den restlichen DNA-Fragmenten zu trennen. Das Fragment wurde aus dem Agarosegel isoliert (siehe 2.2.1.2.5) und für die Ligation (siehe 2.2.1.2.6) eingesetzt.

2.2.1.2.3 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Material :

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
10 × Spaltpuffer	New England Biolabs, Schwalbach

Die Spaltungen wurden mit handelsüblichen Restriktionsendonukleasen und mit den von den Herstellern empfohlenen Puffersystemen durchgeführt. In der Regel wurden in einem 20 µl Spaltansatz pro 1 µg DNA 1 U Enzym und 2 µl 10 × Puffer eingesetzt. Die Ansätze wurden 1 bis 2 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert und anschließend zur Kontrolle der Restriktion in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.1.2.4).

2.2.1.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Material :

Agarose	Typ I, Sigma, München
LMP-Agarose (<i>low melting point</i>)	Biozym, Hess. Oldendorf
1 × TAE (Elektrophoresepuffer)	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
Ethidiumbromid-Stammlsg.	10 mg/ml in TAE
5 × DNA-Probenpuffer	40 %(w/v) Sucrose 0,05 %(w/v) Bromphenolblau 0,1 %(w/v) SDS 1 mM EDTA (pH 8,0)
DNA-Längenstandard	1 kb <i>ladder</i> , 1 µg/µl (Gibco/BRL, Eggenstein)

Je nach der zu erwartenden Fragmentgröße wurden DNA-Fragmente in 0,6 % bis 1 %(w/v)igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die geeignete Agarose wurde in einem entsprechenden Volumen 1 × TAE durch Erhitzen gelöst, auf 56°C abgekühlt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit 1 × TAE unter Zusatz von 0,3 µg/ml Ethidiumbromid überschichtet und mit den Proben, die zuvor mit 1/5 Vol. 5×Probenpuffer versetzt worden sind, und ca. 400 ng DNA-Längenstandard beladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm für ½ bis 2 Stunden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator analysiert und mit einer Eagleeye Kamera photographiert oder zur Extraktion von DNA-Fragmenten (siehe 2.2.1.2.5) verwendet.

2.2.1.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-GelenMaterial :

Gel-Extraktionssystem	QIAEX Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden)
-----------------------	--

Im Rahmen präparativer Gelelektrophoresen wurden DNA-Fragmente zur weiteren Verwendung (z.B. Klonierung) aus LMP-Agarosegelen isoliert. Dazu wurden nach dem Gellauf (siehe 2.2.1.2.4) die Banden mit den zu isolierenden DNA-Fragmenten aus dem Gel auf einem Transilluminator mit langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten, und die DNA mit Hilfe eines Gel-Extraktionssystem nach detaillierten Angaben des Herstellers isoliert und in 20 µl TE oder H₂O bidest aufgenommen.

2.2.1.2.6 LigationMaterial :

T4 DNA-Ligase	1 U/µl (Roche Diagnostics, Mannheim)
10 × Ligationspuffer	660 mM Tris/HCl 50 mM MgCl ₂ 10 mM Dithioerythrit 10 mM ATP (pH 7,5) (Roche Diagnostics, Mannheim)

Für einen Ligationsansatz (20 µl bis 30 µl) wurden je nach Größe des Vektors und des Fragments 250 ng bis 500 ng präparierter Vektor und 1 µg bis 3 µg aufgereinigtes Fragment zusammen mit 1 U T4 DNA-Ligase und 1/10 Vol. 10 × Ligations-Puffer sorgfältig gemischt und bei 16°C über Nacht inkubiert. Die Ligationsprodukte wurden dann entweder gleich zur Transformation von Bakterien eingesetzt (siehe 2.2.1.4) oder bei -20°C gelagert.

2.2.1.3 Herstellung kompetenter BakterienMaterial :

Bakterien : *E. coli* XL1-Blue MRF[']; Genotyp : Δ(*mcrA*)183, Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac* [F['], *proAB*, *lad*^qZΔM15, Tn10, (*tet*^r)]

LB-Medium	10 g/l Bacto Trypton 5 g/l Bacto Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl
Tetracyclin-Stammlösung	15 mg/ml in 50 %(v/v) EtOH/H ₂ O
Hepes-Puffer	1 mM HEPES (pH 7,5) in H ₂ O

Glycerinlösung 10 % (w/v) in H₂O

Für die Elektrottransformation müssen die Bakterienzellen so vorbehandelt werden, dass sie frei von exogenen Ladungsträgern sind, die im elektrischen Feld bei der Transformation störend wirken (Böttger, 1988). Dazu wurden Einzelkolonien von dem Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue in 20 ml LB-Medium unter Zusatz von 15 µg/ml Tetracyclin bei 37°C über Nacht als Vorkultur angezogen. 10 ml der ÜN-Kultur wurden in 700 ml frisches LB-Medium inokuliert, die Kultur bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt und dann sofort im Eiswasserbad auf 4°C abgekühlt. Die folgende Präparation wurde über den gesamten Zeitraum bei 4°C (Kühlraum oder Eiswasserbad) durchgeführt. Nach dem Abkühlen wurden die Bakterien in eisgekühlte Zentrifugenbecher überführt, nach Zentrifugation (15 min.; 4 000 rpm; 4°C; JA-10 Rotor, Beckman) in 250 ml Hepes-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und abermals in 200 ml eiskaltem Hepes-Puffer aufgenommen. Nach wiederholter Zentrifugation wurden die sedimentierten Bakterien einmal in eiskaltem 10% Glycerin gewaschen, unter den genannten Bedingungen nochmals zentrifugiert und schließlich in 1,5 ml 10% Glycerin sorgfältig resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden in Volumina von 120 µl portioniert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -70°C gelagert.

2.2.1.4 Transformation kompetenter Bakterien durch Elektroporation

Material :

SOB-Medium	20 g/l Bacto Trypton 5 g/l Bacto Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂
SOC-Medium	SOB-Medium 20 mM Glucose
LB-Agarplatten	LB-Medium 15 g/l Agar
Ampicillin-Platten Ampicillin-Stammlösung	LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin 50 mg/ml in H ₂ O
Kanamycin-Platten Kanamycin-Stammlösung	LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin 25 mg/ml in H ₂ O

Beim Verfahren der Elektroporation wird die Permeabilität von Plasmamembranen durch kurze elektrische Impulse (10 µs) hoher Feldstärke (12,5 kV pro cm) kurzfristig erhöht, so dass DNA-Moleküle in die Zelle gelangen können. Die Elektrottransformation von DNA ist eine vielfach

angewandte Methode, um superhelikale Plasmid-DNA, als auch rekombinante Ligationsprodukte hocheffizient in Bakterienzellen einzuführen (Calvin and Hanawalt, 1988).

Vor der Transformation wurden 5 bis 10 μl des Ligationsansatzes zur Entfernung störender Fremdionen ca. 20 min gegen H_2O bidest dialysiert. Die kompetenten Bakterienzellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, zu 40 μl in vorgekühlte Reaktionsgefäße portioniert und dann mit der dialysierten DNA 2 bis 5 min auf Eis inkubiert, um die Adhäsion der DNA an die bakterielle Zellwand zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz in eine eiskalte Transformationsküvette (2 mm) überführt, homogen verteilt und unmittelbar dem elektrischen Feld (2,5 kV; 25 μF ; 400 Ω) ausgesetzt. Sofort nach der Elektroporation wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium aufgenommen, in ein Polyethylenröhrchen überführt und 1 h im 37°C-Wasserbad geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde dann in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum zur Selektion auf die entsprechende plasmidkodierte Resistenz ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.5 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

2.2.1.5.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Material:

Sol I	10 mM EDTA, pH 8,0
Sol II	0,2 M NaOH 1% SDS
Sol III	2,5 M KOAc 2,5 M HOAc
TE	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 mM EDTA
RNAse A (DNAse-frei)	10 mg/ml

Zur Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurden einzelne Bakterienkolonien, die unter geeigneten Selektionsbedingungen gewachsen sind, in jeweils 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz überimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien aus ca. 2 ml Kultur wurden kurz zentrifugiert und in 200 μl Sol I resuspendiert. Nach der alkalischen Lyse durch Zugabe von 400 μl Sol II, wurden 300 μl Sol III zugesetzt und gemischt. Zelltrümmer und chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation bei 14 000 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gemischt und mindestens 15 min zentrifugiert. Die präzipitierte Plasmid-DNA und RNA wurde einmal mit 70 % EtOH gewaschen

und nach dem Trocknen in 100 µl TE mit 100 µg/ml RNase gelöst. Für den analytischen Restriktionsverdau (siehe 2.2.1.2.3) wurden in der Regel 5 µl der DNA-Präparation eingesetzt.

2.2.1.5.2 Großpräparation von Plasmid-DNA (Maxipräparation)

Material :

Resuspensions-Puffer (Puffer P1)	50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Lyse-Puffer (Puffer P2)	1%(w/v) SDS 200 mM NaOH
Neutralisationspuffer (Puffer P3)	3 M KOAc (pH 5,5) mit Eisessig
Equilibrierungspuffer (Puffer QBT)	750 mM NaCl 50 mM MOPS 15%(v/v) EtOH 0,15%(w/v) Triton X-100 (pH 7,0)
Wasch-Puffer (Puffer QC)	1 M NaCl 50 mM MOPS 15%(v/v) EtOH (pH 7,0)
Elutionspuffer (Puffer QF)	50 mM Tris/HCl 1,25 M NaCl 15%(v/v) EtOH (pH 8,5)
Ionenaustauschersäulen	QIAGEN-tip 500 (QIAGEN, Hilden)

Zur Isolierung von bis zu 500 µg Plasmid-DNA wurden 500 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz mit 10 ml einer Übernacht-Kultur des Bakterienklones angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Nach dem Pelletieren der Bakterien (15 min; 4 000 rpm; 4°C; JA-10 Rotor, Beckmann) und dem Resuspendieren des Pellets in 10 ml Puffer P1 wurden 10 ml Puffer P2 zugegeben, gemischt und 5 min bei RT lysiert. Nach dem Neutralisieren mit 10 ml eiskaltem Puffer P3 und 20 min Inkubation auf Eis, wurden die Proteine und die chromosomale DNA durch Zentrifugation entfernt (30 min; 15 000 rpm; 4°C; JA-17 Rotor, Beckman). Der klare Überstand wurde auf eine Ionenaustauschersäule QIAGEN-tip 500 überführt, die zuvor mit 10 ml Puffer QBT equilibriert worden ist. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit 30 ml Puffer QC, wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert und nach Präzipitation mit 10,5 ml Isopropanol pelletiert (30 min; 15 000 rpm; 4°C; JA-17 Rotor, Beckman). Die DNA wurde einmal

mit 15 ml eiskaltem 70%(v/v) EtOH gewaschen, nochmals zentrifugiert, an der Luft getrocknet und schließlich in 500 TE gelöst.

2.2.1.6 Überblick über die klonierten Konstrukte und verwendeten Primer

Folgende Konstrukte wurden mit den angezeigten Oligonukleotiden über PCR generiert, in pBK-CMV bzw. pCR3 zwischenkloniert, und in B45-Neo umkloniert.

Konstrukt	Primer	Primer	Primer	Primer
m06	#96/327	#96/326		
m06 Δ 332	#96/327	delta342-345		
m06 Δ CT	#96/327	delta309-345		
m06 Δ TM	#96/327	m06deltaTMCTrev		
m06LL307/308AA	#96/327	UR8/97	UR7/97	#96/326
m06LL333/334AA	#96/327	UR6/97		
m06LL307/308AA LL333/334AA	#96/327	UR8/97	UR7/97	UR6/97
FLAGm06	m06BamHIXhoIfor	FLAGm06rev	FLAGm06for	m06XhoIEcoRIrev
CD4	CD4SalIfor	CD4SalIrev		
CD4m06CT	CD4SalIfor	CD4m06rev	CD4m06for	#2154
m06CD4TMCT	m06BamHIXhoIfor	m06CD4TMrev	m06CD4TMfor	CD4XhoIEcoRIrev
m04	m04SalIfor	m04SalIrev		
m04m06CT	m04SalIfor	m04TMm06CTrev	m04TMm06CTfor	#2154

2.2.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.2.2.1 Zellen und Zellkultur

Material :

Trypsinlösung	0,5 g/l Trypsin 0,2 g/l EDTA 0,85 g/l NaCl (Gibco/BRL)
DMEM-Medium (Dulbecco's modified Eagle medium) supplementiert	2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycinsulfat 10%(v/v) FCS bzw. NCS (1 h bei 56°C hitzeinaktiviert) in DMEM
RPMI1640 supplementiert	2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycinsulfat 10%(v/v) FCS (1 h bei 56°C hitzeinaktiviert) in RPMI1640

Zellen :

MEF	Murine embryonale Fibroblasten (siehe 2.2.2.2)
BALB.SV (Klon B12 und C12)	SV40 transformierte, embryonale Fibroblasten aus der BALB/c-Maus (Del Val et al., 1991a)
NIH 3T3 (ATCC CRL 1658)	Kontakt-inhibierte, embryonale Zelllinie aus der NIH Swiss-Maus
293 (ATCC CRL 1573)	Humane, Adenovirus Typ 5-transformierte, primäre, embryonale Nierenzellen
CV-1 (ATCC CCL 70)	Nierenzelllinie aus der Grünen Meerkatze
P815 (ATCC TIB 64)	Mastocytomzelllinie aus der DBA/2 Maus
DLD-1 (ATCC CCL 221)	Humane Colon-Adenocarcinoma Zelllinie (β_2M)
CTL	H-2L ^d -restringierte, pp89-spezifische, CD8 ⁺ T Lymphozyten (generiert, kultiviert, und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Maren Eggers und Hartmut Hengel)

Sofern keine anderen Angaben gemacht werden, wurden alle Zellen in Kunststoffkulturgefäßen in einem Brutschrank bei 37°C, 90 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Zur Vermehrung und kontinuierlichen Kultur wurden konfluente Zellkulturen durch kurzzeitige Behandlung mit geringen Mengen von Trypsinlösung vom Gefäßboden abgelöst, entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und ihrer Verwendung zwischen 1:2 und 1:10 verdünnt und in neue Kulturschalen umgesetzt.

2.2.2.2 Isolierung und Kultur von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)Material :

PBS	136 mM NaCl 2,6 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
Trypsinlösung für MEF	136 mM NaCl 2,6 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 3,3 mM EDTA 0,125%(w/v) Trypsin

	16 mg/l Phenolrot (pH 7,2)
MEM-Medium (Minimal essential medium nach Eagle)	2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycinsulfat 5-10%(v/v) FCS (Fetales Kälberserum) (1 h bei 56°C hitzeinaktiviert) in MEM

Etwa 15 Tage alte Embryonen wurden unter sterilen Bedingungen aus BALB/c Mäusen isoliert und zerkleinert. Die Gewebestücke wurden mit PBS gewaschen und zusammen mit Glaskugeln (\varnothing 2-4 mm) 30 min bei 37°C in 30 ml Trypsinlösung gerührt. Nach 30 und 60 min wurden jeweils weitere 30 ml Trypsinlösung zugegeben und weitergerührt. Die erhaltene Zellsuspension wurde durch ein Gazesieb filtriert und in MEM-Medium mit 10% FCS aufgenommen. Je 5×10^7 Zellen wurden in einer Kulturschale (\varnothing 14,5 cm) ausgesät und bei 37°C, 90% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium durch MEM mit 5% FCS ersetzt. Nach weiteren 2 Tagen wurden die Zellen abtrypsiniert und in Aliquots zu 4×10^6 Zellen eingefroren (siehe 2.2.2.3).

4 Tage vor Verwendung wurden die Zellen aufgetaut (siehe 2.2.2.3) und in Kulturschalen in MEM-Medium mit 5% FCS kultiviert. Nach 3 Tagen, wenn die Zellen konfluent den Schalenboden bedeckten, wurden sie je nach Verwendung 1:2 bis 1:3 verdünnt und in neue Kulturschalen ausgesät, so dass sie am nächsten Tag für das Experiment eingesetzt werden konnten.

2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Material :

Einfriermedium	10%(v/v) DMSO 40%(v/v) FCS in DMEM-Medium
----------------	---

Die einzufrierenden Zellen wurden durch Trypsin-Behandlung von der Kulturschale gelöst, zentrifugiert und in einem solchen Volumen kaltem Einfriermedium resuspendiert, dass sich eine Zellzahl von 5×10^5 /ml bis 5×10^6 /ml ergab. Die Zellsuspension wurde in Portionen von 1 ml in vorgekühlte Einfrierröhrchen gefüllt, langsam auf -70°C abgekühlt und 2 bis 3 Tage später zur längerfristigen Lagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im 37°C-Wasserbad. Sobald das letzte Eiskristall geschmolzen war, wurden 2 bis 3 ml frisches, den Zellen entsprechendes Medium mit FCS zugegeben, um das toxische DMSO zu verdünnen. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen in frischem Medium

resuspendiert und je nach Bedarf und Zelltyp in einer Zellzahl von $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ bis $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ in Kulturschalen ausgesät.

2.2.2.4 Stabile Transfektion

Material :

Trypsinlösung	siehe 2.2.2.1
Medium	siehe 2.2.2.1
G418 (Geneticinsulfat)	50 mg/ml in PBS
Elektroporationsküvetten 4 mm	Bio-Rad

Für eine stabile Transfektion wurden die Zellen so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu etwa 80% konfluent waren. Nach dem Ablösen mit Trypsin wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen und in soviel Medium aufgenommen, dass eine Zelldichte von ca. $5 \times 10^6/\text{ml}$ vorlag. 0,4 ml der Zellsuspension wurden dann in eine 4 mm Elektroporationsküvette überführt und mit ca. 30 μg Plasmid-DNA gemischt. Die Elektroporation wurde mit einem Bio-Rad Gene Pulser bei einer Spannung von 240 V und einer Kapazität von 960 μF durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort mit frischem Medium versetzt und in kleinen Schälchen (6cm \varnothing) ausgesät. Nach 48 h Kultur in normalem Medium wurde das Medium gewechselt und mit 1 mg/ml G418 versetzt. Nach zwei bis drei Wochen Selektion als *bulk* Kultur waren die Zellen in der Regel konfluent und konnten wie die Ausgangszelllinien kultiviert werden.

2.2.3 Murines Cytomegalovirus und Mutanten

MCMV und MCMV Rekombinanten:

wt MCMV	MCMV (<i>mouse salivary gland virus, strain Smith, ATCC VR-194</i>)	
$\Delta\text{MS94.4}$	MCMV Δm138 (Thäle et al., 1994)	
$\Delta\text{MS94.5}$	MCMV $\Delta\text{m151-m165}$ (Thäle et al., 1995)	
$\Delta\text{MS94.7}$	MCMV $\Delta\text{m01-m17}$ (Kleijnen et al., 1997)	
$\Delta\text{MC95.37}$	MCMV $\Delta\text{m04}\Delta\text{m138}$	kloniert und zur Verfügung gestellt von Irena Crnkovic
$\Delta\text{MC96.62}$	MCMV $\Delta\text{m06}\Delta\text{m138}$	
$\Delta\text{MC96.63}$	MCMV $\Delta\text{m06Dm152}$	
$\Delta\text{m04MCMV}$		kloniert und zur Verfügung gestellt von Markus Wagner
$\Delta\text{m06MCMV}$		
$\Delta\text{m152MCMV}$		

2.2.3.1 Virusvermehrung und Reinigung von Virionen

(modifiziert nach (Ebeling et al., 1983))

Material :

VSB (<i>virus standard buffer</i>)	50 mM Tris/HCl 12 mM KCl 5 mM EDTA (pH 7,8)
Sucrose-Lösung	15%(w/v) Sucrose in VSB

MCMV und MCMV-Deletionsrekombinanten wurden auf NIH 3T3-Zellen vermehrt. Dazu wurden die Zellen am Tag vor der Infektion 1:20 verdünnt und auf 40 bis 60 große Petrischalen (Ø 14,5 cm) ausgesät. Die zu 10% konfluenten Zellen wurden dann mit 1×10^5 pfu gereinigtem MCMV infiziert, was einer *multiplicity of infection* (m.o.i.) von ca. 0,1 entspricht. Nach 5 bis 6 Tagen werden die durchinfizierten Zellen zusammen mit dem Kulturüberstand gesammelt und zentrifugiert (20 min, 6 000 rpm, 4°C, JA-10 Rotor, Beckman). Nach dem Homogenisieren der Zellen und wiederholtem Sedimentieren der Zelltrümmer (10 min, 12 000 rpm, 4°C, JA-17 Rotor, Beckman), wurden die Überstände vereint und mindestens 3 h zentrifugiert (17 000 rpm, 4°C, Typ 19 Rotor, Beckman). Die sedimentierten Virionen wurden sorgfältig homogenisiert, in 2-3 ml Medium suspendiert und auf ein 15%(w/v) Sucrosekissen geladen. Nach der Zentrifugation (1 h, 20 000 rpm, 4°C, SW 28 Rotor, Beckman) wurde der Überstand verworfen und die Virionen wurden in 4 ml Sucrose-Lösung homogenisiert, in Portionen von 25 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.3.2 Bestimmung des MCMV-Titers

Material :

Medium mit Methylzellulose	2,2%(w/v) Methylzellulose 10%(v/v) FCS in MEM
----------------------------	---

Zur Bestimmung des Titers einer MCMV-Suspension wurden MEF in 48 well-Kulturplatten ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Von der Virussuspension wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-3} bis 10^{-8} in Medium hergestellt. Jeweils 100 µl der verdünnten Virussuspension wurden pro Vertiefung zu den Zellen pipettiert nachdem bis auf 1/10 Volumen das Medium entfernt worden war. Nach 1 h Inkubation zur Adsorption der Virionen, wurden die Kulturen mit Medium mit Methylzellulose überschichtet und 5 Tage weiter kultiviert. Die entstandenen Plaques wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und der Virustiter berechnet.

2.2.3.3 Experimentelle Infektion mit MCMV

Zu den Zellen, die für die Infektion umgesetzt worden sind, wurde die der angegebenen m.o.i. entsprechende Menge an MCMV-Suspension zugegeben. Danach wurden die Kulturen für 30 min bei 800 g zentrifugiert und für den angezeigten Zeitraum weiter kultiviert. Durch die Zentrifugation kann die Infektionseffizienz um einen Faktor zwischen 20 und 80 gesteigert werden (Hudson et al., 1976).

2.2.4 Vaccinia Virus

Vaccinia Virus:

pp89-exprimierende Vaccinia Rekombinante (Volkmer et al., 1987)

2.2.4.1 Produktion eines Vaccinia-Virusstocks

Material :

PBS	siehe 2.2.2.2
-----	---------------

CV-1-Zellen wurden mit einer m.o.i. von 0,05 infiziert und solange (3 bis 5 Tage) kultiviert, bis alle Zellen einen cytopathischen Effekt zeigten und begannen, sich von der Kulturschale abzulösen. Nach dem Abernten wurden die Zellen in einer Heraeus Kühlzentrifuge bei 2 000 rpm und 4°C für 20 min pelletiert. Da die meisten (>90%) Vaccinia-Virionen mit den Zellen assoziiert sind, konnte der Überstand verworfen werden. Die Zellen wurden in einem kleinen Volumen PBS resuspendiert und mit einem Homogenisator aufgeschlossen oder dreimal mit Ultraschall (10 s, 150 W) behandelt. Die Zelltrümmer wurden durch erneute Zentrifugation (1 000 rpm, 5 min,

4°C) abgetrennt; der Überstand mit den Vaccinia-Virionen wurde in 1 ml Aliquots bei -70°C gelagert und für die weitere Produktion von Virusstocks sowie für die Infektion von Zellen zum Nachweis der Expression der rekombinanten Proteine eingesetzt.

2.2.4.2 Bestimmung des Virustiters eines Vacciniastocks

Zur Bestimmung des Titers eines Vacciniastocks wurden CV-1-Zellen so in eine Zellkulturplatte mit 48 Vertiefungen (1 cm²/well) ausgesät, dass sie am Tag der Infektion gerade konfluent waren. Aus dem zu titrierenden Vacciniastock wurde eine Verdünnungsreihe von 10⁻¹ bis 10⁻⁸ erstellt, mit der die Zellen nach Absaugen des Kulturüberstandes infiziert wurden. Nach 60 min Inkubation wurde frisches Medium entsprechend dem ursprünglichen Volumen zugegeben und 1 bis 2 Tage bis zum Auszählen der Plaques inkubiert.

2.2.4.3 Experimentelle Infektion mit Vaccinia-Rekombinanten

Für die Expression und den nachfolgenden Nachweis der rekombinanten Proteine wurden Zellen mit einer m.o.i. von 1 bis 5 der angegebenen Vaccinia-Rekombinanten infiziert. Dazu wurde das Kulturmedium der Zellen abgesaugt und die entsprechende Menge Virussuspension, die kurz vorher für 10 s bei 120 W beschallt worden ist, in 1/10 Volumen frischem Medium zugegeben. Nach 60 min Inkubation wurde mit frischem Medium bis zum ursprünglichen Volumen aufgefüllt und für den angegebenen Zeitraum kultiviert.

2.2.5 Immunfluoreszenz

Material :

PBS	siehe 2.2.2.2
Fixierlösung	3%(w/v) Paraformaldehyd in PBS (frisch angesetzt oder aufgetaut)
Quench-Lösung	50 mM NH ₄ Cl 20 mM Glycin in PBS
Permeabilisierungs-Puffer	0,1%(w/v) Triton X-100 in PBS
Blocking-Puffer	0,2%(v/v) Teleostier-Gelatine (Sigma, München) in PBS
Primärantikörper	verschiedene Antikörper (siehe 2.1.5), 1:50-1:100 verdünnt in PBS, Hybridomaüberstand unverdünnt
Sekundärantikörper	verschiedene Antikörper (siehe 2.1.5), 1:50-1:100 verdünnt in PBS

Eindeckmittel

Histosafe (Camon, Wiesbaden)

Die Deckgläser mit den für die Immunfluoreszenz kultivierten Zellen, wurden nach dem Entfernen des Kulturmediums zweimal mit jeweils 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml 3% Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen gewaschen und für 10 min mit Quench-Lösung behandelt, um nichtreagierte Aldehydgruppen abzusättigen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, wurden die Zellen 5 min mit 2 ml 0,1% Triton X-100 permeabilisiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurden die permeabilisierten Zellen für 10 min mit Gelatine-Lösung inkubiert. Die Antikörperfärbung erfolgte mit der Parafilm-Technik; dazu wurden Parafilmstreifen in einer feuchten Kammer ausgebreitet und für jedes einzelne Deckglas mit 30-50 µl des 1. Antikörpers versehen. Anschließend wurden die Deckgläser mit den Zellen nach unten vorsichtig in die Antikörperlösung gelegt und für 30 bis 40 min inkubiert. Danach wurden die Deckgläser mit der Zelleseite nach oben wieder in Vertiefungen einer 6- oder 12-well-Zellkulturplatte überführt und dreimal mit PBS gewaschen. Die Färbung mit dem Fluorescein-konjugierten Antikörper erfolgte ebenfalls mit der Parafilm-Technik, jedoch um das Ausbleichen des Fluoresceins zu verhindern, im Dunkeln. Zum Schluss wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen und mit der Zelleseite nach unten in einen Tropfen Eindeckmittel auf einen Objektträger gelegt. Die angefärbten Zellen konnten dann mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert und mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop dokumentiert werden.

2.2.6 Cytofluorometrische Analyse

2.2.6.1 Nachweis von Oberflächenantigenen

Material :

PBS	siehe 2.2.2.2
EDTA-Lösung	1 mM in PBS
FACS-Puffer	2%(v/v) FCS 0,03%(w/v) NaN ₃ in PBS
Primärantikörper	verschiedene Antikörper (siehe 2.1.5), 1:50-1:100 verdünnt in PBS, Hybridomaüberstand unverdünnt
Sekundärantikörper	verschiedene Antikörper (siehe 2.1.5), 1:50-1:100 verdünnt in PBS
Propidiumjodid-Stammlösung	1 mg/ml in PBS

Die für die Durchflusscytometrie angesetzten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit EDTA von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden dann, je nach Anzahl der Färbungen, aufgeteilt, pelletiert, und mit dem angegebenen Erstantikörper mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen für die Negativkontrolle wurden in FACS-Puffer ohne Antikörper inkubiert. Nach dem Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen mit dem entsprechenden Zweitantikörper aufgenommen und ebenfalls für mindestens 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen, wurden die Zellpellets in 500 µl FACS-Puffer mit 2 µg/ml Propidiumjodid resuspendiert und mit einem FACSCalibur-Durchflußcytometer analysiert. In der Regel wurden 10^4 lebende Zellen, d.h. Zellen deren DNA nicht durch Propidiumjodid angefärbt werden konnte, aufgenommen. Zur graphischen Darstellung wurde für jeden Ansatz jeweils die spezifische Fluoreszenzintensität zusammen mit der Negativkontrolle (unspezifische Fluoreszenz) in einem Diagramm gegen die Zellzahl aufgetragen.

2.2.6.2 Nachweis von intrazellulären Antigenen

Material :

PBS	siehe 2.2.2.2
EDTA-Lösung	1 mM in PBS
Paraformaldehyd-Lösung	3%(w/v) in PBS
Quench-Lösung	50 mM NH_4Cl 20 mM Glycin in PBS
Saponin-FACS-Puffer	0,1%(w/v) Saponin in FACS-Puffer

Für die Anfärbung von intrazellulären Antigenen wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit EDTA abgelöst und 10 min bei RT mit Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen zur Absättigung nichtreagierter Aldehydgruppen 10 min mit Quench-Lösung inkubiert. Die Antikörperfärbung erfolgte wie unter 2.2.6.1 beschrieben, jedoch immer in 0,1% Saponin-Puffer und mindestens 45 min bei RT. Nach dem letzten Waschen mit Saponin-Puffer, wurden die Zellen in Saponin-Puffer resuspendiert und wie unter 2.2.6.1 mit einem FACSCalibur analysiert.

2.2.7 Immunpräzipitation

2.2.7.1 Metabolische Markierung

Material :

Cys/Meth-freies Medium	RPMI ohne Cystein und Methionin (Gibco/BRL)
Chase-Medium	Vollmedium mit 5 mM Methionin
[³⁵ S]-Cystein und Methionin	Pro-Mix: L-[³⁵ S]-in vitro Cell labelling mix 14,3 mCi/ml (Amersham, Freiburg)

Für die metabolische Markierung von Proteinen wurden die Zellen so in kleine Zellkulturschalen (Ø 6 cm) umgesetzt, dass sie am Tag der Markierung zu ca. 80% konfluent waren. Vor der Markierung wurden die Zellen zuerst zweimal mit vorgewärmtem PBS und einmal mit Cys/Met-freiem Medium gewaschen und für 60 min in 1 ml Cys/Met-freiem Medium bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit, in dem das restliche „kalte“ Cystein und Methionin verstoffwechselt werden sollte, wurden die Zellen je nach Experiment und Zelltyp mit 200 bis 400 µCi Pro-Mix pro ml Medium für den angegebenen Zeitraum markiert. Vor der Lyse der Zellen wurden die Zellen auf Eis gestellt und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Wurde ein pulse-chase Experiment durchgeführt, wurde das Pulse-Medium nach der Markierungsphase abgesaugt und durch Chase-Medium mit einem Überschuß an „kaltem“ Methionin ersetzt, in dem die Zellen für den angegebenen Zeitraum weiterkultiviert wurden.

2.2.7.2 Immunpräzipitation

Material :

Lyse-Puffer	1%(w/v) NP40 bzw. 1% Digitonin 140 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 20 mM Tris/HCl (pH 7,6)
Proteaseinhibitorcocktail (100 ×)	500 µM AEBSF 500 µM EDTA 1 µM E-64 1µM Leupeptin 1 µg/ml Aprotinin
Protein A-Sepharose	CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) 50% Suspension, in Waschpuffer B gewaschen
Waschpuffer B	0,2%(w/v) NP40 bzw. 0,2%(w/v) Digitonin 1 mM Tris/HCl (pH 7,6) 150 mM NaCl

	2 mM EDTA
Waschpuffer C	0,2%(w/v) NP40 bzw. 0,2%(w/v) Digitonin 1 mM Tris/HCl (pH 7,6) 500 mM NaCl 2 mM EDTA
Waschpuffer D	10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
1 × SDS-Probenpuffer	200 mM Tris/HCl (pH 8,8) 34%(w/v) Sucrose 5 mM EDTA 0,01%(w/v) Bromphenolblau 3,07%(w/v) SDS (frisch zugesetzt) 38,5 mM DTT (frisch zugesetzt)
4 × SDS-Probenpuffer	800 mM Tris/HCl (pH 8,8) 40%(w/v) Sucrose 20 mM EDTA 0,04%(w/v) Bromphenolblau 12,28%(w/v) SDS (frisch zugesetzt) 154 mM DTT (frisch zugesetzt)

Die markierten Zellen (2.2.7.1) wurden nach dem Entfernen des Kulturüberstandes und nach dem Waschen mit kaltem PBS mit 1 ml Lyse-Puffer, der kurz vorher mit 1/10 Vol des Proteaseinhibitorcocktails versetzt worden ist, 10 min bei 4° C inkubiert. Das Lysat wurde dann in ein Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (15 min, 14000 rpm, 4°C) von Zelltrümmern befreit. Alle weiteren Schritte der Immunpräzipitation erfolgten - wenn nicht anders angegeben - bei 4° C. Um die Menge an markierten Proteinen im Lysat für die Präzipitation abgleichen zu können, wurden vor der Präzipitation jeweils 5 µl des Lysats mit einem Szintillator versetzt und in einem β-Counter gemessen.

Vor der spezifischen Präzipitation wurde das Lysat durch Inkubation mit Präimmenserum vorgeklärt. Dazu wurde das Lysat mindestens 45 min - je nach Präzipitation - mit 3 µl normalem Mäuse- bzw. Kaninchenserum und zweimal - ebenfalls mindestens 45 min - mit 50 µl Protein A-Sepharose geschüttelt, anschließend abzentrifugiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das vorgeklärte Lysat wurde dann mit dem spezifischem Antikörper (5-10 µl Ascites, Serum oder gereinigtem Antikörper) für mindestens 1 h und anschließend mit 50 µl Protein A-Sepharose für 45 min geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde die Protein A-Sepharose mit den gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexen mit je 1 ml dreimal mit Puffer B, zweimal mit Puffer C und einmal mit Puffer D gewaschen. Wurde keine Re-Immunpräzipitation (2.2.7.3) und kein Verdau mit Glycosidasen (2.2.7.4) durchgeführt, wurde die gewaschene Protein A-Sepharose in 50 µl

1 × SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C erhitzt, abgekühlt und kurz pelletiert. Die im Überstand vorhandenen denaturierten Proteine wurden dann in der SDS-PAGE (2.2.7.5) analysiert.

2.2.7.3 Re-Immunpräzipitation

Für die Re-Immunpräzipitation wurde die erste Präzipitation in Digitonin-Puffer (2.2.7.2) durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Immunkomplexe auf den Sepharose-Pellets nach Zugabe von 100 µl 1% SDS durch Inkubation bei 37°C für 15 min dissoziiert, durch Zentrifugation von der Sepharose getrennt, mit 1 ml NP40-Lysepuffer versetzt, und durch zweimalige Inkubation mit Protein A-Sepharose vom Erstantikörper befreit. Die zweite Präzipitationsrunde erfolgte wie unter (2.2.7.2) beschrieben, jedoch in NP40-Puffer.

Wurde das erste Präzipitat direkt in der SDS-PAGE - neben den Re-Immunpräzipitaten - analysiert, wurde dafür fünfmal weniger Lysat eingesetzt.

2.2.7.4 Glycosidase-Verdau

Material :

β-ME/SDS für Endo H		0,1 M β-Mercaptoethanol 0,1%(w/v) SDS
Endo H-Puffer (für 4 Reaktionen)	20 µl 5 µl 70 µl 5 µl	0,5 M Natriumcitrat, pH 5,5 10%(w/v) PMSF in Isopropanol H ₂ O Endoglycosidase H (5 mU/µl) (Roche Diagnostics Mannheim)
β-ME/SDS für PNGase F		0,1 M β-Mercaptoethanol 0,5 %(w/v) SDS
PNGase F-Puffer (für 4 Reaktionen)	40 µl 8 µl 4 µl 20 µl 24 µl 4 µl	Tris/HCl, pH 8,0 10%(w/v) PMSF in Isopropanol 0,5 M EDTA 10%(w/v) NP-40 H ₂ O Peptid-N-Glycosidase F (1 mU/µl) (Roche Diagnostics Mannheim)

Für die Deglykosylierung präzipitierter Glykoproteine durch Endoglycosidase H (Endo H) bzw. Peptid-N-Glycosidase F (PNGase F) wurde das Sepharose-Pellet mit dem Präzipitat nach dem letzten Waschschrift (2.2.7.2) in 50 µl β-Mercaptoethanol/SDS aufgenommen und zur Dissoziation der Proteine von der Sepharose für 5 min bei 95°C gekocht. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand in zweimal 25µl Aliquots aufgeteilt

und in neue Reaktionsgefäße überführt. Die eine Hälfte wurde dann mit 25µl Endo H-Puffer bzw. PNGase F-Puffer mit Enzym und die andere Hälfte mit 25µl des Puffers ohne Enzym versetzt und für 15-20 h bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde dann durch Zugabe von 16µl 4×SDS-Probenpuffer (siehe 2.2.7.2) und Aufkochen bei 95°C für 5 min gestoppt und für die SDS-PAGE eingesetzt.

2.2.7.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Material :

Acrylamid-Lösung	29,2%(w/v) Acrylamid 0,8%(w/v) N,N-Methylenbisacrylamid
4 × Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
4 × Trenngelpuffer	2 M Tris/HCl (pH 8,8)
SDS-Lösung	20%(w/v) SDS in H ₂ O
Sucrose-Lösung	60%(w/v) Sucrose in H ₂ O
APS-Lösung	10%(w/v) APS (Ammoniumpersulfat) in H ₂ O
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	(Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden)
Elektrophoresepuffer (Laufpuffer)	50 mM Tris 0,4 M Glycin 0,1%(w/v) SDS (frisch zugesetzt)
Molekulargewichtsmarker	[¹⁴ C]-methylierte Proteine (14,3 kDa - 200 kDa) 0,37 - 3,7 Mbq/mg (10 - 100 µCi/mg) Protein 1,85 kBq/ml (5 µCi/ml) (Amersham, Freiburg)
Fixierlösung	40% Methanol 10% Essigsäure in H ₂ O

Die gelelektrophoretische Analyse von Proteinen wurde nach der Methode von (Maizel, 1969), modifiziert durch (Blobel and Dobberstein, 1975), durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem ca. 200 × 300 × 1 mm großen 11,5% -13,5% Gradientengel.

<u>Trenngel:</u>	<u>11,5% Lösung</u>	<u>13,5% Lösung</u>
Acrylamid	15,3 ml	18 ml
2 M Tris/HCl (pH 8,8)	8,4 ml	8,4 ml

20% SDS	200 µl	200 µl
60% Sucrose	-	10 ml
H ₂ O	16,08 ml	3,38 ml
TEMED	20 µl	20 µl
10% APS	120 µl	120 µl

Die zwei Lösungen für das Gradientengel wurden bei RT angesetzt mit Hilfe eines LKB-Gradientenmischers gemischt, gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der Isopropanol entfernt und das Gel mit 70% EtOH und H₂O gespült.

<u>Sammelgel:</u>	<u>5% Lösung</u>
Acrylamid	5 ml
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	4 ml
20% SDS	150 µl
60% Sucrose	7 ml
H ₂ O	14 ml
TEMED	15 µl
10% APS	150 µl

Nach dem Mischen und Gießen des Sammelgels wurde vor der Polymerisation der Kamm (20 Taschen, 0,8 cm breit) eingesteckt. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt, mit Laufpuffer überschichtet und mit den Proben und einem Molekulargewichtsmarker beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte über Nacht bei einer konstanten Stromstärke von 20 bis 25 mA. Nachdem die Bromphenolblaubande aus dem Gel gelaufen war, wurde der Lauf gestoppt, das Trenngel von den Glasplatten gelöst und zweimal 30 min in Fixierlösung auf dem Taumler geschüttelt. Nach der Fixierung wurde das Gel auf ein Whatmanpapier transferiert, mit Haushaltsfolie abgedeckt und 2,5 h bei 58°C unter Vacuum in einem Geltrockner getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Gel mehrere Tage gegen einen Röntgenfilm exponiert, der dann mit einer automatischen Entwicklermaschine (Amersham) entwickelt und fixiert wurde.

2.2.8 Cytotoxizitätstest (⁵¹Chrom-Freisetzungstest)

Material :

⁵¹Chrom Na⁵¹CrO₄ , 80µg Cr/ml, 25,4 mCi/ml
(Amersham, Freiburg)

Der Cytotoxizitätstest wird durchgeführt, um entweder die lytische Aktivität von cytotoxischen T-Zellen (CTL, *effectors*, E) zu bestimmen, oder die Antigenpräsentation von Zielzellen (*targets*, T) zu messen. Hierzu werden die Zielzellen mit ⁵¹Chrom markiert und anschließend zusammen - in unterschiedlichen Verhältnissen (E:T ratio) mit CTL inkubiert. Da die CTL die Zielzellen lysieren, wenn sie das spezifische Antigen auf der Oberfläche der *targets* erkennen, wird die vorher intrazelluläre Radioaktivität in den Überstand freigesetzt und kann als Maß für die spezifische Lyse verwendet werden.

Ca. 5×10⁵ Zielzellen wurden 60-90 min mit 100 µCi Na⁵¹CrO₄ markiert und anschließend dreimal mit Kulturmedium gewaschen. Jeweils 1000 markierte Zielzellen wurden in Mikrotiterplatten zu den titrierten Effektorzellen hinzugegeben. Um die Zellen möglichst schnell in räumliche Nähe zu bringen, wurden die Platten 2 min bei 200g zentrifugiert und anschließend für 4 h im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurden 100 µl Kulturüberstand abgenommen und die darin enthaltene Radioaktivität mit einem γ-Zerfallmessgerät bestimmt. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität wurden die Zielzellen resuspendiert, und 100 µl der Suspension wurde gemessen. Die Spontanlyse stellt die Menge an freigesetzter Aktivität in Abwesenheit von CTL dar. Die spezifische Lyse berechnet sich nach der Gleichung:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{[\text{cpm (Probe)} - \text{cpm (Spontanlyse)}] \times 100}{\text{cpm (Gesamtaktivität)} - \text{cpm (Spontanlyse)}}$$

3 Ergebnisse

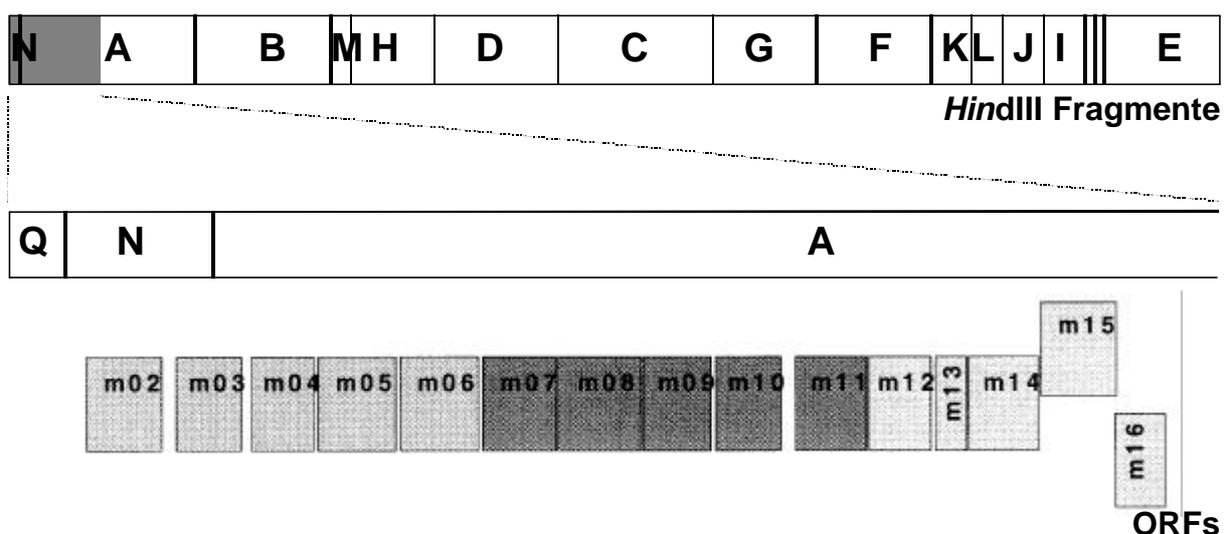
3.1 Das MCMV Gen *m06* kodiert für gp48

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers CROMA231, der das *early* Glykoprotein gp48 von MCMV erkennt, konnte der im genomischen *Hind*III-A-Fragment gelegene ORF *m06* (Nt 5327-Nt 6337) als kodierendes Gen für gp48 identifiziert werden (Abb. 4A) (Rawlinson et al., 1996; Reusch, 1995). Das Gen *m06* kodiert für ein Polypeptid aus 336 Aminosäuren, das ein potenzielles Typ I Transmembran-Glykoprotein darstellt (Abb. 4B, C). Nach einer Folge hydrophober Aminosäuren am N-Terminus wird nach Aminosäure 29 eine Signalpeptid-Spaltstelle vorhergesagt (von Heijne, 1986). Darauf folgt die luminaire Domäne aus 245 Aminosäuren mit 6 Konsensussequenzen für *N*-Glykosylierungen und ein zweiter hydrophober Bereich von Aminosäure 276 bis 299, der eine Transmembrandomäne darstellt. Der cytoplasmatische Anteil von gp48 besteht aus 37 Aminosäuren und enthält zwei di-Leucin-Motive. Für das nichtglykosylierte Protein ohne Signalpeptid wird ein Molekulargewicht von 34,5 kDa vorhergesagt. Das glykosylierte, Endo H-sensitive gp48 hat ein Molekulargewicht von 48 kDa in der SDS-Gelelektrophorese, und weist 6 *N*-verknüpfte Oligosaccharidseitenketten auf (Lucin, P., persönliche Mitteilung).

In der Genbank konnte bisher weder auf Nukleinsäureebene, noch auf Aminosäureebene eine homologe Sequenz zu *m06* bzw. gp48 gefunden werden. *m06* gehört zu der am linken Genomterminus von MCMV gelegenen *m02* Genfamilie, welche die Leseraster *m02* bis *m16* umfaßt. Diese tandemartig hintereinanderliegenden Leseraster kodieren alle für potenzielle Typ I Transmembran-Glykoproteine, die untereinander signifikante Homologien aufweisen und verschiedene Aminosäurekonsensussequenzen teilen (Rawlinson et al., 1996). Von diesen Leserastern wurde bisher nur das Gen *m04* und dessen Produkt gp34 charakterisiert (Kleijnen et al., 1997).

Das *early* Gen *m06* des murinen Cytomegalovirus kodiert für ein Typ I Transmembranprotein aus 336 Aminosäuren, welches nach Glykosylierung ein Molekulargewicht von 48 kDa aufweist.

A



B



C

```

1  MDTTARGSTR SRPVQLLALV TVLASMTFQM GESLIPIIPD FSSFMMNPLP
51  MPQIMPPSTN ETKESYVKTE EPIVGCNVSF TEINRLKNQM KKIPNTFKCF
101 KKDGVRTSLD MQTTGEKRFA CEIPNNVYVN ATWYVHWVVG KIAASVSPIV
151 YFTSTTSSPP TLDGNMHPFY RRKIVTAANG FKVDEKTGDI TVARSNASLA
201 DSVRCRLIVC LWTKNDSISD LPDDDPQMKN MSGVIKLPDY SGPDTLLTDG
251 VPFDYAAWRQ RMRTEMEEPS RRRRQLLLVI SVIASLLWLA VGAMLFYTYG
301 REPLARLLLKR YGKQLAAVRI PADGKDQSLT SPLLLTK

```

Abb. 4: Das Gen *m06* von MCMV

In (A) dargestellt sind die *HindIII*-Fragmente des MCMV Genoms, und daraus vergrößert der linke Genomterminus mit den Leserastern (ORF) *m02* bis *m16* der *m02* Genfamilie. Die 15 Gene der *m02* Genfamilie können aufgrund ihrer Homologie zueinander in die drei Gruppen *m02-m06*, *m07-m11* und *m12-m16* geteilt werden, welche in der Abbildung A in unterschiedlichen Graustufen gezeigt werden (Rawlinson et al., 1996). Das Gen *m06* kodiert für ein Protein aus 336 Aminosäuren, das in (B) schematisch dargestellt ist. Das Protein besteht aus einem Signalpeptid (SP), einer luminalen Domäne mit 6 *N*-Glykosylierungsstellen (verzweigte Symbole), einer Transmembrandomäne (TM) und einem cytoplasmatischen Anteil (CT). (C) Die Aminosäuresequenz des *m06* Genproduktes: grau unterlegt ist das Signalpeptid, die Asparagine (N) der Glykosylierungsstellen sind fett gedruckt und die Transmembrandomäne ist unterstrichen. Im cytoplasmatischen Anteil sind die di-Leucin-Motive mit potenzieller Transportfunktion doppelt unterstrichen.

3.2 Die Expression von MCMV *m06* führt zum Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Plasmamembran

Nach der Identifikation des Gens *m06* als potenzielles MHC-Klasse-I-regulierendes Gen, wurde versucht, *m06* stabil in Mausfibroblasten zu exprimieren. Da es nicht gelang, über konventionelle Expressionsvektoren eine anhaltende Genexpression zu erreichen, wurde das Leseraster in das episomal replizierende Expressionsplasmid B45-Neo unter die Kontrolle eines Metallothioneinpromotors kloniert (Ohe et al., 1995). Da NIH 3T3-Zellen eine besonders hohe Kopienzahl dieses episomalen Vektors erlauben, wurden diese Mausfibroblasten ausgewählt. Nach Elektroporation dieser Zellen mit dem leeren Vektor und parallel mit dem klonierten *m06*, konnten unter G418-Selektion stabile Transfektanten etabliert werden.

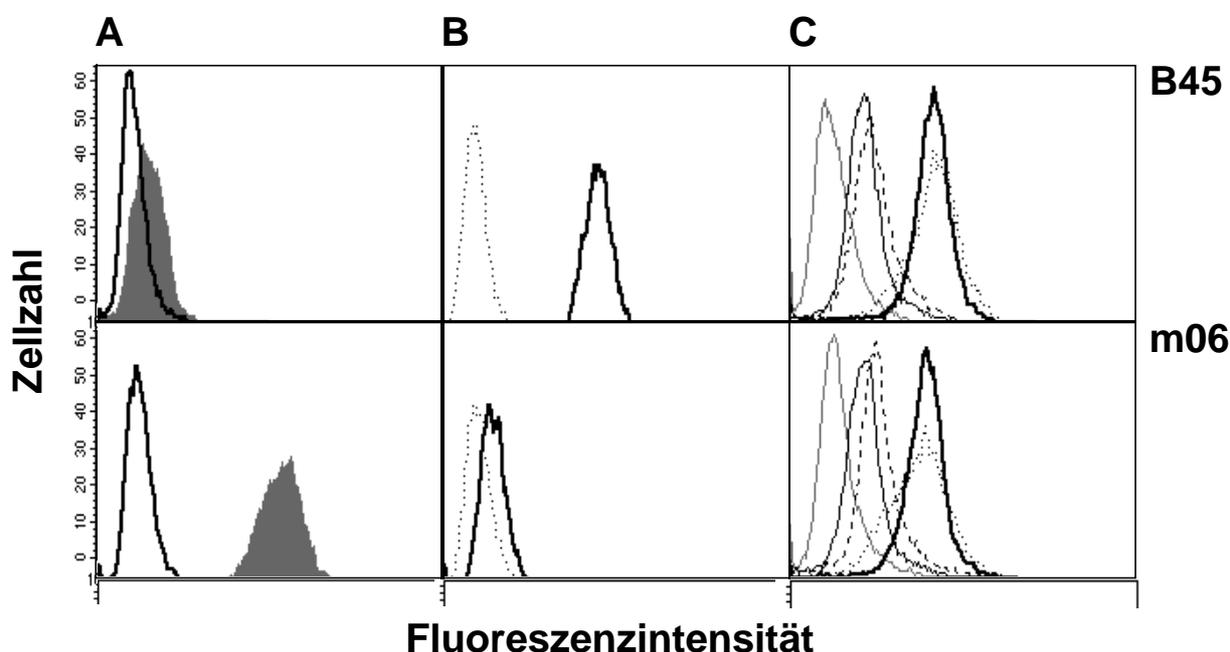


Abb. 5: Selektiver Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran von *m06*-Transfektanten

NIH 3T3-Kontrolltransfektanten (B45) und Zellen, die mit dem Vektor mit *m06* transfiziert wurden (m06), wurden cytofluorometrisch analysiert. (A) Die intrazelluläre Anfärbung mit CROMA231 gegen gp48 als Erstantikörper nach Permeabilisierung der Membranen mit Saponin (ausgefüllte, graue Histogramme) zeigt, dass die *m06*-Transfektanten gp48 exprimieren, während die Färbung der Kontrollzellen nahezu der Färbung mit FITC-konjugiertem Zweitantikörper allein (dicke Linie) entspricht. (B) Die H-2L^Q-Moleküle der Kontrolltransfektanten können nach Oberflächenmarkierung mit mAk 28-14-8s (dicke Linie) nachgewiesen werden, wohingegen die *m06*-Transfektanten einen fast vollständigen Verlust von H-2L^Q-Molekülen an der Zellmembran aufweisen. Eine Färbung der Zellen mit dem Zweitantikörper allein diente als Negativkontrolle (gepunktete Linie). (C) Die Oberflächenanalyse nach Anfärbung der Zellen mit IM7.8.1 gegen Pgp-1 (dicke Linie), anti-Integrin β 1 (gestrichelte Linie), anti-Lamp-1 (dünne schwarze Linie), R17 217.1.3 gegen Transferrin-Rezeptor (gepunktete Linie) und Zweitantikörper allein (dünne graue Linie) demonstriert, dass der MHC-Klasse-I Verlust an der Zellmembran der *m06*-Transfektanten selektiv ist, da gp48 die Expression von Pgp-1, Integrin β 1, Lamp-1 oder Transferrin-Rezeptor nicht beeinträchtigt.

Die cytofluorometrische Analyse nach intrazellulärer Anfärbung der Transfektanten mit dem gp48-spezifischen Antikörper CROMA231 zeigt, dass die *m06*-Transfektanten eine relativ homogene Population darstellt, welche gp48 exprimiert (Abb. 5A). Die Kontrolltransfektanten (B45), die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, sind negativ für CROMA231. Um zu überprüfen, ob die *m06*-Expression einen Effekt auf MHC-Klasse-I-Moleküle hat, wurden nichtpermeabilisierte Transfektanten mit dem monoklonalen Antikörper (mAk) 28-14-8s angefärbt, der die in NIH 3T3 exprimierten H-2L^q-Moleküle erkennt. Die FACS-Analyse (Abb. 5B) zeigt eindeutig, dass die Kontrollzellen L^q-Moleküle an der Oberfläche exprimieren, während die *m06*⁺ Zellen einen nahezu kompletten Verlust von H-2L^q-Molekülen aufweisen. Abb. 5C demonstriert, dass der Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran durch die *m06*-Expression selektiv ist, da andere membranständige Proteine, wie Pgp-1, Integrin β 1, Lamp-1 und Transferrin-Rezeptor, nicht beeinträchtigt werden.

Zellen, die das MCMV Gen *m06* stabil exprimieren, sind durch einen Verlust von H-2L^q-Molekülen an der Zellmembran charakterisiert, während die Expression anderer Oberflächenproteine durch *m06* nicht beeinträchtigt wird.

3.3 MCMV gp48 reduziert die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation

Um zu untersuchen, ob der *m06*-bedingte Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen einen Effekt auf die Präsentation von antigenen Peptiden gegenüber CD8⁺ T-Zellen hat, wurde ein Cytotoxizitätstest durchgeführt. Da die pp89-spezifischen CTLs H-2L^d-restringiert sind, und NIH 3T3-Fibroblasten dieses MHC-Allel nicht kodieren, wurden BALB.SV-Fibroblasten (Klon C12) mit B45 und B45-*m06* transfiziert.

Nach Etablierung stabiler Transfektanten wurde die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen mittels FACS analysiert (Abb. 6). Die BALB.SV-*m06*-Transfektanten weisen - im Gegensatz zu den NIH 3T3-Transfektanten - keinen vollständigen Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran auf, doch sowohl die Menge an H-2K^d- als auch die von D^d- und L^d-Molekülen ist um mehr als 50% reduziert.

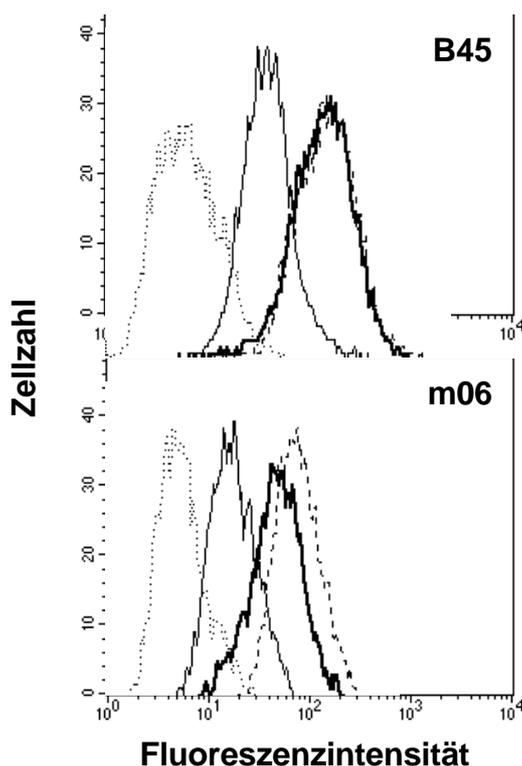


Abb. 6: *m06*-vermittelte MHC-Klasse-I Reduktion in BALB.SV-Fibroblasten

BALB.SV-Fibroblasten (C12), die entweder mit dem Vektor B45 allein oder mit *m06* stabil transfiziert worden sind, wurden cytofluorometrisch auf ihre MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression analysiert. K^d-Moleküle wurden mit mAk SF1.1.1 (dicke Linie), D^d-Moleküle mit mAk 35-5-8s (dünne Linie), und L^d-Moleküle mit mAk 28-14-8s (gestrichelte Linie) angefärbt. Die Färbung der Zellen mit FITC-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG diente als Negativkontrolle (gepunktete Linie). Die Analyse zeigt, dass in *m06*-exprimierenden BALB.SV-Fibroblasten die Oberflächen-expression von K^d, D^d und L^d im Vergleich zu der in Kontrolltransfektanten (B45) reduziert ist.

Um zu überprüfen, ob *m06* trotz des geringeren Effektes auf MHC-Klasse-I-Moleküle, einen Einfluss auf die Antigenpräsentation hat, wurden die BALB.SV-Transfektanten mit pp89-exprimierenden Vaccinia Viren (Volkmer et al., 1987) infiziert und mit pp89-spezifischen, L^d-restringierten CTL (*effectors*, E) in einem 4-stündigen [⁵¹Cr]-Freisetzungsversuch als Zielzellen (*targets*, T) eingesetzt (Abb. 7). Kontrollzellen, in denen pp89 über Vaccinia exprimiert wurde, wurden von spezifischen CTLs erkannt und in einer von E:T-Verhältnis-abhängigen Weise lysiert. Im Gegensatz hierzu war die Lyse der pp89-exprimierenden *m06*-Transfektanten stark reduziert. Um eine mit den Kontrollzellen vergleichbare Lyse zu erzielen, waren ca. zehnmal mehr Effektorzellen erforderlich.

Der Cytotoxizitätstest demonstriert, dass MCMV gp48 nicht nur phänotypisch die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran moduliert, sondern auch die MHC-Klasse-I-restringierte Präsentation endogener Peptide gegenüber CD8⁺ cytotoxischer T-Zellen hemmt.

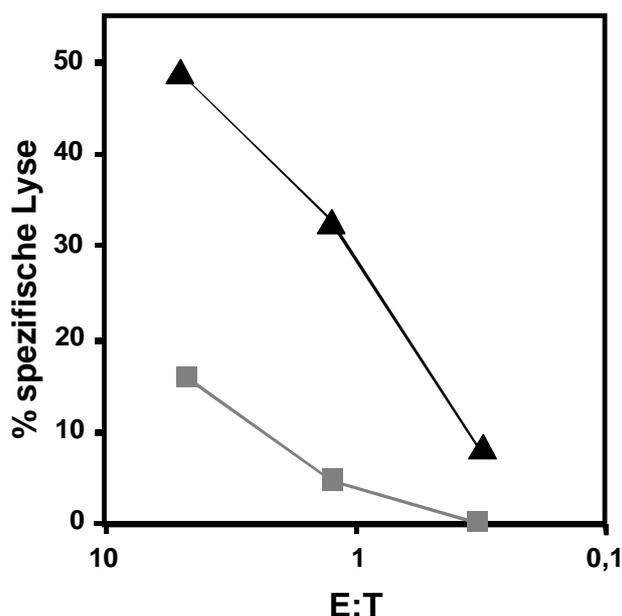


Abb. 7: MCMV gp48 reduziert die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation gegenüber CD8⁺ CTL

BALB.SV-*m06*-Transfektanten (graue Quadrate) und Kontrollzellen (schwarze Dreiecke) wurden mit pp89-exprimierenden Vacciniaviren infiziert und als Zielzellen (T, *targets*) mit pp89-spezifischen CTL (E, *effectors*) in einem [⁵¹Cr]-Freisetzungsversuch auf Antigenpräsentation getestet. Die Zahl an CTL pro Zielzelle ist als E:T Verhältnis angegeben. Im Vergleich zu den Kontrolltransfektanten ist die spezifische Lyse der pp89-exprimierenden *m06*-Transfektanten reduziert; es sind ca. zehnmals mehr CTLs notwendig, um eine vergleichbare Lyse zu erhalten. (Der Cytotoxizitätstest wurde mit der Unterstützung von Maren Eggers und Hartmut Hengel durchgeführt)

3.4 MHC-Klasse-I-Moleküle und gp48 haben eine reduzierte Halbwertszeit in *m06*-exprimierenden Zellen

Das Schicksal der neusynthetisierten MHC-Klasse-I-Moleküle in *m06*-Transfektanten wurde in *pulse-chase* Experimenten untersucht. NIH 3T3-Transfektanten wurden mit [³⁵S]-Cys/Met metabolisch markiert und für unterschiedliche *chase*-Zeiten in Medium mit nichtmarkiertem Cys/Met weiterkultiviert. Aus den Zelllysaten wurden unter Verwendung des mAk 28-14-8s H-2L^q-Moleküle präzipitiert (Abb. 8A). Anschließend erfolgte die Präzipitation von gp48 mit Hilfe des mAk CROMA229 (Abb. 8B). Sowohl die MHC-Klasse-I- als auch die gp48-Präzipitate wurden mit Endo H behandelt bevor sie in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Da Endoglykosidase H (Endo H) nur mannosereiche Oligosaccharidseitenketten hydrolysiert, wie sie in Glykoproteinen zu finden sind, die sich im sekretorischen Transportweg vor dem *medialen* Golgi befinden, können mit Hilfe des Endo H-Verdau Hinweise über die Lokalisation eines Glykoprotein gewonnen werden (Tarentino and Plummer-TH, 1994). Abb. 8A und C zeigt, dass in *m06*-Transfektanten im Vergleich zu den Kontrollzellen die Menge an neusynthetisierten, Endo H-sensitiven MHC-Klasse-I-Molekülen nicht verändert ist. Während der *chase*-Periode erhalten Klasse I-Moleküle in Kontrollzellen Endo H-resistente Oligosaccharidseitenketten und sind über einen Zeitraum von 4 h stabil.

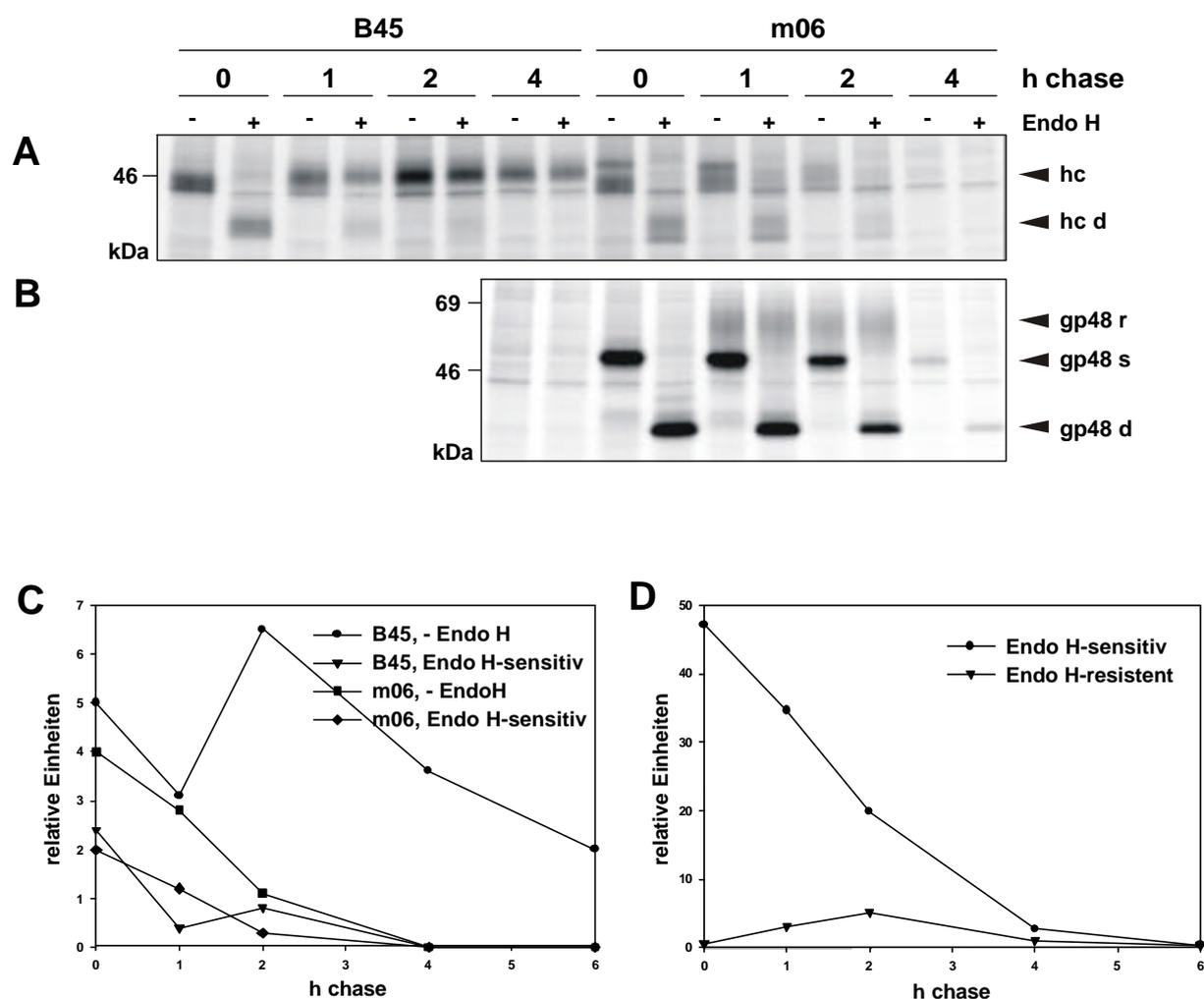


Abb. 8: Kurze Halbwertszeit von MHC-Klasse-I-Molekülen und gp48 in *m06*-Transfektanten

NIH 3T3-Kontrollzellen (B45) und *m06*-Transfektanten wurden für 30 min mit [35 S]-Cys/Met metabolisch markiert und für die angezeigten Zeiträume in Medium mit nichtmarkiertem Aminosäuren weiterkultiviert (*chase*). Nach der Lyse der Zellen in 1% NP-40 Lysepuffer wurden H-2L^d-Moleküle mit mAk 28-14-8s (**A**) und gp48 mit CROMA229 (**B**) präzipitiert. Die Hälfte jedes Präzipitats wurde mit Endo H behandelt (+) bevor die Proteine in einem 11,5-13,5% Gradientengel aufgetrennt und autoradiographisch nachgewiesen wurden. Zur Bestimmung der Halbwertszeit wurden die Intensität des radioaktiven Signals der präzipitierten Proteinen mittels Phosphoimager vermessen und als relative Einheiten gegen die Zeit aufgetragen. (**C**) zeigt die Kinetik der H-2L^d-Moleküle aus Kontrollzellen (B45) und *m06*-Transfektanten. Die Messung der gesamten Population der MHC-Klasse-I schweren Kette (- Endo H) zeigt eine deutliche Verkürzung der Halbwertszeit in *m06*-Transfektanten auf ca. 1,5 h im Vergleich zu einer Halbwertszeit von mehr als 4 h in Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu ist die Kinetik der Endo H-sensitiven Moleküle in *m06*-Transfektanten unverändert. Abb. **D** gibt die Kinetik von Endo H-sensitivem und Endo H-resistentem gp48 wieder. Ausgangspunkt für die Endo H-resistente Population wurde der Wert bei 2 h gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die maximale Menge an Endo H-resistentem gp48 vorliegt. Die Halbwertszeit des sensitiven gp48 liegt zwischen 1,5 und 2 h, die von resistentem gp48 zwischen 1 und 1,5 h. hc, MHC-Klasse-I schwere Kette; d, deglykosyliert; r, Endo H-resistent; s, Endo H-sensitiv.

In *m06*-Transfektanten dagegen sind nach der *chase*-Periode Endo H-resistente MHC-Moleküle kaum nachweisbar, und die Gesamtmenge an präzipitierten MHC-Molekülen nimmt während der *chase*-Periode kontinuierlich ab. Der Großteil des präzipitierten gp48 bleibt über den gesamten Zeitraum Endo H-sensitiv, und läuft im Gel nach Endo H-Behandlung bei ca. 35 kDa (Abb. 8B). Nur eine kleine Population von gp48 wird resistent gegenüber Endo H und läuft, aufgrund der Modifikation der Oligosaccharidseitenketten im Golgi zu einer komplexen Form, bei einem Molekulargewicht zwischen 50 und 60 kDa. Beide Formen von gp48 werden im Laufe der *chase*-Periode abgebaut. Die Halbwertszeit von MHC-Molekülen in Kontrollzellen ist größer als 4 h und in den *m06*-Transfektanten etwa 1,5 h. Endo H-sensitives gp48 hat eine Halbwertszeit zwischen 1,5 und 2 h und hochglykosyliertes, Endo H-resistentes gp48 zwischen 1 und 1,5 h (Abb. 8C, D).

Pulse-chase Experimente haben gezeigt, dass in *m06*-exprimierenden Zellen die Halbwertszeit von neusynthetisierten H-2L^a-Molekülen verkürzt ist, und dass gp48 selbst ebenfalls rasch abgebaut wird.

3.5 MCMV gp48 bildet einen Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen und Calnexin

Bei der Präzipitation von MHC-Klasse-I-Molekülen aus *m06*-Transfektanten konnte wiederholt beobachtet werden, dass neben der MHC-Klasse-I schweren Kette ein weiteres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 48 kDa bzw. 35 kDa nach Endo H-Behandlung nachweisbar ist (vgl. Abb. 8A). Dieses Protein könnte ko-immunpräzipitierendes gp48 darstellen. Des weiteren konnten nach Präzipitation mit CROMA229 Proteine von der Größe der schweren Kette, β_2 -Mikroglobulin, und ein Protein von ca. 90 kDa beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Um diese Proteine zu identifizieren, wurde nach metabolischer Markierung von Kontroll- und *m06*-Transfektanten gp48 mit CROMA229 (Abb. 9A) und H-2L^a-Moleküle mit mAk 28-14-8s (Abb. 9B) aus Digitonin-Lysaten präzipitiert. Nach Dissoziation der Präzipitate in 1% SDS wurden Re-Immunpräzipitationsexperimente mit Antikörpern gegen MHC-Klasse-I-Moleküle und Calnexin durchgeführt. Um Aufschluss über den Glykosylierungszustand der Proteine zu erhalten, wurde die Hälfte der Präzipitate vor der Gelelektrophorese mit Endo H behandelt.

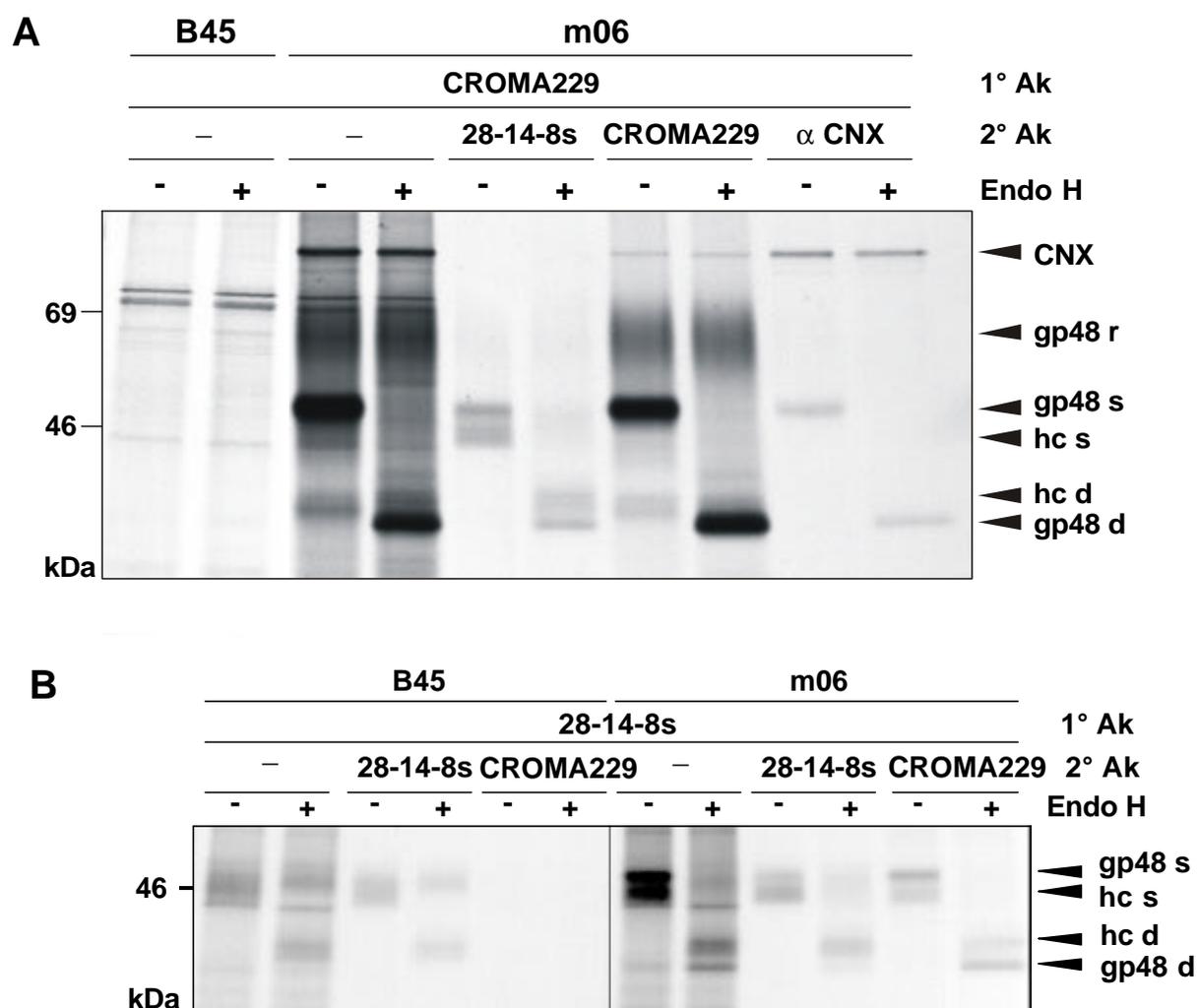


Abb. 9: Assoziation von gp48 mit MHC-Klasse-I-Molekülen und Calnexin

NIH 3T3-Zellen, die entweder mit dem Vektor B45 oder B45-*m06* stabil transfiziert worden sind, wurden für 4 h mit [³⁵S]-Cys/Met metabolisch markiert und in 1% Digitonin Puffer lysiert. Nach der Präzipitation von gp48 mit CROMA229 (**A**) und von H-2L^q-Molekülen mit mAk 28-14-8s (**B**), wurde das Präzipitat aufgeteilt und entweder direkt analysiert, oder in 1% SDS dissoziiert und einer zweiten Präzipitationsrunde in 1% NP-40 unterworfen. Bei der Re-Immunpräzipitation mit den Antikörpern 28-14-8s, CROMA229 oder mit einem polyklonalen Kaninchenserum gegen Calnexin (CNX) konnten aus den gp48-Präzipitaten (**A**) MHC-Klasse-I-Moleküle und Calnexin gefällt werden. Die Repräzipitation von gp48 mit CROMA229 diente als Positivkontrolle. Wurden in der ersten Präzipitationsrunde zuerst MHC-Klasse-I-Moleküle gefällt (**B**), konnte mit CROMA229 nur aus *m06*- nicht aber aus B45-Lysaten gp48 repräzipitiert werden. Die Hälfte der Proben wurde vor der Auftrennung durch eine 11,5-13,5% SDS-PAGE mit Endo H behandelt. hc, MHC-Klasse-I schwere Kette; r, Endo H-resistent; s, Endo H-sensitiv; d, deglykosyliert.

Die Re-Immunpräzipitation von MHC-Klasse-I schwerer Kette mit 28-14-8s aus CROMA229-Präzipitaten beweist die Assoziation von gp48 mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Mit einem Antiserum gegen das ER-Chaperon Calnexin konnte gezeigt werden, dass gp48 auch an Calnexin bindet. Dieses Chaperon erkennt über seine Lectin-artige Domäne monoglukosylierte Glykoproteine und hat Hilfsfunktion bei der Proteinfaltung (Hebert et al., 1995). Ob die

Assoziation mit Calnexin eine Rolle bei der MHC-Klasse-I-spezifischen Funktion von gp48 spielt, ist noch unbekannt. Das *vice versa* Experiment (Abb. 9B) demonstriert, dass mit MHC-Klasse-I-spezifischen Antikörpern gp48 aber nicht Calnexin ko-immunpräzipitiert werden kann. Die gp48-MHC-Klasse-I-Komplexbildung verhindert nicht die Bindung von 28-14-8s an die $\alpha 3$ Domäne der MHC-Klasse-I schweren Kette (Solheim et al., 1993) bzw. die Bindung des Antikörpers führt nicht zur Dissoziation der gp48/MHC-Klasse-I-Komplexe. Nach der Repräzipitation von MHC-Klasse-I-Molekülen als auch von Calnexin konnte wieder kopräzipitierendes gp48 gefunden werden (Abb. 9A). Dies ist entweder dadurch bedingt, dass die Komplexe nach der ersten Präzipitation nicht vollständig aufgelöst wurden, oder dass die Proteine während der zweiten Präzipitationsrunde re-assoziierten.

Re-Immünpräzipitationsexperimente demonstrieren die Assoziation von MCMV gp48 mit MHC-Klasse-I-Molekülen und Calnexin.

3.6 β_2 -Mikroglobulin ist für die Bindung von gp48 an MHC-Klasse-I-Moleküle notwendig

Das MCMV Glykoprotein gp34 wird von *m04*, einem weiteren Vertreter der *m02* Genfamilie kodiert. Für gp34, welches wie gp48 an MHC-Klasse-I-Moleküle bindet, ist beschrieben, dass für die Assoziation β_2 -Mikroglobulin (β_2M) notwendig ist (Kleijnen et al., 1997). Um zu überprüfen, ob dies auch für die gp48-MHC-Klasse-I-Komplexbildung zutrifft, wurden Ko-Immünpräzipitationsexperimente nach MCMV Infektion von primären Fibroblasten (MEFs) aus C57BL/6 (Abb. 10A) und aus β_2M -*knockout* Mäusen (Abb. 10B) durchgeführt. Für die Infektion wurden unterschiedliche MCMV-Mutanten eingesetzt, denen die Gene für den Fc-Rezeptor (*m138*) und zusätzlich entweder *m04* ($\Delta MC95.37$) oder *m06* ($\Delta MC96.62$) fehlen.

Die Fällung von K^b -Molekülen aus Fibroblasten ko-präzipitiert gp48, welches nur in $\Delta MS94.4$ - und $\Delta MC95.37$ -infizierten Zellen auftritt, nicht aber in mock- und $\Delta MC96.62$ -infizierten Zellen. Im Gegensatz dazu kann nach Präzipitation der K^b schweren Kette aus β_2M Zellen, unabhängig davon mit welchem Virus infiziert worden ist, kein ko-präzipitierendes gp48 beobachtet werden. Dieses Ergebnis demonstriert, dass die Anwesenheit von β_2M Voraussetzung für die Bindung von gp48 an MHC-Klasse-I-Moleküle ist und bestätigt, dass es sich bei diesem MHC-Klasse-I-assoziierten Protein um gp48, dem Genprodukt von MCMV *m06*, handelt.

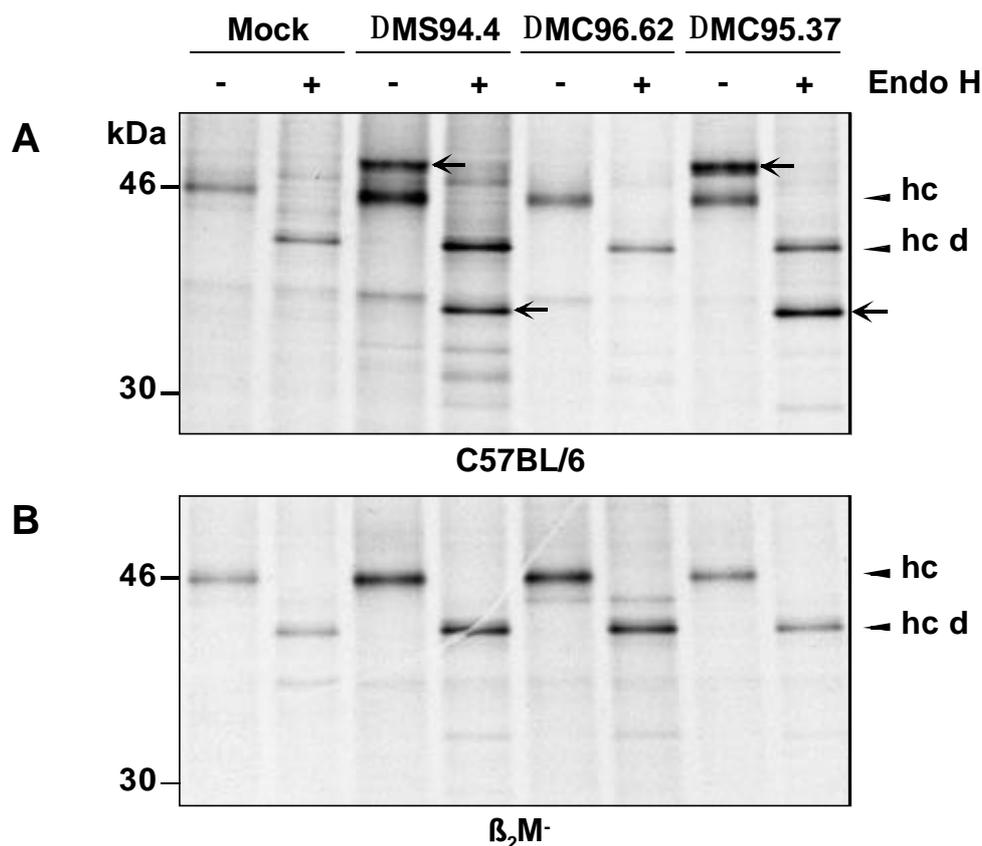


Abb. 10: MCMV gp48 bindet nur an β_2M -assoziierte MHC-Klasse-I-Moleküle

Primäre Fibroblasten aus C57BL/6 und aus β_2M -*knockout* Mäusen (β_2M^-) wurden entweder mock-infiziert, oder mit den MCMV-Mutanten $\Delta MS94.4$ ($\Delta m138$), $\Delta MC96.62$ ($\Delta m138$, $\Delta m06$) und $\Delta MC95.37$ ($\Delta m138$, $\Delta m04$) mit einer m.o.i. von 2 infiziert und 12 h p.i. für 60 min metabolisch markiert. Nach der Lyse der Zellen mit 1% Digitonin Puffer wurden H-2K^b-Moleküle mit einem polyklonalen Kaninchenserum gegen den cytoplasmatischen Anteil von K^b präzipitiert und entweder unbehandelt (-) oder nach Endo H-Verdau (+) in einem 11,5-13,5% Gel aufgetrennt. In $\Delta MS94.4$ - und in $\Delta MC95.37$ -infizierten C57BL/6-Fibroblasten konnte gp48 mit MHC-Klasse-I-Molekülen ko-immunpräzipitiert werden (Pfeile), während in $\Delta MC96.62$ ($\Delta m138$, $\Delta m06$)-infizierten Zellen dieses Protein nicht gefunden werden konnte. Nach Präzipitation von K^b-Molekülen aus β_2M^- -Zellen war ko-präzipitiertes gp48 nie zu beobachten. hc, MHC-Klasse-I schwere Kette; d, deglykosyliert. Zur Kontrolle der Infektion wurde aus den Lysaten das MCMV *early* Protein e1 präzipitiert (nicht gezeigt).

Ko-Immünpräzipitationsexperimente nach MCMV Infektion von wt- und β_2M -negativen Zellen zeigen, dass gp48 nur mit MHC-Klasse-I-Molekülen ko-immünpräzipitiert werden kann, wenn diese mit β_2M komplexiert sind.

3.7 Für die Bindung von gp48 an MHC-Klasse-I-Moleküle ist Peptidbeladung nicht erforderlich

Bei der Bildung des trimolekularen MHC-Klasse-I-Komplexes assoziiert die MHC-Klasse-I schwere Kette mit β_2M bevor die Peptidbeladung am TAP/Tapasin-Komplex stattfindet (Fourie and Yang, 1998). Da für die gp48-MHC-Klasse-I-Bindung die Assoziation der schweren Kette mit β_2M benötigt wird, stellt sich die Frage, ob auch die Beladung des MHC-Klasse-I-Heterodimers mit Peptid eine Rolle spielt. Um dies zu testen, wurden P815-Zellen, die konstitutiv relativ große Mengen an peptidfreien H-2L^d-Moleküle aufweisen (Hartmut Hengel, persönliche Mitteilung), mit B45-*m06* transfiziert und für ein Ko-Immunpräzitationsexperiment eingesetzt.

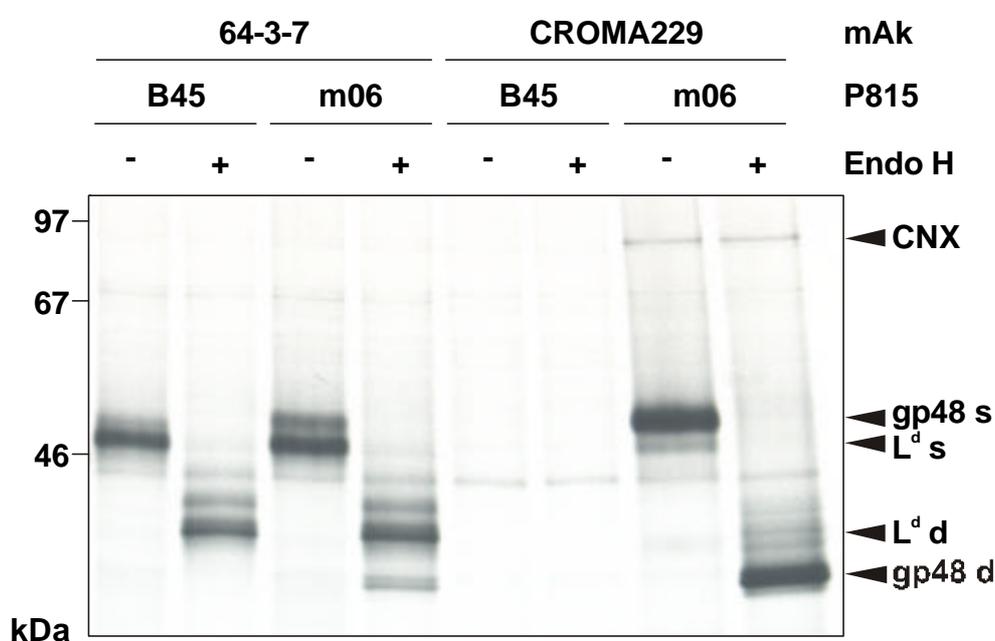


Abb. 11: Peptidbeladung der MHC-Klasse-I-Komplexe ist nicht Voraussetzung für die gp48 Assoziation

P815-Zellen, die stabil mit B45 oder B45-*m06* transfiziert worden sind, wurden für 1 h mit [³⁵S]-Cys/Met markiert und mit 1% Digitonin Puffer lysiert. Die Präzipitation von H-2L^d-Molekülen mit mAk 64-3-7, welcher nur L^d-Molekülen erkennt, die keine Peptidbeladung aufweisen, führt zur Ko-Immunpräzipitation von gp48 Molekülen in *m06*-Transfektanten, nicht aber in B45-Kontrollzellen. Mit mAk CROMA229 wurde in einem Parallelansatz gp48 direkt präzipitiert. Die Präzipitate wurden entweder unbehandelt oder mit Endo H verdaut und anschließend in einem 11,5-13,5% Gradientengel aufgetrennt. CNX, Calnexin; s, Endo H-sensitiv; d, deglykosyliert.

Die Präzipitation von L^d-Molekülen aus Digitoninlysaten mit dem mAk 64-3-7, der selektiv L^d-Moleküle ohne Peptid erkennt (Smith et al., 1993), zeigt, dass gp48 auch mit peptidfreien L^d-Moleküle ko-immunpräzipitiert (Abb. 11). Der Befund impliziert, dass neusynthetisiertes gp48 bereits sehr früh an MHC-Klasse-I-Moleküle bindet, nämlich bevor die schwere Kette/ β_2 M-Heterodimere mit Peptid beladen werden. Ob die gp48/MHC-Klasse-I-Komplexbildung vor der Peptidbeladung stattfinden muss, ist nicht bekannt.

Die Ko-Immunitpräzipitation von gp48 mit einem Antikörper, der nur peptidfreie H-2L^d-Moleküle erkennt, demonstriert, dass gp48 auch an MHC-Klasse-I/ β_2 -Mikroglobulin-Dimere binden kann.

3.8 Die Degradation von MHC-Klasse-I-Molekülen und gp48 kann durch lysosomale Inhibitoren blockiert werden

Die verkürzte Halbwertszeit von Endo H-resistenten MHC-Klasse-I und gp48 Moleküle in *m06*-Transfektanten (siehe 3.4), deutet darauf hin, dass die Degradation dieser Moleküle nach dem Transport durch den Golgi stattfindet. Ein Zellkompartiment mit proteolytischen Eigenschaften, welches im sekretorischen Weg nach dem Golgi lokalisiert ist, ist das endosomale/lysosomale System. Falls MHC-Klasse-I-Moleküle und gp48 in diesem Kompartiment abgebaut werden, sollten Inhibitoren des endosomalen/lysosomalen Transports und der lysosomalen Proteasen die Degradation von MHC-Klasse-I- und gp48-Molekülen verhindern können. Um dies zu testen, wurden in der Gegenwart verschiedener Inhibitoren *pulse-chase* Experimente durchgeführt (Abb. 12 und Abb. 13). Die Behandlung der Zellen mit NH₄Cl, einem lysosomotropen Amin, welches den pH-Wert in den Lysosomen erhöht und den vesikulären Transport in die Lysosomen blockiert (Seglen, 1983), hemmt den Abbau sowohl von MHC-Klasse-I-Molekülen als auch von gp48, und führt zur Akkumulation von Endo H-resistenten Glykoproteinen (Abb. 12A, B). Die angereicherten Proteine können nur durch Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F), welche alle N-verknüpfte Oligosaccharidseitenketten abspalten kann, deglykosyliert werden. In Abb. 12A ist zu erkennen, dass selbst nach der *chase*-Periode in der Gegenwart von Ammoniumchlorid gp48 Moleküle mit MHC-spezifischen Antikörpern ko-immunpräzipitiert werden können.

Des weiteren waren Chloroquin, ebenfalls ein lysosomotropes Amin, Leupeptin, ein Inhibitor von Cystein- und Serinproteasen und lysosomalen Cathepsinen, und das für lysosomale Cysteinproteasen-spezifische Epoxid E64 (*L-trans*-epoxysuccinylleucylagmatin) (Seglen, 1983) ebenfalls in der Lage, die Degradation von MHC-Klasse-I/gp48-Komplexen zu hemmen (Abb.

13). Bafilomycin A₁ und Concanamycin A, erhöhen den pH-Wert von Endosomen und Lysosomen und unterbinden den vesikulären Transport von Endosomen zu Lysosomen, indem sie vakuoläre ATPasen hemmen (Clague et al., 1994). Diese Substanzen zeigten sowohl für MHC-Klasse-I-Moleküle als auch für gp48 den deutlichsten inhibitorischen Effekt (Abb. 13).

Die Behandlung der Zellen mit Lactacystin, einem spezifischen Inhibitor des Proteasoms (Fenteany et al., 1995), konnte den Abbau von MHC-Klasse-I-Molekülen nicht verhindern. Dies zeigt, dass die MHC-Klasse-I-Moleküle in *m06*⁺ Zellen nicht wie durch HCMV *US2* und *US11* vermittelt (Wiertz et al., 1996a; Wiertz et al., 1996b), proteasomal abgebaut werden (Abb. 12A). Lactacystin verhindert lediglich die Degradation von Endo H-sensitiven gp48 Molekülen (Abb. 12B).

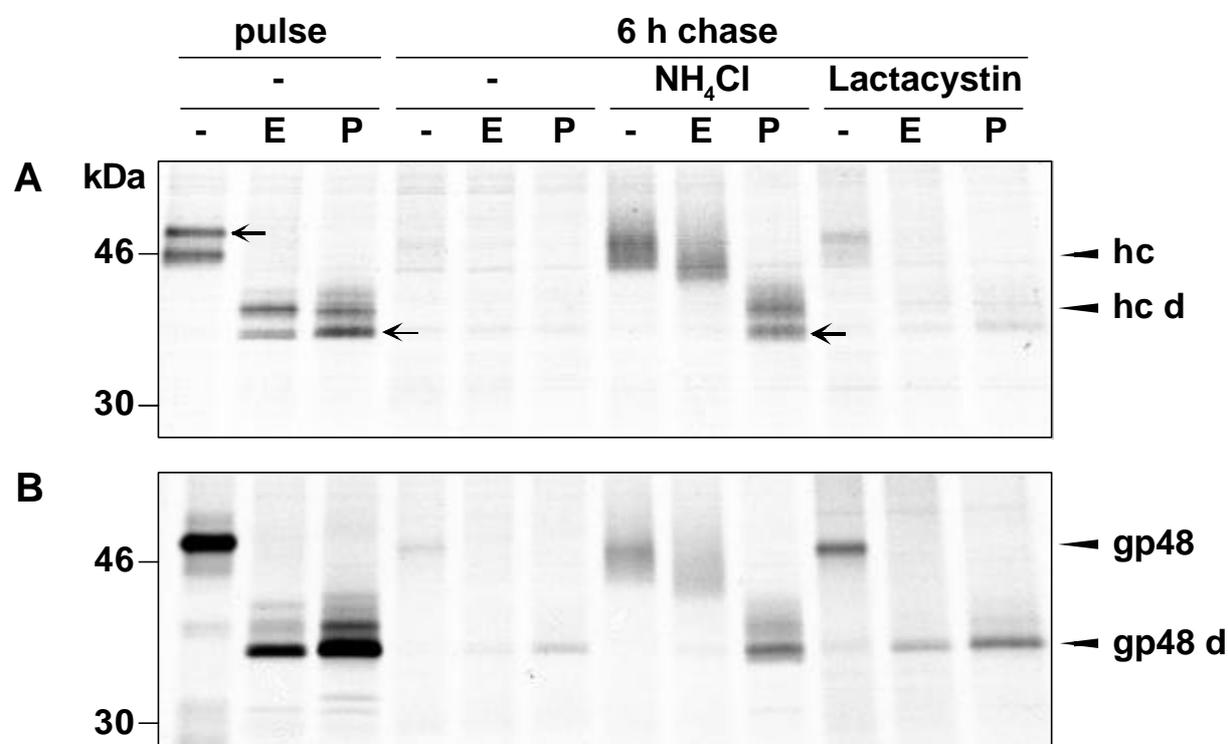


Abb. 12: Der Abbau von MHC-Klasse-I-Molekülen und gp48 kann durch NH₄Cl gehemmt werden

NIH 3T3-*m06*-Transfektanten wurden für 60 min metabolisch markiert und für 6 h in Medium mit nichtmarkiertem Cys/Met weiterkultiviert. NH₄Cl (50 mM) war während der Markierung und der *chase*-Periode anwesend; Lactacystin (20 μM) wurde bereits 60 min vor der Markierung zugegeben. Nach der Lyse der Zellen mit Digitonin Puffer wurden MHC-Klasse-I-Moleküle mit mAk 28-14-8s (A) und gp48 mit CROMA229 (B) präzipitiert, und, falls angezeigt, mit Endo H (E) oder mit PNGase F (P) verdaut bevor sie in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Nach einer *chase*-Periode von 6 h sind in unbehandelten Zellen (-) die metabolisch markierten MHC-Klasse-I-Moleküle und gp48 Moleküle nahezu vollständig abgebaut. In der Gegenwart des lysosomotropen Amins NH₄Cl akkumulieren Endo H-resistente Klasse I und gp48 Moleküle, die zum Teil in einem Komplex vorliegen, während die Behandlung mit dem Proteasomen-spezifischen Inhibitor Lactacystin lediglich Endo H-sensitive gp48 Moleküle vor dem Abbau schützen kann. hc, MHC-Klasse-I schwere Kette; d, deglykosyliert; Pfeile weisen auf koinmunpräzipitiertes gp48 hin.

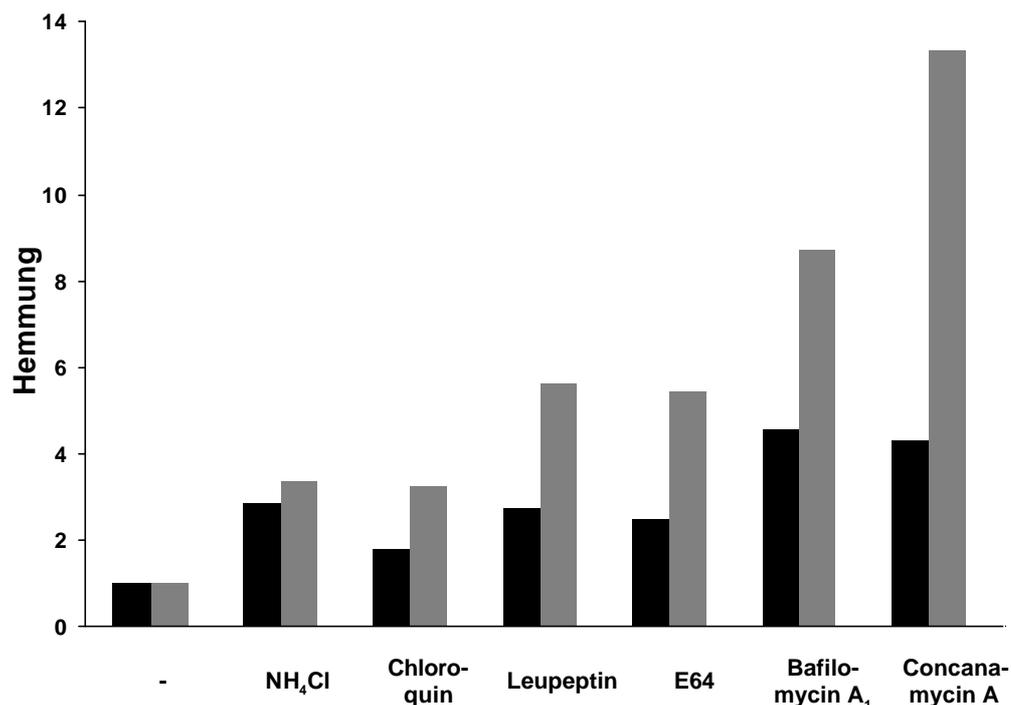


Abb. 13: Lysosomale Inhibitoren hemmen den Abbau von MHC-Klasse-I-Molekülen und gp48 in *m06*-Transfektanten

NIH 3T3-*m06*-Transfektanten wurden während 60 min *pulse* und 6 h *chase* mit Leupeptin (200 μ M), NH₄Cl (50 mM) oder Chloroquin (100 μ M) bzw. 60 min vor und während des *pulse-chase* Experiments mit E64 (*L-trans*-epoxysuccinylleucylagmatin, 100 μ M), Bafilomycin A₁ (2 μ M) oder Concanamycin A (50 nM) behandelt und in NP-40 Puffer lysiert. Nach der Präzipitation der L^q-Moleküle mit 28-14-8s und gp48 mit CROMA229 wurden die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt, und die Banden mit einem Phosphoimager quantifiziert. Die Menge an L^q und gp48 Molekülen aus unbehandelten *m06*⁺ Zellen (-) wurde gleich 1 gesetzt. Das Verhältnis von L^q-Molekülen (schwarze Balken) und gp48 (graue Balken) aus behandelten Zellen zu denen aus unbehandelten Zellen ist als x-fache Hemmung dargestellt. Die quantitative Analyse zeigt, dass verschiedene Inhibitoren, die auf unterschiedliche Weise die lysosomale Degradation hemmen, den Abbau von MHC-Klasse-I- und gp48-Moleküle beeinträchtigen.

***Pulse-chase* Experimente zeigen, dass der Abbau von MHC-Klasse-I-Molekülen und gp48 sensitiv gegenüber endosomalen/lysosomalen Inhibitoren ist, und dass die Hemmung des lysosomalen Abbaus zur Akkumulation von Endo H-resistenten gp48/MHC-Klasse-I-Komplexen führt. Ein spezifischer Inhibitor der Proteasomen kann nur den Anteil der gp48-Moleküle, der nicht an MHC-Klasse-I-Molekülen gebunden ist, in einer Endo H-sensitiven Form stabilisieren.**

3.9 Gp48 Moleküle, die nicht mit MHC-Klasse-I-Komplexen assoziiert sind, werden durch das Proteasom abgebaut

Mit MHC-Klasse-I-komplexierte gp48 Moleküle verlassen das ER und werden in einem *post* Golgi-Kompartiment, welches sensitiv gegenüber endosomalen/lysosomalen Inhibitoren ist, abgebaut. Der Befund, dass proteasomale Inhibitoren die Degradation einer Subfraktion von gp48 nicht aber die von MHC-Klasse-I-Molekülen hemmen kann (Abb. 12A, B), deutet an, dass nicht mit MHC komplexierte gp48 Moleküle im ER zurückgehalten werden. Diese Subfraktion von gp48 erhält keine Modifikation der Oligosaccharidseitenketten durch Enzyme im Golgi und akkumuliert nach Hemmung der Proteasomen in einer Endo H-sensitiven Form. Falls diese Hypothese richtig ist, müßte in MHC-Klasse-I-negativen Zellen die gesamte Population an gp48 Molekülen im ER zurückgehalten und durch Proteasomen abgebaut werden. Um dies zu testen, wurde die humane Colonicarcinomzelllinie DLD-1, die kein β_2 M-Protein exprimiert und dadurch keinen Partner für gp48 zur Verfügung stellt, mit dem Vektor B45 und parallel mit *m06* stabil transfiziert und in einem *pulse-chase*-Experiment eingesetzt.

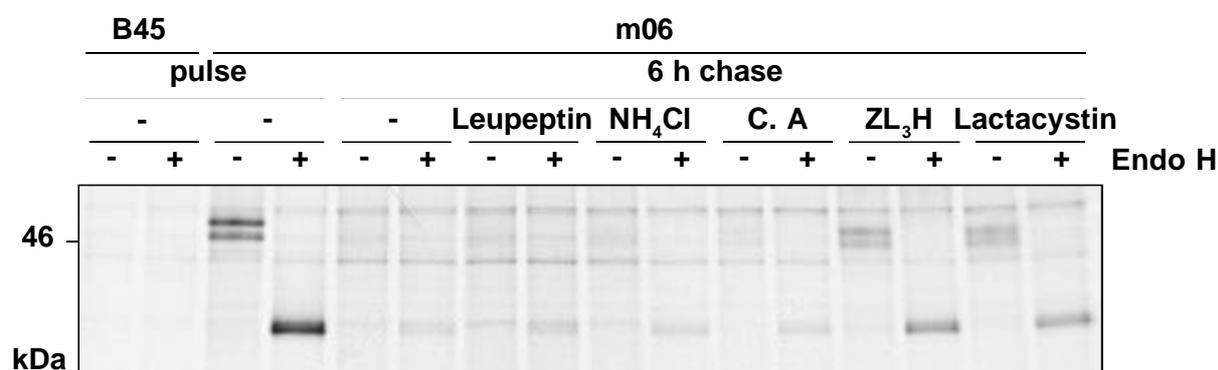


Abb. 14: In der Abwesenheit von MHC-Klasse-I-Komplexen wird gp48 durch das Proteasom abgebaut

DLD-1-Zellen, die kein β_2 -Mikroglobulin exprimieren und daher keinen Zusammenbau von trimolekularen MHC-Klasse-I-Komplexen erlauben, wurden mit dem Vektor B45 allein oder mit *m06* stabil transfiziert. Nach einer metabolischen Markierung mit [³⁵S]-Cystein/Methionin für 30 min (*pulse*) wurden die Zellen entweder sofort mit 1% NP-40 Puffer lysiert, oder für 6 h in Medium mit Cystein und Methionin weiterkultiviert (*chase*). Parallelkulturen wurden entweder mit Leupeptin (200 μ M), NH₄Cl (50 mM), Concanamycin A (C. A, 50 nM), ZL₃H (MG-132, 20 μ M) oder Lactacystin (20 μ M) behandelt. Aus den Lysaten wurden gp48 Moleküle mit mAk CROMA231 präzipitiert, mit Endoglykosidase H (Endo H) verdaut (+) oder nicht behandelt (-) und in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Inhibitoren, die den lysosomalen Abbau hemmen (Leupeptin, NH₄Cl, Concanamycin A) konnten die Degradation von gp48 nicht hemmen. Eine Hemmung des Proteasoms mit ZL₃H oder Lactacystin führte zur Akkumulation von Endo H-sensitivem gp48.

Die Immunpräzipitation mit CROMA229 (Abb. 14) zeigt deutlich, dass nach einer *chase*-Periode von 6 h die gp48 Moleküle abgebaut wurden, und eine Behandlung der Zellen mit den endosomalen bzw. lysosomalen Inhibitoren Leupeptin, Ammoniumchlorid und Concanamycin A den Abbau von gp48 nicht hemmt. Proteasomen-spezifische Inhibitoren, wie ZL₃H (MG-132) und Lactacystin, können jedoch einen Großteil der gp48 Moleküle vor dem Abbau schützen. Diese geschützten Proteine verhalten sich, wie es für ER-residente Glykoproteine zu erwarten ist, sensitiv gegenüber einer Endo H-Behandlung. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass gp48, welches nicht an MHC-Klasse-I-Komplexen gebunden ist, nicht zum Golgi transportiert wird und deshalb keine weitere Modifikation seiner Kohlenhydratseitenketten erhält, sondern zurückgehalten wird und schließlich im Cytosol durch das Proteasom abgebaut wird. Da dieser Abbauprozess ganz offensichtlich nicht im Zusammenhang mit der MHC-Klasse-I-spezifischen Funktion von gp48 steht, wurde das Schicksal dieser Moleküle nicht weiter verfolgt.

In b₂-Mikroglobulin-negativen Zellen, in denen gp48 nicht an MHC-Klasse-I-Komplexe binden kann, wird gp48 nicht in das Lysosom transportiert, sondern durch das Proteasom abgebaut.

3.10 Inhibition des lysosomalen Abbaus führt zur Akkumulation von MHC-Klasse-I-Molekülen und gp48 in einem Lamp-1-positiven Kompartiment

Die Ergebnisse der *pulse-chase* Experimente in der Gegenwart von verschiedenen Inhibitoren lassen auf einen Abbau der MHC/gp48-Komplexe in Endosomen oder Lysosomen schließen (siehe 3.8). Um die biochemischen Ergebnisse durch eine unabhängige Methode zu bestätigen, und um das zelluläre Kompartiment der Degradation präziser zu definieren, wurden mit *m06*⁺ Zellen nach Behandlung mit Leupeptin Immunfluoreszenzanalysen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie durchgeführt. Die mit CROMA231 gefärbten Zellen zeigen eine charakteristische vesikuläre Verteilung von gp48, die auch nach MCMV Infektion zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt). Die gp48 Verteilung ist eindeutig anders als die des ER Chaperons Calretikulin (Abb. 15A) oder die des *medialen*-Golgi Markers Mannosidase II (Daten nicht gezeigt), welche nur in wenigen einzelnen Vesikeln ko-lokalisiert. gp48 ko-lokalisiert auch nicht mit dem im TGN und in den Endosomen residenten Kationen-unabhängigen Mannose 6-Phosphat Rezeptor (CI-MPR) (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte jedoch eine starke Überlagerung der gp48 Verteilung mit der des lysosomalen Membranproteins Lamp-1 gefunden werden (Abb. 15B). Eine Doppelfärbung von gp48 mit MHC-Klasse-I-Molekülen (Abb. 15C) bestätigt, dass beide Moleküle als Komplex in

ein Lamp-1-positives Kompartiment transportiert werden. Bei diesem Kompartiment handelt es sich um Lysosomen.

Nach Hemmung des lysosomalen Abbaus können gp48 und MHC-Klasse-I-Moleküle in den Lysosomen nachgewiesen werden.

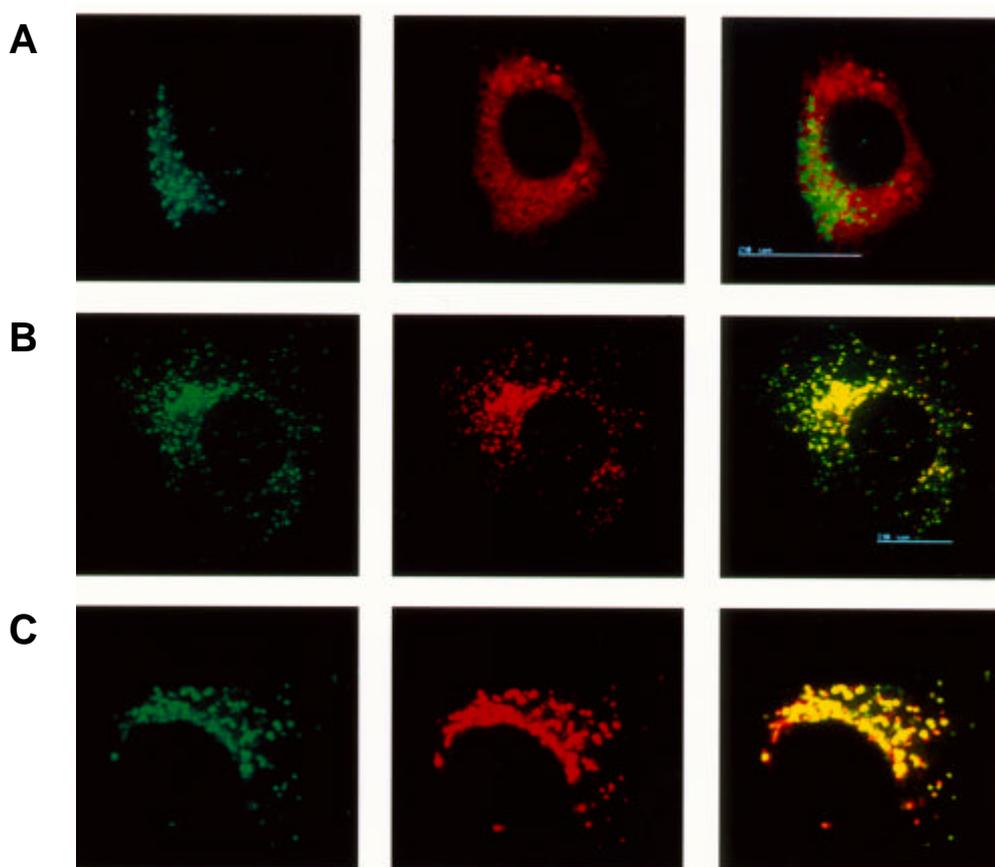


Abb. 15: MHC-Klasse-I-Moleküle und MCMV gp48 ko-lokalisieren in Lysosomen

NIH 3T3-Transfektanten, die MCMV *m06* exprimieren, wurden für 2 h mit 200 μ M Leupeptin behandelt bevor sie für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung fixiert und permeabilisiert wurden. Die Doppelfärbung der Zellen erfolgte mit folgenden Antikörpern: mAk CROMA231 gegen MCMV gp48 (**A-C**, jeweils linkes Bild) zusammen mit Kaninchenserum anti-Calretikulin (**A**, mittleres Bild), Ratte anti-Lamp-1 (**B**, mittleres Bild) und mAk R1-21.2 gegen murine MHC-Klasse-I-Moleküle (**C**, mittleres Bild). Die Primärantikörper wurden mit FITC-konjugierten Ziege anti-Maus IgG und Rhodamin-konjugierten Ziege anti-Kaninchen IgG bzw. Ratten IgG nachgewiesen. Die Überlagerung der entsprechenden Einzelfärbungen (**A-C**, jeweils rechtes Bild) demonstriert nach Hemmung des lysosomalen Abbaus die Kolokalisation von gp48 mit dem lysosomalen Marker Lamp-1 und MHC-Klasse-I-Molekülen. (Die Immunfluoreszenzfärbungen und die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde mit Unterstützung von Walter Muranyi durchgeführt)

3.11 Das membrannahes di-Leucin-Motiv im cytoplasmatischen Anteil von gp48 ist für die Proteolyse von MHC-Klasse-I-Molekülen essenziell

Der gerichtete Transport der MHC-Klasse-I/gp48-Komplexe in das endosomale/lysosomale Kompartiment muss durch das virale Protein vermittelt werden, da dieses Kompartiment normalerweise kein Zielorganell für MHC-Klasse-I-Moleküle darstellt. Transportmotive, die für einen gerichteten Transport von Proteinen in ein bestimmtes Kompartiment der Zelle verantwortlich sind, sind sehr häufig im cytoplasmatischen Anteil der zu transportierenden Proteine lokalisiert (Keller and Simons, 1997; Rothman and Wieland, 1996; Sandoval and Bakke, 1994b). So konnte beispielsweise im cytoplasmatischen Anteil des Adenovirusproteins E3/19K ein di-Lysin-Motiv (Jackson et al., 1990), und in der MHC-Klasse-II invarianten Kette Iip33 ein di-Arginin-Motiv (Schutze et al., 1994) definiert werden, welche den Rücktransport der Proteine vom Golgi in das ER vermitteln. Für einen gerichteten Transport in die Lysosomen ist im cytoplasmatischen Anteil von LimpII ein di-Leucin-Motiv (Sandoval et al., 1994a) und bei Lamp-1 ein YXX ϕ Signal (wobei X für eine beliebige und ϕ für eine hydrophobe Aminosäure steht) essenziell (Höning et al., 1996).

Um zu überprüfen, ob der cytoplasmatische Anteil von gp48 mit den beiden di-Leucin-Motiven für den Transport von MHC/gp48-Komplexen benötigt wird, wurden zunächst drei carboxyterminale gp48-Deletionsmutanten, $\Delta 332$, ΔCT und ΔTM , konstruiert (Abb. 16) und wie *m06* stabil in NIH 3T3-Zellen exprimiert.

	TM	CT
m06	— <u>LLLVISVIASLLWLVAVGAMLFYTY</u>	GREPLAR LL KRYGKQLAAVRIPADGKDQSLTSP LL TK
D332	— <u>LLLVISVIASLLWLVAVGAMLFYTY</u>	GREPLAR LL KRYGKQLAAVRIPADGKDQSLTSP
DCT	— <u>LLLVISVIASLLWLVAVGAMLFYTY</u>	
DTM	—	
LL307/308AA	— <u>LLLVISVIASLLWLVAVGAMLFYTY</u>	GREPLAR AA KRYGKQLAAVRIPADGKDQSLTSP LL TK
LL333/334AA	— <u>LLLVISVIASLLWLVAVGAMLFYTY</u>	GREPLAR LL KRYGKQLAAVRIPADGKDQSLTSP AA TK
LL307/308AA LL333/308AA	— <u>LLLVISVIASLLWLVAVGAMLFYTY</u>	GREPLAR AA KRYGKQLAAVRIPADGKDQSLTSP AA TK

Abb. 16: Schematische Darstellung der *m06*-Mutanten

Aminosäuresequenz der Transmembranregion (TM) und des cytoplasmatischen Anteils (CT) von gp48 und gp48-Mutanten. Die di-Leucin-Motive im CT von gp48 bzw. die durch Alanin-substituierten Aminosäurepositionen sind fettgedruckt.

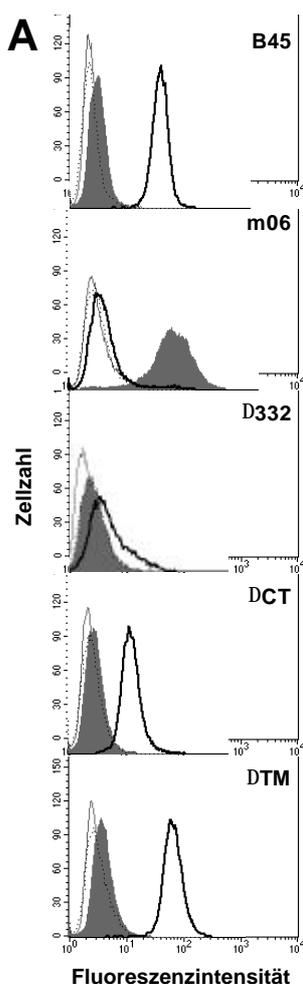
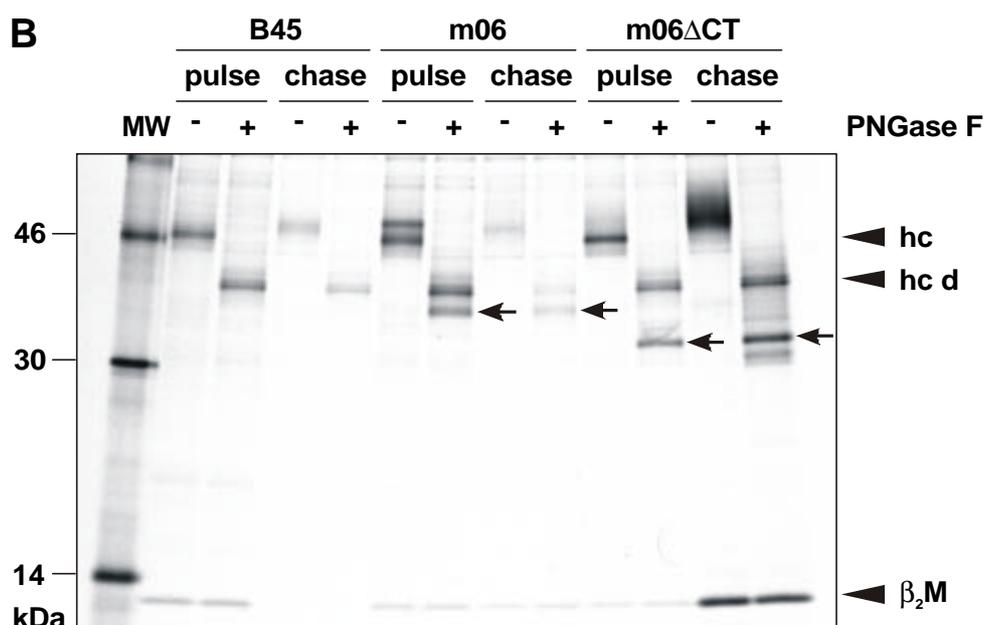


Abb. 17: Der cytoplasmatischen Anteil von gp48 ist für die MHC-Klasse-I-modulierende Funktion von gp48 wesentlich

(A) NIH 3T3-Kontrollzellen (B45) und Transfektanten, die stabil *m06* oder die *m06*-Mutanten $\Delta 332$, ΔCT und ΔTM exprimieren wurden cytofluorometrisch auf ihre intrazelluläre gp48-Expression und auf die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran untersucht. Die permeabilisierten Zellen wurden mit CROMA231 (ausgefüllte graue Histogramme) bzw. mit FITC-konjugiertem Zweitantikörper allein (dünne graue Linie) gefärbt. Der Nachweis der L^q-Moleküle an der Zellmembran mit 28-14-8s (dicke Linie) zeigt, dass die Expression der *m06*-Mutante $\Delta 332$ zum Verlust von MHC-Molekülen an der Zellmembran führt, während ΔCT und ΔTM die Oberflächenexpression von H-2L^q-Molekülen erlauben. Nur mit FITC-konjugiertem Zweitantikörper markierte Zellen dienten als Negativkontrolle (gepunktete Linie). (B) B45-, *m06*-, und ΔCT -Transfektanten wurden 30 min mit [³⁵S]-Cys/Met metabolisch markiert und entweder sofort mit 1% Digitonin Puffer lysiert (*pulse*) oder für 4 h in normalem Medium weiterkultiviert (*chase*). H-2 L^q Moleküle wurden mit mAk 28-14-8s präzipitiert, entweder nicht behandelt oder mit PNGase F verdaut und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Wie in *m06*-Transfektanten kann auch in *m06* ΔCT -exprimierenden Zellen gp48 ΔCT mit MHC-Klasse-I-Molekülen ko-immunpräzipitiert werden. Im Gegensatz zu gp48/MHC-Komplexen werden die gp48 ΔCT /MHC-Komplexe während der chase Periode nicht abgebaut sondern Endo H-resistent. MW, [¹⁴C]-Molekulargewichtsmarker; hc, MHC-Klasse-I schwere Kette; d, deglykosyliert; β_2M , β_2 -Mikroglobulin. Pfeile weisen auf ko-immunpräzipitiertes gp48 bzw. gp48 ΔCT hin.



Die cytofluorometrische Analyse dieser Transfektanten nach intrazellulärer Anfärbung mit CROMA231 zeigt, dass CROMA231 keinerlei Reaktivität mit den gp48-Mutanten aufweist (Abb. 17A, gefüllte, graue Histogramme). Die Expression von $\Delta 332$ wurde mittels Western Blot mit dem Kaninchenserum m06-2 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt), und für den Proteinnachweis von ΔTM siehe Kapitel 3.13.

Die Oberflächenanalyse von MHC-Klasse-I-Molekülen demonstriert jedoch (Abb. 17A, dicke Linien), dass $\Delta 332$, bei dem die carboxyterminalen 4 Aminosäuren mit dem terminalen di-Leucin-Motiv fehlen, immer noch in der Lage ist, den Transport von Klasse-I-Molekülen an die Zellmembran effektiv zu verhindern. Bei der ΔCT -Mutante ist die MHC Oberflächenexpression partiell, bei ΔTM vollständig wiederhergestellt.

Immunpräzipitationen mit MHC-Klasse-I-spezifischen Antikörpern nach metabolischer Markierung von *m06*- und ΔCT -Transfektanten haben ergeben, dass L^q -Moleküle in ΔCT^+ Zellen im Gegensatz zu denen in *m06*⁺ Zellen, nicht abgebaut werden und Endo H-resistente Oligosaccharidseitenketten erhalten (Daten nicht gezeigt). Eine Wiederholung der *pulse-chase*-Markierung und Präzipitation mit mAk 28-14-8s mit anschließender Deglykosylierung durch PNGase F (Abb. 17B) demonstrierte, dass gp48 ΔCT Moleküle, wie gp48, bereits nach *pulse*-Markierung mit MHC-Klasse-I-Molekülen assoziieren und einen über mehrere Stunden stabilen Komplex bilden. Da gp48 ΔCT - und L^q -Moleküle in ihrer glykosylierten Form in der SDS-PAGE ein ähnliches Laufverhalten aufweisen, können die zwei Proteine erst nach Deglykosylierung mit PNGase F unterschieden werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der cytoplasmatische Anteil von gp48 für den Transport des MHC/gp48-Komplexes in die Lysosomen essenziell ist; das terminale di-Leucin Motiv scheint hierfür aber nicht erforderlich zu sein. Außerdem kann festgestellt werden, dass gp48 über seine luminalen und/oder transmembranale Domäne an MHC-Klasse-I-Moleküle bindet.

Um zu testen, ob eines der di-Leucin Motive im cytoplasmatischen Anteil von gp48 für den Transport von gp48/MHC-Komplexen notwendig ist, wurden *m06*-Mutanten hergestellt, bei denen entweder die proximalen Leucine (LL307/308AA), die terminalen Leucine (LL333/334AA), oder beide Motive (LL307/308AA/LL333/334AA) gegen Alanine ausgetauscht worden sind (Abb. 16). Die FACS-Analyse nach intrazellulärer Färbung der stabil transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten mit CROMA231 offenbart eine vergleichbare Expression von gp48 und gp48-Mutanten (Abb. 18, gefüllte, graue Histogramme). Da die gp48-Mutanten mit mutiertem di-Leucin-Motiv an Position 333/334 von CROMA231 erkannt werden, $\Delta 332$ aber nicht, deutet daraufhin, dass die C-terminalen 4 Aminosäuren für die Antikörperbindung essenziell sind, die Aminosäuren an Position 333 und 334 aber austauschbar sind. Bei der Untersuchung der Transfektanten auf ihre Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran (Abb. 18,

dicke Linien) konnte festgestellt werden, dass das terminale di-Leucin-Motiv für den gp48-vermittelten Verlust von Klasse I-Molekülen nicht essenziell ist. Im Gegensatz dazu führt die Mutation des proximalen Motivs (LL307/308AA) zu einem Verlust der gp48 Funktion, und erlaubt sowohl in den *m06*LL307/308AA- als auch in den *m06*LL307/308AA/LL333/334AA-Transfektanten eine H-2L^d-Oberflächenexpression.

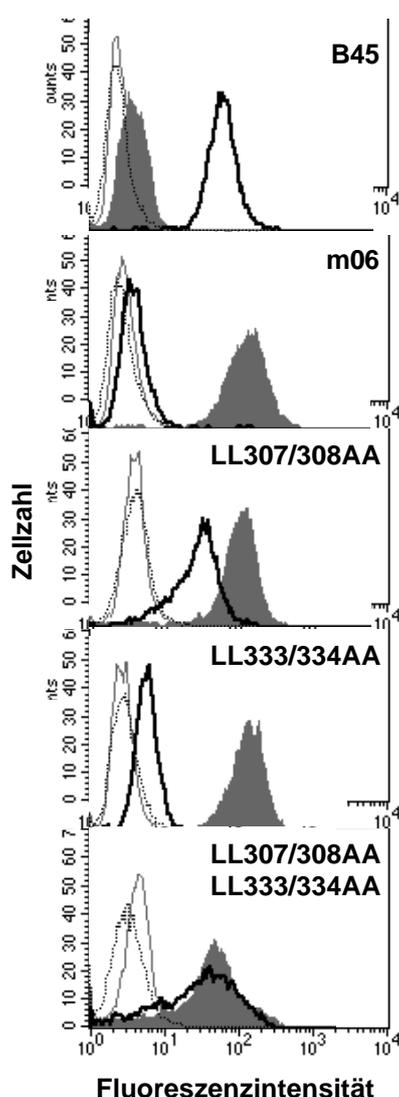


Abb. 18: Das membranproximale di-Leucin-Motiv im cytoplasmatischen Anteil von gp48 ist für die MHC-Klasse-I-Modulation essenziell

NIH 3T3-Transfektanten, die stabil *m06* oder die *m06*-Mutanten exprimieren, bei denen entweder das proximale di-Leucin-Motiv (LL307/308AA), das terminale di-Leucin-Motiv (LL333/334AA), oder beide Motive (LL307/308AA/LL333/334AA) gegen Alanine ausgetauscht worden sind, wurden cytofluorometrisch analysiert. Die Anfärbung von gp48 mit CROMA231 nach Permeabilisierung der Zellen mit Saponin demonstriert eine vergleichbare Expression von gp48 bzw. gp48-Mutanten (ausgefüllte, graue Histogramme). Als Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit dem FITC-konjugierten Zweitantikörper markiert (dünne, graue Linie). Zur Analyse der MHC-Klasse-I-Moleküle an der Plasmamembran wurden nichtpermeabilisierte Zellen mit 28-14-8s (dicke Linie) angefärbt, und als Kontrolle mit dem Zweitreagenz allein (gepunktete Linie). Die MHC-Klasse-I-Analyse zeigt, dass die Expression der *m06*-Mutante LL333/334AA zu einem Verlust von MHC an der Zellmembran führt, während ein gp48, bei dem das membranproximale (LL307/308AA) oder beide di-Leucin-Motive mutiert worden sind (LL307/308AA/LL333/334AA), seine MHC-Klasse-I-modulatorische Funktion verloren hat.

Die Mutationsanalyse von gp48 zeigt, dass der cytoplasmatische Anteil von gp48 für die reduzierte Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen verantwortlich ist, und dass hierbei das membranproximale di-Leucin-Motiv (LL307/308) eine essenzielle Rolle spielt.

3.12 Die Transportfunktion, die durch den cytoplasmatischen Anteil von gp48 vermittelt wird, kann auf ein heterologes Protein übertragen werden

Die Mutationsanalyse des cytoplasmatischen Anteils von gp48 (gp48CT) hat ergeben, dass durch die Substitution des membranproximalen di-Leucin-Motivs gp48 die Fähigkeit verliert, MHC-Klasse-I-Moleküle in die Lysosomen zu leiten. Um zu überprüfen, ob der cytoplasmatische Anteil von gp48 ausreichend ist, um eine effiziente Expression eines chimären Fusionsproteins an der Zellmembran zu verhindern und die Halbwertszeit des entsprechenden Proteins zu verkürzen, wurde der cytoplasmatische Anteil eines heterologen Proteins durch den von gp48 ersetzt. Zunächst wurde der cytoplasmatische Anteil von CD4, welches normalerweise effizient an die Zellmembran transportiert wird, gegen gp48CT ausgetauscht (Abb. 19A, CD4m06CT). Eine FACS-Oberflächenanalyse von NIH 3T3-Zellen, die stabil mit CD4 bzw. CD4m06CT transfiziert worden sind, mit Antikörpern gegen die Ektodomäne von CD4 ergab eine reduzierte Expression des CD4m06CT-Fusionsprotein im Vergleich zu CD4 (Abb. 19B, dicke Linien). In einem *pulse-chase* Experiment konnte jedoch für das CD4m06-Fusionsprotein keine verkürzte Halbwertszeit beobachtet werden (Abb. 19C).

Die FACS-Analyse zeigt, dass der cytoplasmatische Anteil von gp48 die Fähigkeit besitzt, die Oberflächenexpression des CD4m06CT-Fusionsproteins zu reduzieren. Es wurde nicht untersucht, ob durch die Fusion des gp48CT an CD4 der Transport an die Zellmembran beeinträchtigt, oder die Endozytose des Fusionsproteins gesteigert wird. Sicher ist jedoch, dass der gp48CT keinen gerichteten Transport des CD4-Fusionsproteins in die Lysosomen vermitteln kann, da die Halbwertszeit im Vergleich zu CD4 unverändert ist.

Da die cytosolische Domäne von gp48 eventuell nur nach Komplexbildung des Proteins mit MHC-Klasse-I-Molekülen einen Transport in die Lysosomen vermitteln kann, wurde als weiterer Fusionspartner das MCMV *m04* Genprodukt gp34 ausgesucht. gp34 bindet im ER an komplett assemblierte MHC-Klasse-I-Moleküle, wird im Komplex an die Zellmembran transportiert und ist für mehrere Stunden stabil (Kleijnen et al., 1997). Für das *m04m06*-Fusionsprotein wurde der relativ kurze cytoplasmatische Anteil von gp34 durch den von gp48 ersetzt (Abb. 20A).

Nach Etablierung von stabil exprimierenden NIH 3T3-Fibroblasten, wurde ein *pulse-chase*-Experiment durchgeführt und mit einem Antiserum gegen ein Peptid aus der Ektodomäne von gp34 präzipitiert (Abb. 20B). Die Kinetik zeigt, dass die Halbwertszeit des Fusionsproteins aus gp34 und dem cytoplasmatischen Anteil von gp48 im Vergleich zu gp34 deutlich reduziert ist.

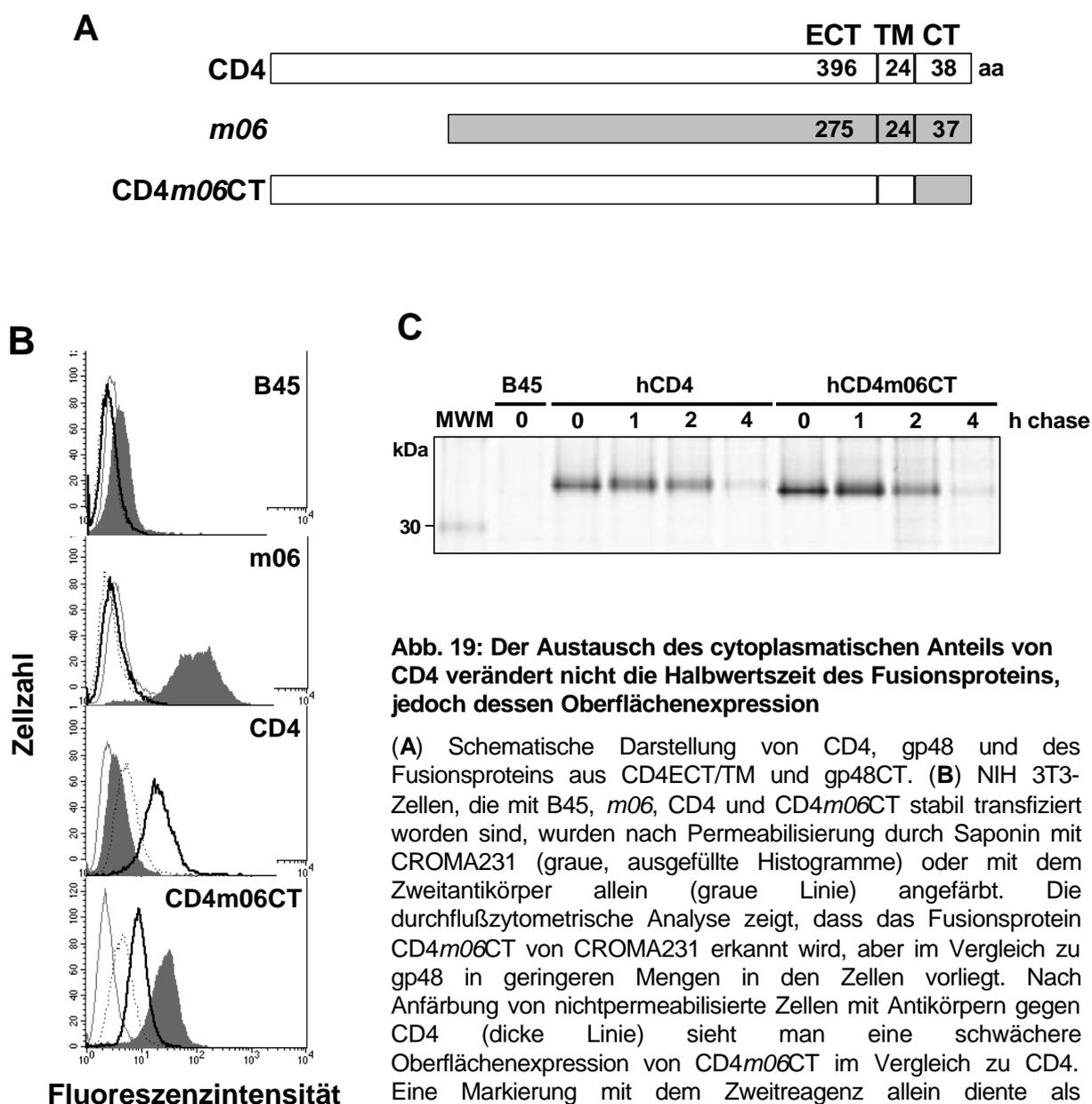


Abb. 19: Der Austausch des cytoplasmatischen Anteils von CD4 verändert nicht die Halbwertszeit des Fusionsproteins, jedoch dessen Oberflächenexpression

(A) Schematische Darstellung von CD4, gp48 und des Fusionsproteins aus CD4ECT/TM und gp48CT. (B) NIH 3T3-Zellen, die mit B45, *m06*, CD4 und CD4*m06*CT stabil transfiziert worden sind, wurden nach Permeabilisierung durch Saponin mit CROMA231 (graue, ausgefüllte Histogramme) oder mit dem Zweitantikörper allein (graue Linie) angefärbt. Die durchflußzytometrische Analyse zeigt, dass das Fusionsprotein CD4*m06*CT von CROMA231 erkannt wird, aber im Vergleich zu gp48 in geringeren Mengen in den Zellen vorliegt. Nach Anfärbung von nichtpermeabilisierte Zellen mit Antikörpern gegen CD4 (dicke Linie) sieht man eine schwächere Oberflächenexpression von CD4*m06*CT im Vergleich zu CD4. Eine Markierung mit dem Zweitreagenz allein diente als Negativkontrolle (gepunktete Linie). (C) Zur Bestimmung der Halbwertszeit wurden Kontrollzellen (B45), CD4- und CD4*m06*CT-Transfektanten für 30 min mit [³⁵S]-Cys/Met markiert und für die angezeigten Zeiträume in Medium ohne [³⁵S] weiterkultiviert (*chase*). Nach der Lyse der Zellen mit 1% NP-40 Puffer wurde mit anti-CD4 präzipitiert, und das Präzipitat in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die *pulse-chase* Kinetik verdeutlicht, dass sich CD4 und das Fusionsprotein CD4*m06*CT nicht wesentlich in ihrer Halbwertszeit unterscheiden. MWM, [¹⁴C] Molekulargewichtsstandard; ECT, Ektodomäne; TM, Transmembrandomäne; CT, cytoplasmatischer Anteil; aa, Aminosäuren.

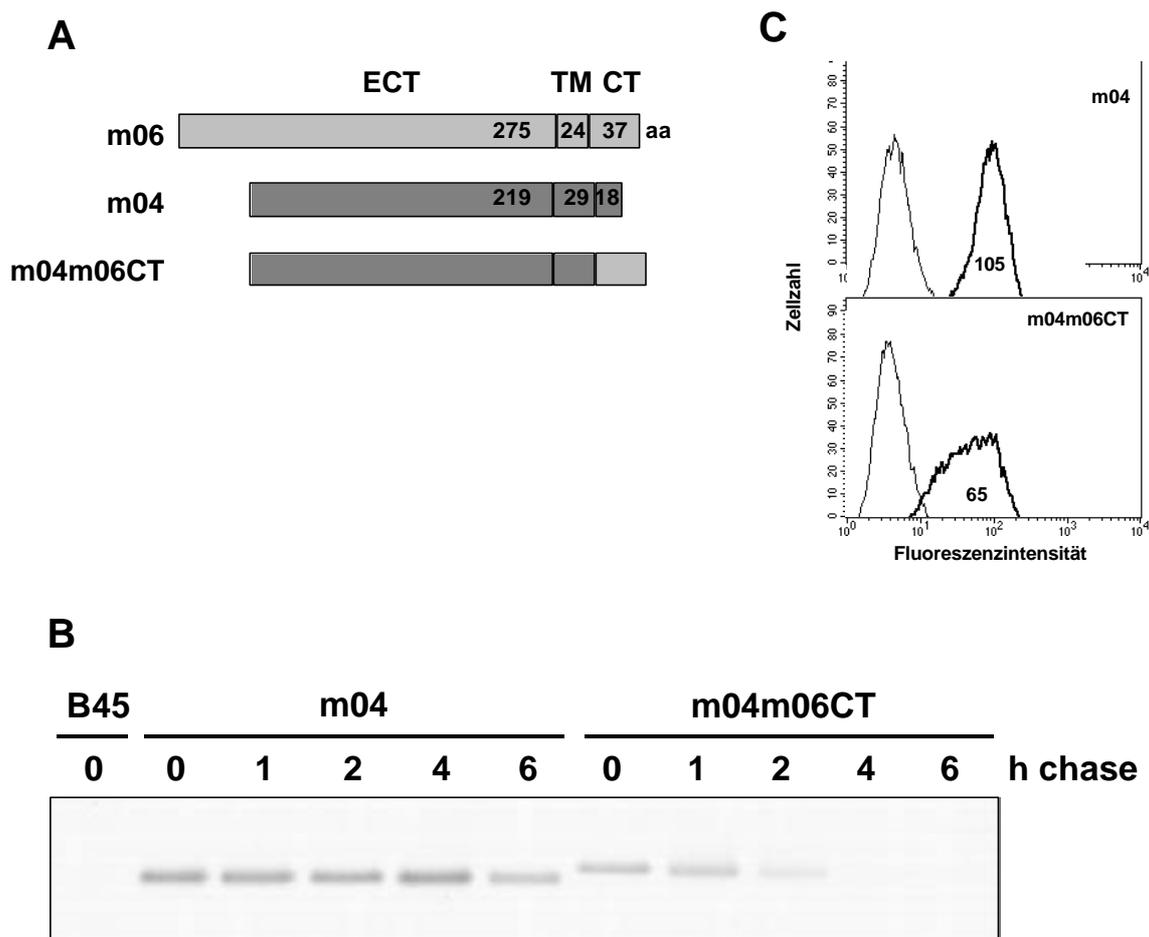


Abb. 20: Die Transportfunktion des cytoplasmatischen Anteils von gp48 kann auf MCMV gp34 übertragen werden

(A) Schematische Darstellung von MCMV gp48, gp34 und des Fusionsproteins aus gp34ECT/TM und gp48CT. (B) NIH 3T3-Zellen, die stabil mit dem Vektor B45 allein oder mit *m04* bzw. *m04m06CT* transfiziert worden sind, wurden für 30 min mit [³⁵S]-Cys/Met markiert und für die angegebenen Zeiträume in normalem Medium weiterkultiviert. Nach der Lyse mit 1% NP-40 Puffer wurde gp34 und das gp34-Fusionsprotein mit dem m04-3 Kaninchenserum präzipitiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Das *pulse-chase* Experiment zeigt eine deutliche Verkürzung der Halbwertszeit des *m04m06CT*-Fusionsproteins im Vergleich zu dem *m04* Genprodukt gp34. Abb.(C) zeigt eine FACS-Analyse der Oberflächenexpression von H-2L^Q-Molekülen nach Anfärbung der *m04* und *m04m06CT* NIH 3T3-Transfektanten mit mAk 28-14-8s (dicke Linie) oder dem FITC-konjugierten Zweitantikörper allein (dünne Linie). Die Zahlenwerte repräsentieren die mittlere Fluoreszenzintensität nach Anfärbung der L^Q-Moleküle und demonstrieren einen inhibitorischen Effekt der *m04m06CT*-Expression auf MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zellmembran. ECT, Ektodomäne; TM, Transmembrandomäne; CT, cytoplasmatischer Anteil; aa, Aminosäuren.

Zusätzlich konnte nach cytofluorometrischer Analyse der MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zellmembran demonstriert werden, dass das *m04m06*-Fusionsprotein den Transport von MHC-Klasse-I-Molekülen an die Zellmembran beeinträchtigt, da H-2L^q-Moleküle an der Zellmembran von *m04m06CT*-Transfektanten deutlich reduziert sind (Abb. 20C). Aufgrund der reduzierten Halbwertszeit des *m04m06CT* Genprodukts und der Modulation oberflächenständiger Klasse I-Moleküle durch die Expression von *m04m06CT* kann geschlossen werden, dass die Übertragung der cytoplasmatischen Domäne von gp48 auf ein Fremdprotein ausreichen kann, um eine beschleunigte Proteolyse zu induzieren. Ob die Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle Voraussetzung für diesen Transport ist, ist noch unbekannt. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass die MHC-Klasse-I-bindende Domäne von gp34 nach der Fusion mit dem cytoplasmatischen Anteil von gp48 erhalten ist, da andernfalls der Effekt auf H-2L^q-Moleküle nicht zu erklären wäre.

Der Austausch des cytoplasmatische Anteils von CD4 durch den von gp48 führt zu einer verringerten Oberflächenexpression des Fusionsproteins, jedoch nicht zu einer Verkürzung der Halbwertszeit. Wird der cytoplasmatische Anteil von gp48 an das MHC-bindende MCMV Protein gp34 fusioniert, kann dadurch reduzierte Oberflächenpräsenz von MHC-Klasse-I und Verkürzung der Halbwertszeit des Fusionsproteins vermittelt werden.

3.13 Die luminal Domäne von gp48 ist ausreichend für die Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle - eine Membranverankerung ist notwendig

Die Immunpräzipitation von MHC-Klasse-I-Molekülen aus gp48 Δ TM-exprimierenden Zellen, die in der FACS-Analyse keinen Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen aufweisen (3.11, Abb. 17A), hat gezeigt, dass gp48 ohne Transmembranregion und ohne cytoplasmatischen Anteil weder direkt nach der Markierung noch nach einer *chase*-Periode mit MHC-Klasse-I-Molekülen ko-immunpräzipitiert werden kann (Abb. 21A). Das Kaninchenserum m06-2, welches ein Peptid aus der luminalen Domäne von gp48 erkennt und mit dem keine Kopräzipitation von gp48 und MHC-Molekülen möglich ist (Daten nicht gezeigt), fällt nur Endo H-sensitives gp48 Δ TM aus dem Zelllysats (Abb. 21C). Neben den zu erwartenden Proteinbanden bei ca. 44 kDa (glykosyliertes gp48 Δ TM) und ca. 30 kDa (deglykosyliertes gp48 Δ TM) treten weitere Proteinbanden auf, die zum Teil unterschiedliche Glykosylierungsformen von gp48 Δ TM repräsentieren. Die deglykosylierten Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner als 30 kDa stellen wahrscheinlich intrazelluläre Degradationsprodukte dar. Die Charakterisierung dieser Proteinspezies war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Die Präzipitation von Endo H-resistenten gp48 Δ TM Molekülen aus dem Zellkulturüberstand demonstriert, dass zumindest ein Teil des löslichen Proteins sezerniert wird (Abb. 21B).

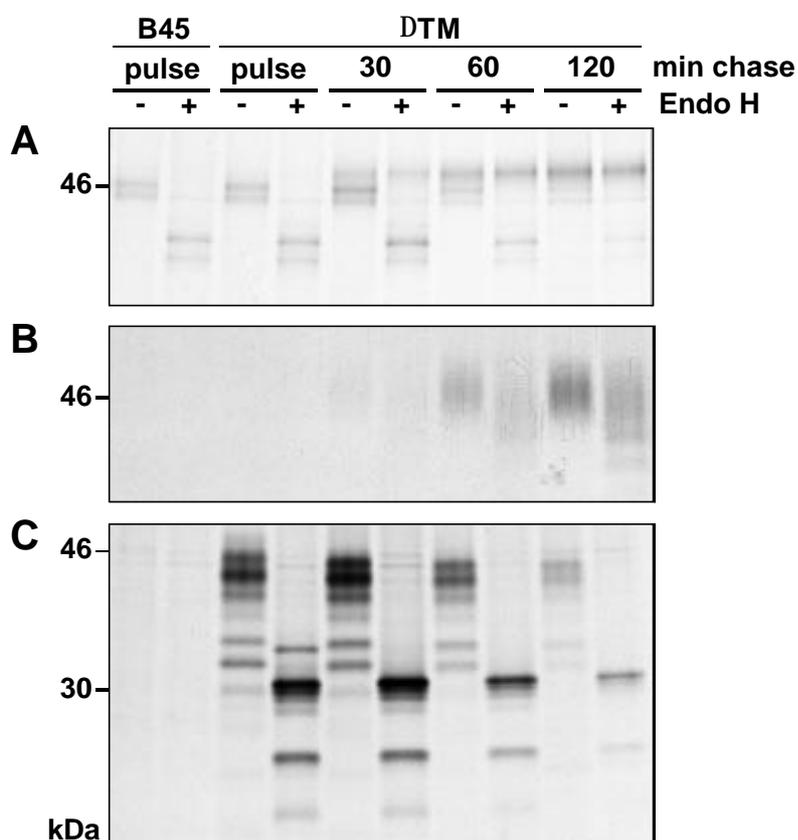


Abb. 21: Das lösliche gp48 Δ TM ko-immunpräzipitiert nicht mit H-2L^q-Molekülen

NIH 3T3-B45- und Δ TM-Transfektanten wurden für 30 min mit [³⁵S]-Cys/Met metabolisch markiert und für die angezeigten Zeiträume in normalem Medium weiterkultiviert (*chase*). Die aus dem Zelllysats mit mAk 28-14-8s präzipitierten MHC-Klasse-I-Moleküle sind nicht mit gp48 Δ TM assoziiert (**A**). gp48 konnte mit dem m06-2 Kaninchenserum gegen den luminalen Teil von gp48 aus dem Zellkulturüberstand (**B**) und dem Zelllysats (**C**) präzipitiert werden, was darauf hindeutet, dass das lösliche gp48 Δ TM in den Zellkulturüberstand sezerniert wird. Vor der SDS-PAGE wurde jeweils die Hälfte eines Präzipitates mit Endo H behandelt.

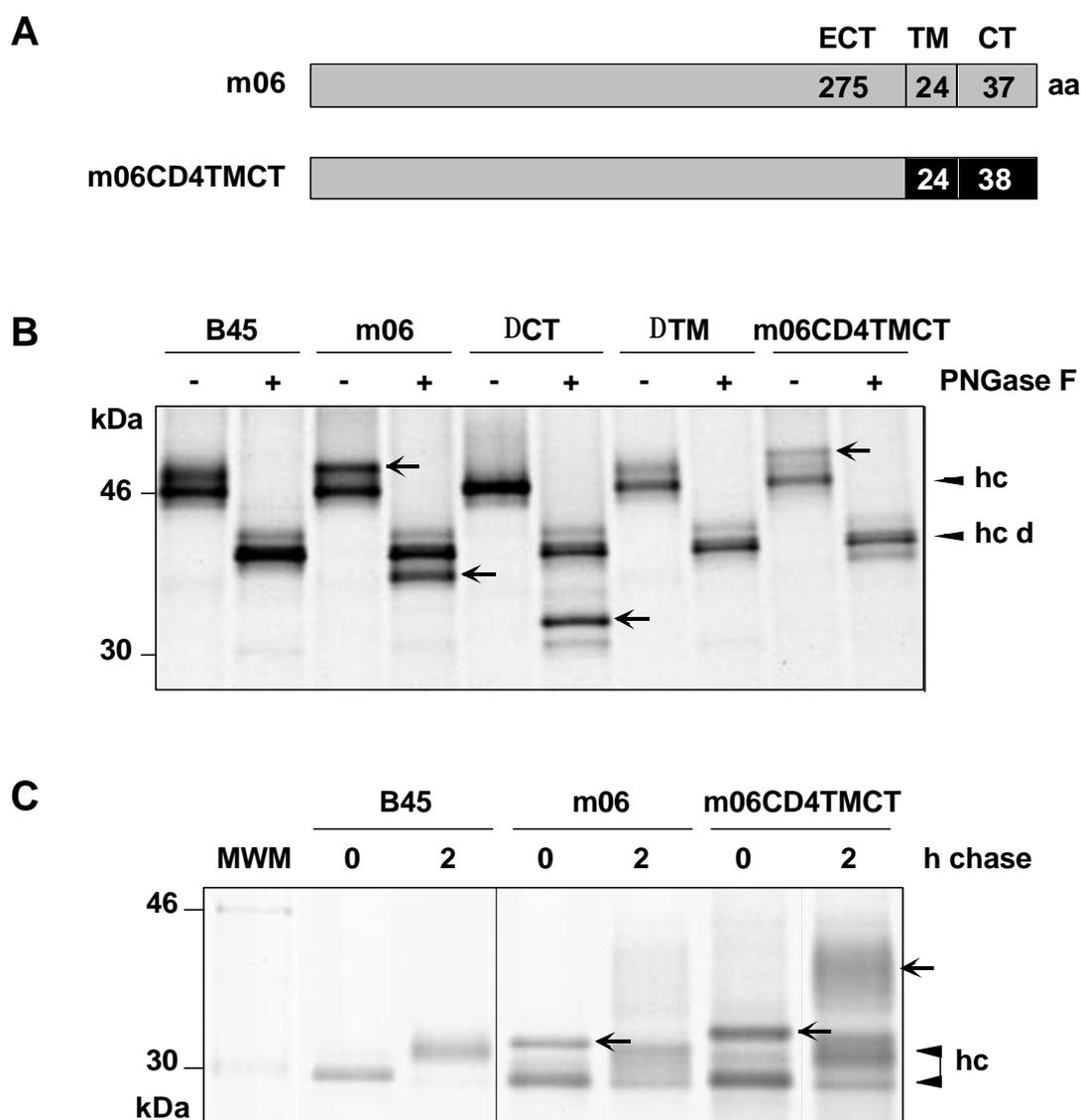


Abb. 22: Die luminal Domäne von gp48 ist ausreichend für die Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle, wenn sie membranverankert vorliegt

(A) Schematische Darstellung von *m06* und des *m06CD4TMCT*-Fusionsproteins. (B) Nach metabolischer Markierung (30 min) von NIH 3T3-Zellen, die stabil mit B45, *m06*, Δ CT, Δ TM und *m06CD4TMCT* transfiziert worden sind, wurde eine Radioimmunpräzipitation von MHC-Klasse-I-Molekülen durchgeführt. Die Zellen wurden mit 1% NP-40 Puffer lysiert, und 3 H-Moleküle wurden mit mAk 28-14-8s präzipitiert. Die Hälfte der Präzipitate wurde vor der SDS-PAGE mit PNGase F verdaut. Die Präzipitation der MHC-Klasse-I-Moleküle verdeutlicht, dass die lösliche Ektodomäne von gp48 (Δ TM) nicht mit MHC-Molekülen ko-immunpräzipitiert werden kann, sondern nur nach Fusion mit einer Transmembrandomäne (*m06CD4TMCT*). (C) NIH 3T3 B45-, *m06*- und *m06CD4TMCT*-Transfektanten wurden für 30 min metabolisch markiert und, wenn angezeigt, für 2 h in normalem Medium weiterkultiviert (*chase*) bevor sie in 1% NP-40 lysiert wurden. Die Präzipitation der MHC-Klasse-I-Moleküle mit 28-14-8s demonstriert, dass das durch *m06CD4TMCT* kodierte Fusionsprotein nicht nur nach *pulse*-Markierung im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen gefunden wird, sondern auch nach einer *chase*-Periode. ECT, Ektodomäne; TM, Transmembranregion; CT, cytoplasmatischer Anteil; aa, Aminosäuren; hc, MHC-Klasse-I schwere Kette; d, deglykosyliert; Pfeile weisen auf ko-immunpräzipitierte Proteine hin; MWM, [14 C]-Molekulargewichtsmarker.

Weil gp48 Δ CT mit MHC-Klasse-I-Molekülen ko-immunpräzipitiert, gp48 Δ TM jedoch nicht, ergibt sich die Frage, ob die Transmembranregion von gp48 für die Bindung an MHC-Moleküle notwendig ist, oder ob lediglich eine beliebige Membranverankerung ausreicht, um die beiden Proteine in räumliche Nähe und richtige Orientierung zueinander zu bringen. Um diese Frage zu beantworten, wurde die luminal Domäne von gp48 an die Transmembranregion und den cytoplasmatischen Teil von CD4 fusioniert (Abb. 22A, m06CD4TMCT) und stabil in NIH 3T3-Zellen exprimiert. Immunpräzipitationsexperimente mit MHC-Klasse-I-spezifischen Antikörpern nach metabolischer Markierung zeigen, dass das m06CD4-Fusionsprotein (gp48CD4TMCT), wie gp48 und gp48 Δ CT mit L^q-Molekülen ko-immunpräzipitiert werden kann (Abb. 22B). Die MHC-Klasse-I-Präzipitation in einem *pulse-chase* Experiment bestätigt dieses Ergebnis und demonstriert zusätzlich, dass die MHC/gp48CD4TMCT-Komplexe wie MHC/gp48-Komplexe durch den Golgi transportiert werden, und modifizierte N-Glykane erhalten. Im Gegensatz zu den gp48/MHC-Klasse-I-Komplexen werden die gp48CD4TMCT/MHC Komplexe nicht degradiert (Abb. 22C).

Die Analyse von Verkürzungsmutanten von gp48 hat ergeben, dass das Protein ohne cytoplasmatischen Anteil (gp48DCT) mit MHC-Klasse-I-Molekülen ko-immunpräzipitiert werden kann, nach zusätzlicher Deletion der Transmembranregion (gp48DTM) jedoch nicht mehr. Durch die Fusion der gp48-Ektodomäne an die transmembranale Domäne von CD4 konnte aber gezeigt werden, dass die Ektodomäne für die Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle ausreichend ist, wenn sie membranverankert vorliegt.

3.14 Die gp48 Funktion ist nicht Spezies-spezifisch

Das MCMV *m152* Genprodukt gp40 blockiert selektiv den ER-Golgi Transport von murinen aber nicht von humanen MHC-Klasse-I-Molekülen (Ziegler et al., 1997). Die Genprodukte von *US2* und *US11* des humanen Cytomegalovirus dagegen führen nicht nur zur Destabilisierung von humanen sondern zum Teil auch von murinen MHC-Klasse-I schwere Ketten, wobei sich die beiden Proteine in ihrer Allelspezifität unterscheiden (Machold et al., 1997). Von der Wirtsspezifität eines Cytomegalovirus kann also nicht auf die Spezifität einzelner viraler Proteine geschlossen werden. MCMV gp48 wirkt auf alle getesteten murinen Allele der Haplotypen H-2^b, H-2^d, H-2^k und H-2^q (Abb. 5,

Abb. 6 und Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob auch humane MHC-Klasse-I-Moleküle durch gp48 gebunden und lysosomal degradiert werden, wurde die humane Zelllinie 293 mit dem Expressionsvektor pCR3 oder mit kloniertem *m06* stabil transfiziert. Eine FACS-Analyse von Zellklonen, die gp48 exprimierten, demonstriert einen deutlichen Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Plasmamembran von *m06*⁺ Zellen (Abb. 23A). Obwohl die 293-Transfektanten aus Einzelzellen kultiviert wurden, zeigt die Analyse, dass es sich bei den Transfektanten um heterogene Populationen handelt.

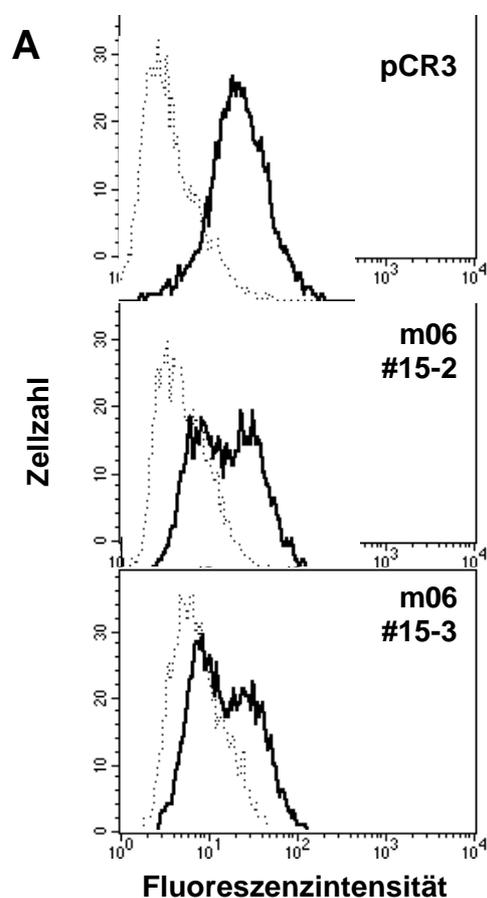
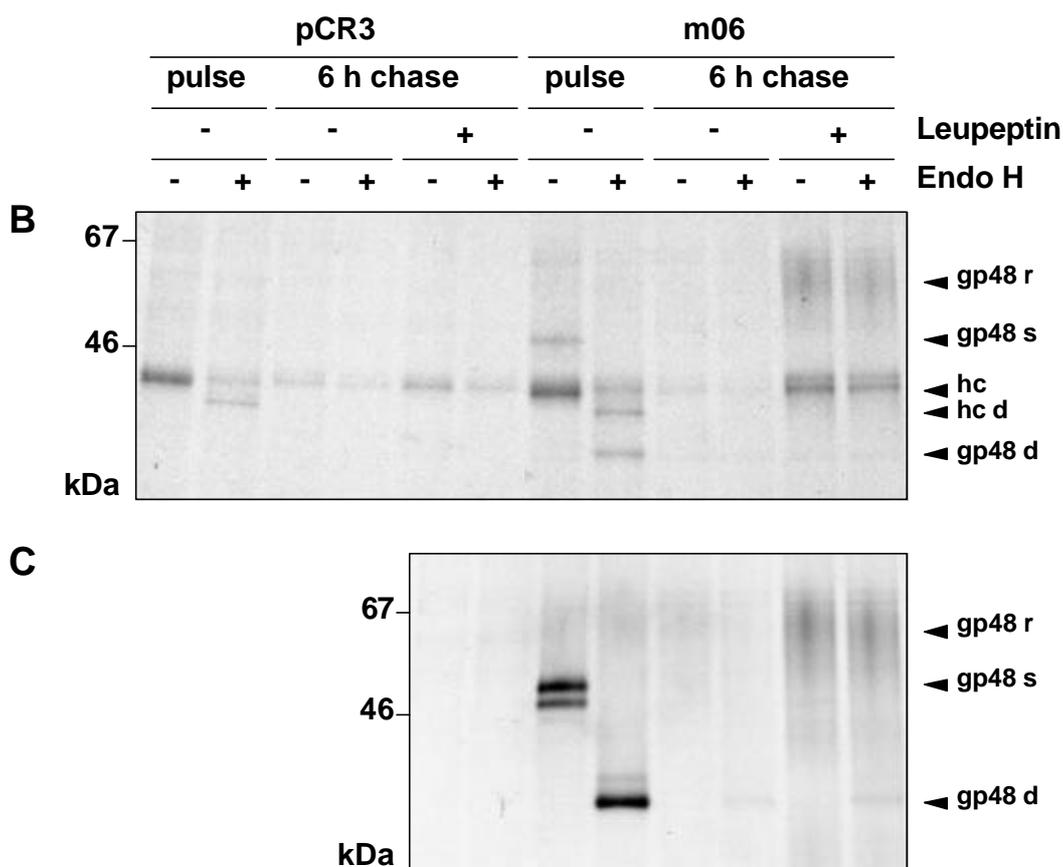


Abb. 23: gp48 bindet an humane MHC-Klasse-I-Moleküle und führt zu deren Degradation in Lysosomen

293-Zellen, die entweder mit dem Vektor allein (pCR3) oder mit *m06* (Klon #15-2 und #15-3) stabil transfiziert worden sind, wurden (A) zur Analyse ihrer MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression mit mAb W6/32 (dicke Linie) angefärbt. Die cytofluorometrische Analyse demonstriert einen deutlichen Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen in den *m06*-exprimierenden 293-Klonen #15-2 und #15-3. Eine Färbung mit dem Zweitreagenz allein diente als Negativkontrolle (gepunktete Linie). (B, C) Für das *pulse-chase* Experiment wurden 293-Kontrollzellen (pCR3) und *m06*-Transfektanten (#15-2) für 1 h metabolisch markiert und entweder sofort in 1% Digitonin lysiert (*pulse*) oder für 6 h in normalem Medium +/- Leupeptin (200 μ M) weiterkultiviert (*chase*). MHC-Klasse-I-Moleküle wurden mit mAb W6/32 (B) und gp48 mit CROMA229 (C) präzipitiert. Jeweils die Hälfte der Präzipitate wurde vor der Auftrennung in der SDS-PAGE mit Endo H behandelt. Die Präzipitation von MHC-Klasse-I-Molekülen aus *m06*-Transfektanten, zeigt, dass gp48 auch mit humanen Klasse-I-Molekülen assoziiert, und zu deren lysosomalen Degradation führt, die durch Leupeptin verhindert werden kann. Gp48 wird ebenfalls abgebaut und akkumuliert nach Leupeptin-Behandlung in seiner Endo H-resistenten Form. hc, MHC-Klasse-I schwere Kette; r, Endo H-resistent; s, Endo H-sensitiv; d, deglykosyliert.

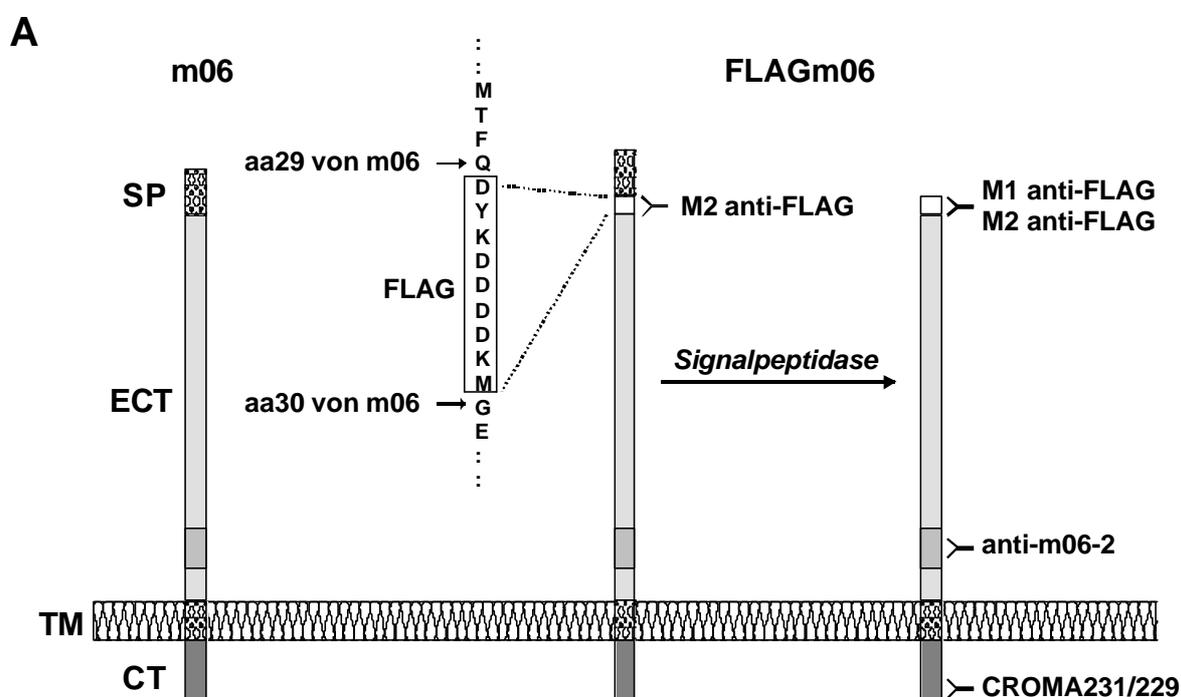


Ein *pulse-chase* Experiment mit anschließender Präzipitation von MHC-Klasse-I-Molekülen (Abb. 23B) und gp48 (Abb. 23C) zeigt, dass gp48 an humane Klasse I-Moleküle bindet und zusammen mit diesen degradiert wird. Außerdem ist nach Behandlung der Zellen mit Leupeptin zu sehen, dass die Degradation von beiden Proteinen sensitiv gegenüber diesem Proteaseinhibitor ist, und es zur Akkumulation von Endo H-resistenten Molekülen kommt. Diese Ergebnisse entsprechen den Befunden aus Mauszellen, und demonstrieren, dass gp48 neben den murinen auch humane MHC-Klasse-I-Moleküle angreift.

MCMV gp48 führt auch in humanen Zellen zum lysosomalen Abbau von MHC-Klasse-I-Molekülen und vermindert deren Expression an der Zellmembran.

3.15 Eine N-terminale Epitop-Markierung zerstört die Funktion von gp48

Mit den gp48-spezifischen Antikörpern und den beschriebenen Methoden ist es nicht gelungen, gp48 in *m06*-Transfektanten an der Zellmembran nachzuweisen. Die monoklonalen Antikörper CROMA229 und CROMA231 erkennen ein Epitop im cytoplasmatischen Anteil von gp48, und Immunfluoreszenzmarkierungen mit einem Kaninchenserum gegen ein Peptid aus der Ektodomäne (anti-m06-2) ergaben nur unspezifische Färbungen. In Experimenten mit dem anti-m06-2 Serum ließen sich MHC-Klasse-I-Moleküle nicht kopräzipitieren, was darauf schließen lässt, dass dieses Serum nur nichtkomplexiertes gp48 erkennt, weil entweder das m06-2 Epitop durch die MHC Assoziation verdeckt ist, oder die Antikörperbindung zur Dissoziation der gp48/MHC Komplexe führt. Um gp48 mit einem Antikörper gegen ein weiteres Epitop in der Ektodomäne nachweisen zu können, wurde ein Fusionskonstrukt hergestellt, bei dem nach der potenziellen Schnittstelle des Signalpeptids ein FLAG-Epitop aus 8 Aminosäuren inseriert wurde (Abb. 24A). Da verschiedene Antikörper gegen das FLAG-Epitop zur Verfügung stehen, die entweder nur mit dem äußerst N-terminalen Epitop reagieren (M1) oder auch mit einem internen Epitop (M2), ist es zusätzlich möglich, die Abspaltung des Signalpeptids nachzuweisen.



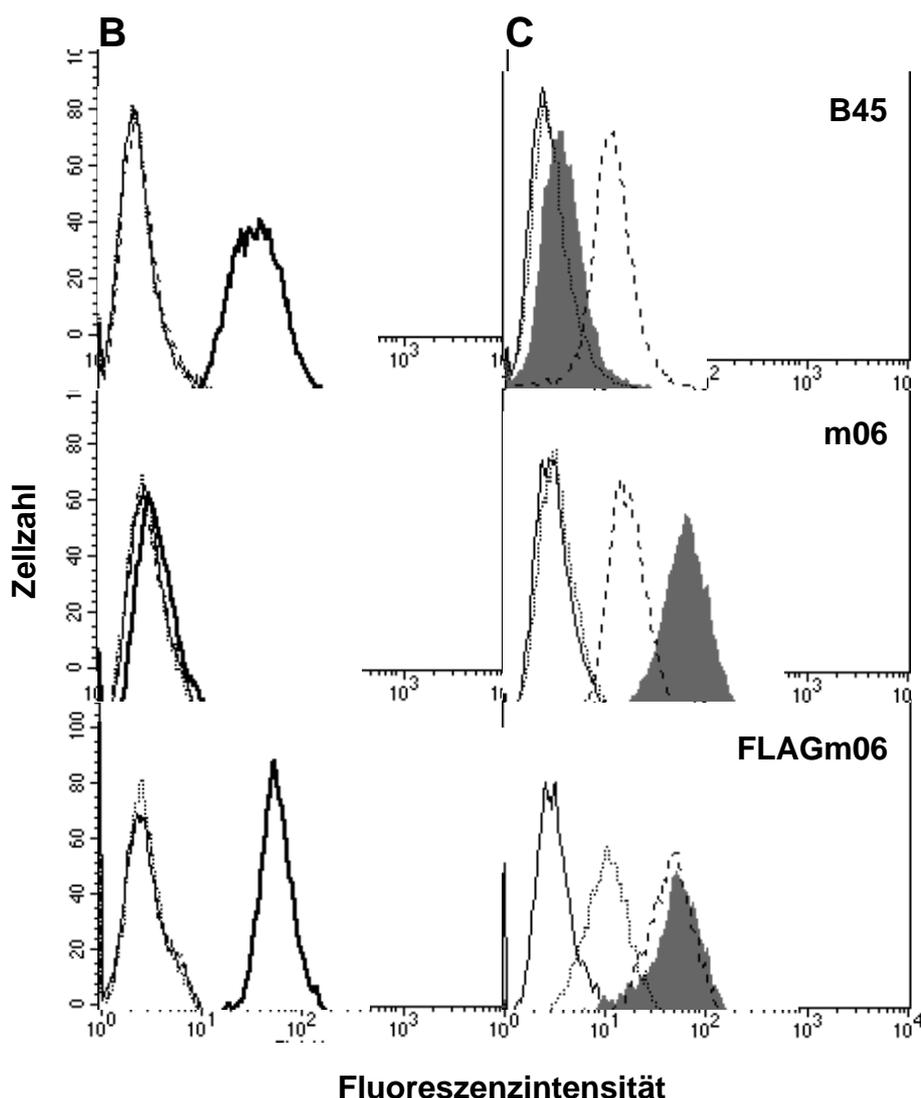


Abb. 24: Ein N-terminal FLAG-markiertes gp48 hat seine MHC-Klasse-I-modulierende Funktion verloren und wird nicht an die Zellmembran transportiert

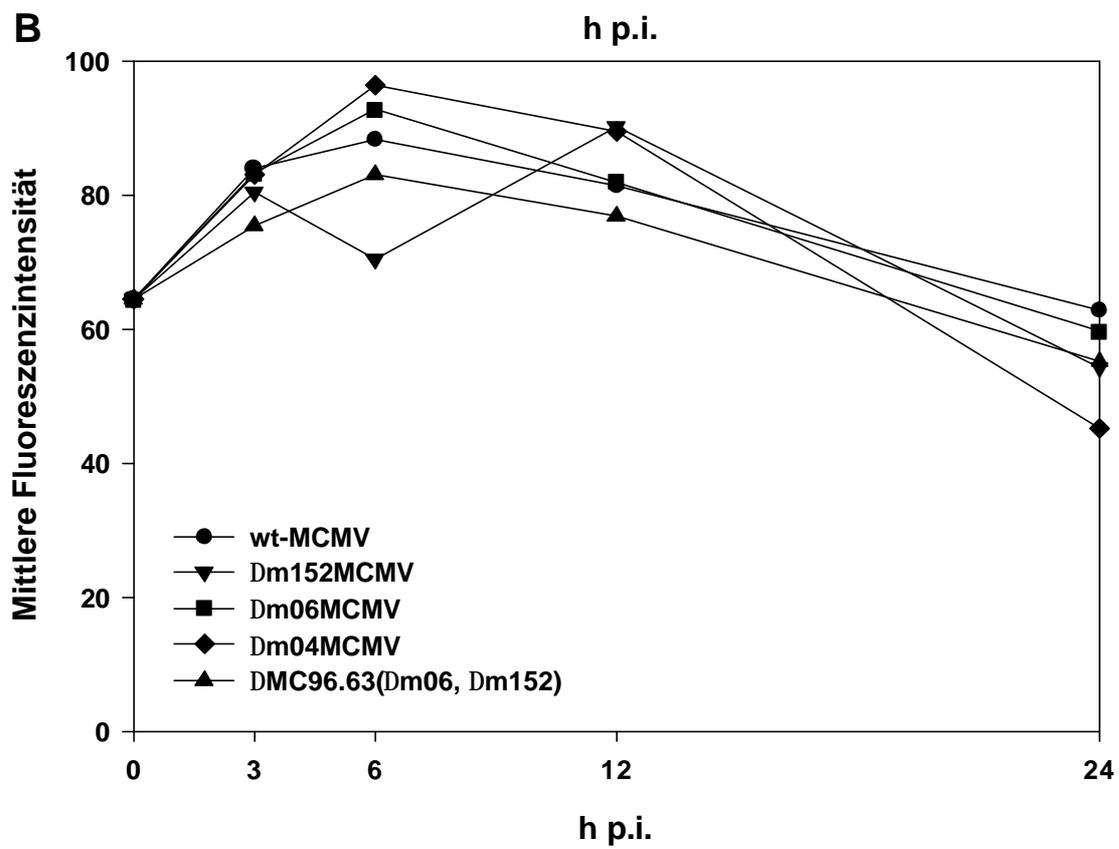
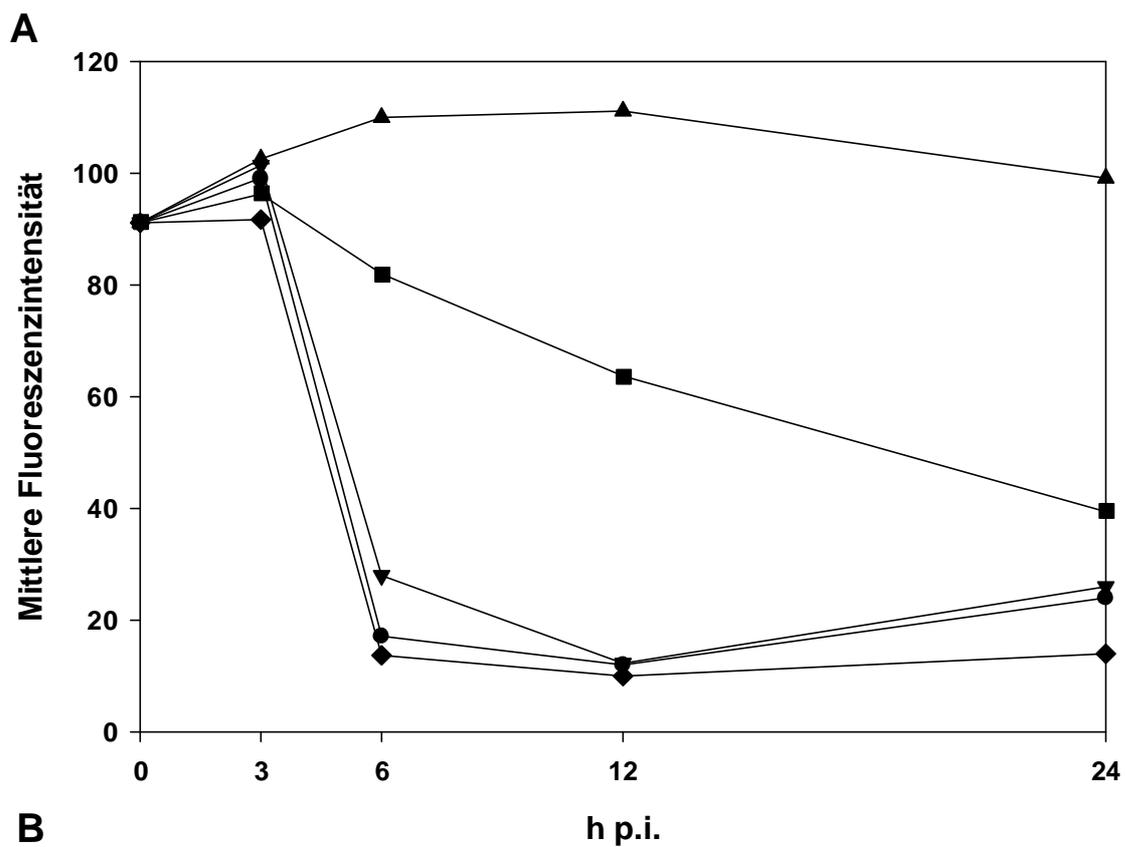
(A) Schematische Darstellung des *m06* Genprodukts gp48, welches aus einem cytoplasmatischen Anteil (CT), einem Transmembransegment (TM), einer Ektodomäne (ECT) und einem Signalpeptid (SP) besteht. Des weiteren ist das FLAGm06 Fusionsprotein gezeigt, bei dem nach der vorhergesagten Signalpeptidschnittstelle ein FLAG-Epitop inseriert wurde. Außerdem sind die Bindungstellen des monoklonalen Antikörpers CROMA229 bzw. 231, des Kaninchenserums anti-*m06-2*, und der beiden anti-FLAG Antikörper M1 und M2 eingezeichnet. Der Antikörper M1 kann das FLAG-markierte gp48 nur erkennen, wenn das Signalpeptid durch die Signalpeptidase entfernt wurde, und der N-Terminus des FLAG-Epitops freiliegt. (B, C) zeigen cytofluorometrische Analysen von NIH 3T3-Zellen, die stabil mit dem Vektor B45, *m06* und FLAG*m06* transfiziert worden sind. In (B) gezeigt ist die Analyse von Oberflächenmolekülen nach Anfärbung der Zellen mit mAb 28-14-8s (H-2L^q, dicke Linie), M1 anti-FLAG (gepunktete Linie), M2 anti-FLAG (gestrichelte Linie) und dem FITC-konjugiertem Zweitantikörper Ziege anti-Maus IgG allein (dünne Linie), dass die Expression des FLAG-markierten gp48 (FLAG*m06*) nicht zu einem Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran führt. Außerdem ist weder mit M1 noch mit M2 das Fusionsprotein an der Zellmembran nachweisbar. (C) Für die Analyse intrazellulärer Antigene wurden die Zellen fixiert, mit Saponin permeabilisiert und anschließend mit CROMA231 (ausgefüllt graue Histogramme), M1 (gepunktete Linie), M2 (gestrichelte Linie) oder dem Zweitantikörper allein (dünne Linie) angefärbt. Das FLAG*m06* Genprodukt wird sowohl von den FLAG-Antikörpern M1 und M2 erkannt als auch von CROMA231. Die Färbung mit CROMA231 demonstriert, dass die FLAG*m06*-Expression mit der des nichtmarkierten *m06* vergleichbar ist.

Eine cytofluorometrische Untersuchung von stabilen FLAGm06-Transfektanten zeigte, dass das FLAG-Epitop-markierte gp48 nicht mehr in der Lage ist, die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen zu modulieren (Abb. 24B). Außerdem war weder mit M1 noch mit M2 der Nachweis des FLAG-markierten gp48 an der Oberfläche möglich. Eine intrazelluläre Anfärbung der Zellen nach Permeabilisierung mit Saponin ergab jedoch, dass die Menge an Epitop-markiertem gp48 mit der von gp48 vergleichbar ist, und dass sowohl der Antikörper M1 als auch M2 das Fusionsprotein erkennt (Abb. 24C). Aus diesen FACS-Analysen kann geschlossen werden, dass das Epitop-markierte gp48 in das ER inseriert, und das vorhergesagte Signalpeptid abgespalten wird, da das Protein auch vom Antikörper M1, der nur mit N-terminalen FLAGs reagiert, erkannt wird. Durch die FLAG-Markierung von gp48 wurde die MHC-Klasse-I-reaktive Funktion von gp48 zerstört. Höchst wahrscheinlich wurde nicht die Transportfunktion beeinträchtigt, sondern die MHC-bindende Domäne, die im luminalen Anteil von gp48 lokalisiert ist. Da gp48, welches nicht mit MHC-Klasse-I-Molekülen assoziiert, durch das Proteasom degradiert wird (siehe 3.9), liegt die Vermutung nahe, dass auch das FLAG-markierte Protein retentiert und nicht durch den Golgi transportiert wird.

Eine N-terminale Markierung von gp48 mit dem FLAG-Epitop führt zu einem Verlust der MHC-Klasse-I-spezifischen Funktion von gp48.

3.16 Der Effekt von *m06* bei der MCMV Infektion

Die Infektion von Zellen mit MCMV führt zu einem annähernd vollständigen Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Plasmamembran. Dieser Verlust wird nicht allein durch die gp40-vermittelte Retention von MHC-Molekülen verursacht, da eine MCMV-Mutante, bei der *m152* deletiert ist, immer noch in der Lage ist, effizient die Oberflächenexpression von MHC-Molekülen zu verhindern (siehe 1.3.2.3, Abb. 3) (Thäle et al., 1995). Um den Einfluß von gp48 im Vergleich zu den anderen MHC-Klasse-I-reaktiven Virusfunktionen, den Genprodukten von *m152* und *m04*, zu untersuchen, wurden Zellen mit Virusmutanten, denen diese Gene entweder einzeln oder in Kombination deletiert wurden, infiziert und die Kinetik der MHC-Klasse-I Oberflächenexpression gemessen (Abb. 25A, C). Um zu sichern, dass nach MCMV Infektion keine unspezifische Modulation von Zellmembranproteinen auftritt, wurde das Oberflächenprotein Pgp-1 (CD44) angefärbt (Abb. 25B).



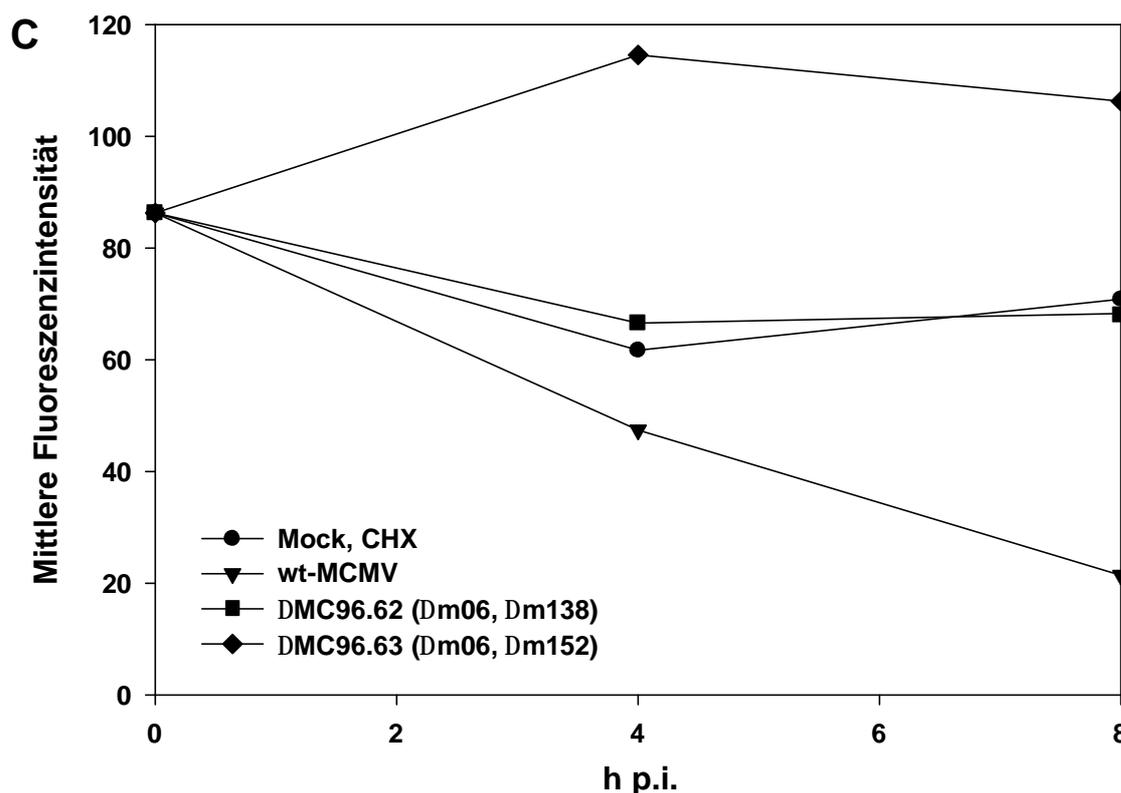


Abb. 25: Die Rolle von *m06* bei der Modulation der Oberflächenexpression von H-2L^q-Molekülen nach MCMV-Infektion

NIH 3T3-Zellen wurden mit wt-MCMV oder den MCMV-Mutanten $\Delta m06$ MCMV, $\Delta m152$ MCMV, $\Delta m04$ MCMV und $\Delta MC96.63$ ($\Delta m06$, $\Delta m152$) mit einer m.o.i. 1 infiziert und zu den angezeigten Zeiten nach Infektion cytofluorometrisch analysiert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten nach Anfärbung von H-2 L^q-Molekülen mit mAk 28-14-8s (A) und Pgp-1 mit mAk IM7.8.1 als Kontrollprotein (B). Die Analyse von MHC-Klasse-I-Molekülen zeigt, dass die Infektion mit wt-MCMV, $\Delta m152$ MCMV und $\Delta m04$ MCMV zu einem raschen Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen führt. Nach Infektion mit $\Delta m06$ MCMV kommt es zu einer verlangsamten MHC-Klasse-I Abnahme, nach Infektion mit der MCMV-Mutante $\Delta MC96.63$, bei der sowohl *m06* als auch *m152* deletiert ist, bleiben MHC-Klasse-I-Moleküle unbeeinträchtigt. (C) NIH 3T3-Fibroblasten wurden entweder mit Cycloheximid (CHX, 50 μ g/ml) behandelt oder mit wt-MCMV, der MCMV-Mutante $\Delta MC96.62$ ($\Delta m06$, $\Delta m138$) oder $\Delta MC96.63$ ($\Delta m06$, $\Delta m152$) infiziert und nach Anfärbung mit mAK 28-14-8s wie unter (A) analysiert. Die MHC-Klasse-I Modulation nach Hemmung der Proteinsynthese in Mock-infizierten Zellen, die parallel zu der nach $\Delta MC96.62$ -Infektion verläuft, demonstriert, dass die Abnahme nach $\Delta MC96.62$ -Infektion auf dem *m152*-vermittelten Transportblock von Klasse-I-Molekülen beruht. Im Gegensatz dazu verläuft die Kinetik mit einem Virus, das *m06* enthält, sehr schnell und deutet auf eine Beteiligung von *m06* bei der direkten Modulation von MHC-Molekülen an der Zellmembran. Bei den Analysen wurde von jedem Messwert jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität nach Anfärbung der Zellen mit FITC-konjugiertem Zweitantikörper subtrahiert. Die Analyse von unbehandelten, mock-infizierten Zellen entspricht dem Wert bei 0 h p.i..

Die Infektion mit Wildtyp-(wt-) MCMV führt zu einem raschen Verlust von H-2L^q-Molekülen an der Zellmembran, der nach 6 h Infektion fast vollständig ist. Die Infektion mit einer Virusmutante, bei der das Gen *m04* deletiert ist ($\Delta m04$ MCMV), resultiert ebenfalls in einer kompletten Abnahme von MHC-Klasse-I-Molekülen, die in ihrer Kinetik der nach wt-MCMV Infektion gleicht. Das *m04* Genprodukt gp34 ist deshalb bei der viralen Modulation der MHC-Klasse-I Oberflächenexpression nicht beteiligt. Der durch $\Delta m152$ MCMV verursachte Verlust von

MHC-Klasse-I-Molekülen an der Plasmamembran tritt - im Vergleich zu dem nach wt-MCMV-Infektion - mit geringer Verzögerung ein (Abb. 25A). Dieses Ergebnis zeigt, dass das *m152* Genprodukt gp40 für die Modulation der plasmamembranständigen MHC-Moleküle nach Infektion unerheblich ist. Da gp40 nur neuassemblierte MHC-Klasse-I-Komplexe im ERGIC zurückhält und oberflächenresidente Moleküle nicht angreift (Ziegler et al., 1997), ist in diesen Experimenten kein größerer Unterschied zwischen wt MCMV und $\Delta m152$ MCMV zu erwarten. Die *m152*-vermittelte MHC-Retention kann nur nach Deletion von *m06* gemessen werden, d.h. als Unterschied zwischen der MHC-Klasse-I Reduktion nach Infektion mit $\Delta m06$ BAC im Vergleich zu derjenigen nach Infektion mit $\Delta MC96.63$ ($\Delta m06$, $\Delta m152$).

Werden Zellen mit einem Virus infiziert, dem *m06* fehlt ($\Delta m06$ MCMV), kommt es nur zu einer langsamen, aber kontinuierlichen Abnahme von MHC-Molekülen an der Plasmamembran. Diese relativ langsame Abnahme kann dadurch erklärt werden, dass aufgrund der noch aktiven *m152*-bedingten Retention keine neusynthetisierten Klasse I-Moleküle die Plasmamembran erreichen, und die oberflächenresidenten Moleküle entsprechend ihrer natürlichen Halbwertszeit abgebaut werden. Aus diesem Befund kann außerdem geschlossen werden, dass das *m06* Genprodukt gp48 für den raschen Verlust der MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zellmembran nach MCMV Infektion essenziell ist. Die MHC-Klasse-I Analyse nach Behandlung nichtinfizierter Zellen mit Cycloheximid (CHX) demonstriert, dass die Kinetik des MHC-Klasse-I Verlustes nach *m152*-vermittelter Retention mit der nach Inhibition der Proteinsynthese durch CHX übereinstimmt (Abb. 25C; Mock CHX und $\Delta MC96.62$). Nach Infektion der Zellen mit dem Virus $\Delta MC96.63$, bei dem sowohl *m06* als auch *m152* fehlen, kommt es nicht zur einer Reduktion, sondern zu einer leichten Zunahme von oberflächenresidenten MHC-Klasse-I-Molekülen. Die gesteigerte MHC-Klasse-I-Expression könnte auf eine transkriptionelle Induktion durch Typ I Interferone zurückgeführt werden, die nach MCMV Infektion sezerniert werden und die Expression MHC-kodierter Gene stimulieren.

Die MHC-Klasse-I Oberflächenanalysen nach MCMV-Infektion zeigen, dass *m04* keine Rolle für den Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen nach Infektion spielt, und dass der Effekt von *m152* gering ist. Da die Infektion mit einem Virus, bei dem das Gen *m06* noch erhalten ist, zu einem rapiden Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran führt, der nicht mit der natürlichen Halbwertszeit der Oberflächenmoleküle erklärt werden kann, wie sie nach Cycloheximidbehandlung zu sehen ist, kann geschlossen werden, dass gp48 sowohl einen Effekt auf neusynthetisierte als auch auf MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zellmembran hat.

4 Diskussion

4.1 Das MCMV *m06* Genprodukt gp48 vermittelt den Transport von MHC-Klasse-I-Molekülen in die Lysosomen

Die Infektion von Zellen mit MCMV führt zu einem Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran (Del Val et al., 1989). Neben dem *m152* Genprodukt kodiert MCMV für weitere Proteine, die den Transport von MHC-Klasse-I-Molekülen an die Zellmembran beeinflussen (Thäle et al., 1995; Ziegler et al., 1997). Das Gen *m06*, bzw. dessen Genprodukt gp48, wurde durch die Kombination von zwei Strategien identifiziert. Für die Suche nach MCMV Proteinen, die mit Klasse I-Molekülen assoziieren, wurden nach Immunisierung von Mäusen mit MHC-Klasse-I Ko-Immunpräzipitaten aus infizierten Zellen die monoklonalen Antikörper CROMA229 und CROMA231 hergestellt. Beide erkennen ein 48 kDa MCMV Glykoprotein. Die Mikroinjektion von viralen Genomfragmenten und anschließende Immunfluoreszenz mit CROMA231 führte zusammen mit der Analyse von MCMV-Deletionsmutanten zur Identifikation von ORF *m06* als kodierendes Gen für das 48 kDa Glykoprotein gp48.

In der vorliegenden Arbeit wurde das MCMV Gen *m06* isoliert exprimiert und die Funktion des *m06* Genprodukts im Hinblick auf eine Beeinflussung der MHC-Klasse-I Expression analysiert (vgl. Abb. 26). Zellen, die stabil mit *m06* transfiziert sind und permanent gp48 exprimieren, weisen geringere Mengen von MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zellmembran auf und sind in ihrer Fähigkeit, antigene Peptide über Klasse I-Moleküle gegenüber CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren, gehemmt. Im ER bindet das *m06* Genprodukt gp48 an β_2 M-assoziierte MHC-Klasse-I-Moleküle, die nicht notwendigerweise mit Peptid beladen sein müssen. gp48/MHC-Klasse-I-Komplexe verlassen das ER, werden durch den Golgi transportiert, wo sie komplexe Oligosaccharidseitenketten erhalten, und werden dann in einem Lamp-1⁺ Kompartiment degradiert. Eine Hemmung der Degradation mit endosomalen/lysosomalen Inhibitoren führt zu einer Akkumulation von komplex glykosylierten gp48/MHC-Molekülen.

Für den gerichteten Transport der gp48/MHC-Klasse-I-Komplexe in die Lysosomen ist ein di-Leucin-Motiv im cytoplasmatischen Anteil von gp48 essenziell; für die Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle ist die luminaire Domäne, wenn sie membranverankert vorliegt, ausreichend.

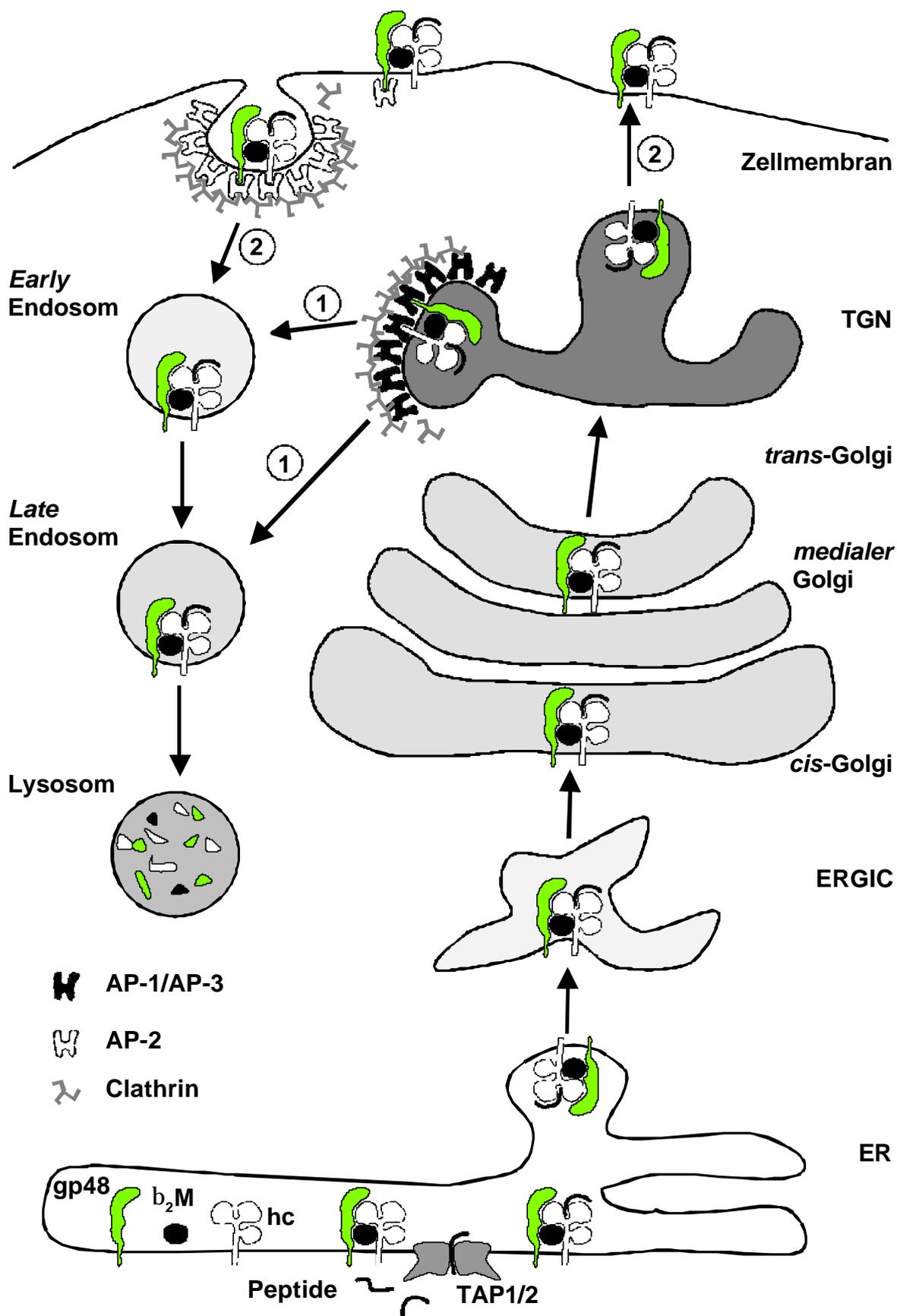


Abb. 26: Schematische Darstellung der Immunevasionsfunktion von MCMV gp48

Das MCMV *m06* Genprodukt gp48 (grün) bindet im endoplasmatischen Retikulum (ER) an β_2 -Mikroglobulin (β_2M , schwarz)-assoziierte MHC-Klasse-I-Moleküle (hc, weiß), die nicht notwendigerweise mit Peptid beladen sein müssen. Die Komplexe aus gp48 und MHC-Klasse-I-Molekülen verlassen das ER, werden durch den Golgi transportiert, und gelangen, vermittelt über ein di-Leucin Motiv im cytoplasmatischen Anteil von gp48, in das endosomale/lysosomale Kompartiment. Beide, gp48 und MHC-Klasse-I-Moleküle, werden in den Lysosomen proteolytisch abgebaut.

Für den Transport der Komplexe in die Lysosomen gibt es zwei mögliche Wege: Der Weg **1** geht vom *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) über *early* bzw. *late* Endosomen in die Lysosomen. Für diesen Transport ist die Ausbildung von Clathrin-coated Vesikeln am TGN notwendig, die durch die Adaptorproteinkomplexe AP-1 bzw. AP-3 vermittelt wird, welche einerseits lysosomale Transportsignale, wie di-Leucin Motive, erkennen, und andererseits Clathrin rekrutieren. Für den zweiten potenziellen Weg (**2**) in die Lysosomen, müssen die gp48/MHC-Klasse-I-Komplexe zunächst über den konstitutiven sekretorischen Transport die Zellmembran erreichen. An der Zellmembran werden Endozytose-Signale im cytoplasmatischen Anteil der gp48/MHC-Moleküle von AP-2 Komplexen erkannt, die wiederum zur Bildung von Clathrin-coated Vesikeln beitragen. Über diese Endozytosevesikel gelangen die Proteine in das endosomale/lysosomale System, wo sie letztendlich degradiert werden.

4.2 Die Transportfunktion von gp48

Der gerichtete Transport der gp48/MHC-Klasse-I-Komplexe in die Lysosomen wird durch gp48 vermittelt, da Lysosomen normalerweise kein Zielkompartiment für MHC-Klasse-I-Moleküle darstellen. Da gp48 ohne den cytoplasmatischen Anteil seine Transportfunktion verliert, befinden sich die Transportsignale in der cytoplasmatischen Domäne. Der cytoplasmatische Anteil von gp48 enthält zwei di-Leucin-Motive, die potenzielle Transportmotive darstellen. Für di-Leucin-Motive in verschiedenen zellulären als auch viralen Proteinen konnte gezeigt werden, dass sie als Signale für einen Transport in Endosomen bzw. Lysosomen dienen (Le Borgne and Hoflack, 1998b; Sandoval and Bakke, 1994b). Es lag daher die Vermutung nahe, dass eines oder beide di-Leucin-Motive für den lysosomalen Transport der gp48/MHC-Klasse-I-Komplexe essenziell sind. Die gezielte Mutationsanalyse der Motive demonstriert, dass die Substitution des Membranproximalen di-Leucins (LL307/308) durch zwei Alanine ausreicht, um den Transport von MHC-Klasse-I-Molekülen an die Zellmembran zu ermöglichen. Dieser Befund ist insofern interessant, als bei gp48 anders als bei Limp-II (Sandoval et al., 1994a; Vega et al., 1991) und den Mannose 6-Phosphat-Rezeptoren CD-M6PR und CI-M6PR (Johnson and Kornfeld, 1992a; Johnson and Kornfeld, 1992b) nicht das C-terminale di-Leucin-Motiv in Position -3 und -4 relevant ist, sondern das Membranproximale di-Leucin. Zusätzlich wurde z.B. bei der MHC-Klasse-II invarianten Kette Iip31 (Pond et al., 1995), der CD3- γ Untereinheit (Dietrich et al., 1997) und bei Limp-II und der Tyrosinase (Höning et al., 1998) beobachtet, dass saure Aminosäuren in Position -4 und/oder -5 relativ zum di-Leucin Motiv entscheidend für die Funktion des Transportmotivs sind. Damit übereinstimmend konnte im Falle von gp48 nur für das Membranproximale Motiv, nicht aber für das terminale, eine saure Aminosäure an Position -5 gefunden werden.

Drei weitere Mitglieder der MCMV *m02* Genfamilie, *m08*, *m09* und *m10*, kodieren für Typ I Transmembranproteine, die jeweils ein di-Leucin-Motive in ihrem cytoplasmatischen Anteil enthalten. Die Aminosäuresequenzen, welche die di-Leucine flankieren, sind in den *m08*, *m09*, *m10*

Genprodukten im Vergleich zu gp48 allerdings nicht konserviert, die Position des di-Leucins entspricht jedoch der des Membran-proximalen Motivs von gp48, welches für den Transport relevant ist. Die Funktion der *m08*, *m09*, *m10* Genprodukte ist noch unbekannt. Aufgrund ihrer Homologie zu *m06* (41-46% Ähnlichkeit; 21-23% Identität) und ihrem di-Leucin Motiv im cytoplasmatischen Anteil kann vermutet werden, dass auch sie den Transport von zellulären Proteinen in das endosomale/lysosomale Kompartiment der Zelle vermitteln.

Di-Leucin Motive sind sowohl beim direkten Transport von Proteinen vom Golgi zu Endosomen bzw. Lysosomen involviert, als auch bei der Endozytose von oberflächenresidenten Proteinen (Rothman and Wieland, 1996; Sandoval and Bakke, 1994b). Die molekularen Mechanismen, die einem di-Leucin-vermittelten Transport zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig geklärt. Es gibt aber Hinweise, dass heterotetramere Clathrin-assoziierte Protein-Komplexe, sogenannte AP-Komplexe (AP-1, AP-2, AP-3), Transmembranproteine in Clathrin-*coated pits* anreichern, indem sie direkt di-Leucin Signale im cytoplasmatischen Anteil der Zielproteine binden (Heilker et al., 1999; Kirchhausen et al., 1997; Le Borgne and Hoflack, 1998a; Le Borgne and Hoflack, 1998b). Zusammen mit Dynamin und anderen GTPasen vermitteln AP-2 Komplexe die Endozytose von Transmembranproteinen über Clathrin-*coated Vesikel* (Bottomley et al., 1999; Kelly, 1999; Schmid et al., 1998). AP-1 und AP-3 Komplexe sind am TGN und an Endosomen lokalisiert. Beide sind am intrazellulären, vesikulären Transport von Proteinen in Endosomen, Lysosomen und Melanosomen beteiligt (Le Borgne and Hoflack, 1998a).

Es ist noch unklar, ob gp48/MHC-Klasse-I-Komplexe direkt vom TGN in die Lysosomen transportiert werden, oder ob die Komplexe zuerst die Zellmembran erreichen, daraufhin internalisiert werden und dann in die Lysosomen gelangen (Abb. 26). Da bisher in NIH 3T3-*m06*-Transfektanten gp48 nicht an der Zellmembran nachgewiesen werden konnte und auch MHC-Klasse-I-Moleküle nur in sehr geringen Mengen an der Oberfläche lokalisiert sind, kann, sofern die putative Verweildauer der Komplexe an der Zellmembran nicht sehr kurz ist, angenommen werden, dass gp48/MHC-Komplexe direkt vom TGN in die Lysosomen transportiert werden.

Experimente mit MCMV-Mutanten zeigen allerdings, dass nach Infektion eine MCMV-Funktion zu einem raschen Verlust der an der Zellmembran lokalisierten MHC-Klasse-I-Moleküle führt (siehe 4.6). Da dieser Verlust nicht mit der natürlichen Halbwertszeit der Oberflächenproteine erklärt werden kann, müssen ein oder mehrere MCMV-Proteine MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zellmembran aktiv entfernen. Da eine MCMV-Mutante, bei der *m06* deletiert ist, diese Eigenschaft nicht mehr besitzt, ist gp48 für diese Virusfunktion als essenziell anzusehen. Ob diese Funktion allein durch gp48 ausgeführt wird oder durch gp48 als essenzieller Komponente im Kontext anderer Proteine, ist noch offen. Dieser Befund aus den MCMV Infektionsexperimenten, dass gp48 bei der Modulation oberflächenresidenter MHC-Klasse-I-Moleküle beteiligt ist, steht zunächst im Gegensatz zu der Annahme, dass in *m06*-Transfektanten gp48/MHC-Klasse-I-

Komplexe direkt vom TGN in die Lysosomen transportiert werden. Zur Aufklärung dieses Widerspruchs könnte die Identifikation der mit gp48 interagierenden Adaptorprotein-Komplexe beitragen. Wie oben beschrieben sind AP-2 Komplexe für die Ausbildung von Clathrin-*coated* Vesikeln an der Plasmamembran notwendig, und AP-1 und AP-3 Komplexe für die Bildung von Vesikeln am TGN bzw. an den Endosomen für den Transport zu den Endosomen bzw. Lysosomen. Da aber eine Ko-Immünpräzipitation zwischen Zielprotein und Adaptorprotein nur in wenigen Experimenten gelungen ist, und die meisten Methoden nur mit gereinigten Proteinen funktionieren, ist der Nachweis einer Interaktion zwischen Zielprotein und Adaptor nicht trivial (Heilker et al., 1999).

Mit der Übertragung der cytoplasmatischen Domäne von gp48 auf ein heterologes Protein sollte getestet werden, ob dieser Anteil von gp48 die ganze Information enthält, um einen Transport in Lysosomen zu vermitteln. Der Austausch des cytoplasmatischen Anteils von CD4 durch den von gp48 hat gezeigt, dass die Expression des Fusionsproteins an der Plasmamembran im Vergleich zu CD4 reduziert ist, die Halbwertszeit des Proteins jedoch unverändert bleibt. Im Gegensatz dazu konnte durch den Austausch des cytoplasmatischen Anteils von MCMV gp34, welches ebenfalls MHC-Klasse-I-Moleküle bindet und sie an die Zellmembran begleitet, demonstriert werden, dass nicht nur die Halbwertszeit des viralen Proteins verkürzt, sondern auch der Transport von MHC-Klasse-I-Molekülen an die Plasmamembran gehemmt wurde. Sollten weitere Untersuchungen zeigen, dass der cytoplasmatische Anteil von gp48 seine Transportfunktion nur zusammen mit dem cytoplasmatischen Anteil von MHC-Klasse-I-Molekülen ausüben kann, wäre dieser Befund sehr interessant. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass HIV-1 Nef nur dann zur Internalisierung von HLA-Molekülen führt, wenn diese HLA-Moleküle ein Transportmotiv in ihrem cytoplasmatischen Anteil enthalten. Dieses auf ein Tyrosin-beruhendes Transportmotiv mit der Konsensussequenz YXX ϕ (wobei X für eine beliebige und ϕ für eine hydrophobe Aminosäure steht), ist in HLA-A- und -B-Molekülen zu finden, nicht aber in HLA-C-Molekülen, die daher nicht von Nef beeinträchtigt werden (Le Gall et al., 1998). YXX ϕ gehört, wie das di-Leucin Motiv, zu den Transportsignalen, die Endozytose bzw. lysosomalen Transport vermitteln können (Sandoval and Bakke, 1994b). Die Konsensussequenz YXX ϕ ist auch im cytoplasmatischen Anteil von H-2-Molekülen vorhanden. Experimente in *m06*-exprimierenden Zellen mit HLA-C Molekülen oder MHC-Klasse-I-Molekülen, deren YXX ϕ Motiv mutiert bzw. deletiert wurde, könnten möglicherweise zeigen, ob der cytoplasmatische Anteil der MHC-Klasse-I schweren Kette mit seinem Transportmotiv tatsächlich für den lysosomalen Transport der gp48/MHC Komplexe essentiell ist, oder ob allein die Assoziation mit Klasse-I-Komplexen für den gp48-vermittelten Transport in die Lysosomen ausreicht.

4.3 MHC-Klasse-I-Assoziation als Vorbedingung für gp48 ER Export und lysosomalen Transport

Versuche, mit verschiedenen Proteaseinhibitoren die Degradation von gp48 und MHC-Klasse-I-Molekülen zu hemmen, haben ergeben, dass MHC-Klasse-I-Moleküle und assoziiertes gp48 durch lysosomale Enzyme abgebaut werden und in der Gegenwart von endosomalen/lysosomalen Inhibitoren in ihrer Endo H-resistenten Glykosylierungsform akkumulieren. Eine Fraktion von gp48, deren Abbau sich sensitiv gegenüber proteasomalen Inhibitoren verhält, verbleibt in ihrer Endo H-sensitiven, mannosereichen Glykosylierungsstufe. Dies impliziert eine Retention der Moleküle zwischen ER und *cis*-Golgi, da sie keine Modifikation ihrer Kohlenhydratseitenketten durch Golgi-residente Enzyme erfahren. Experimente mit Zellen, die kein β_2 M exprimieren und daher keine gp48-MHC-Assoziation erlauben, ergaben, dass die gesamte Population von gp48 durch Proteasomen abgebaut und nach proteasomaler Inhibition in einer Endo H-sensitiven Form stabilisiert wird. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass nur mit MHC-Klasse-I-Komplexen assoziierte gp48 Moleküle die Voraussetzung besitzen, den Golgi zu passieren und MHC-Moleküle zur Degradation in die Lysosomen umzuleiten. Interessanterweise wird auch von dem gp48 Homolog gp34 berichtet, dass es nur im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen an die Plasmamembran transportiert wird (Kleijnen et al., 1997). Es ist jedoch noch nicht bekannt, ob die retentierten gp34 Moleküle, wie gp48, durch die Proteasomen abgebaut werden.

Für verschiedene Proteine wurden Mechanismen beschrieben, die zu einer Retention des gegebenen Proteins im ER bzw. in einem späteren Kompartiment des sekretorischen Transportweges führen (Ellgaard et al., 1999). Sehr häufig handelt es sich hierbei um Proteine, welche den Kriterien der ER Qualitätskontrolle nicht entsprechen, weil sie entweder nicht korrekt gefaltet, glykosyliert oder nicht zu einem vollständigen Proteinkomplex assembliert vorliegen. Solche Proteine, die ihre Funktion in der Zelle nicht erfüllen können, werden in vielen Fällen der ER-assoziierten Degradation (ERAD) unterworfen, d.h. durch das Translokon (Sec61p) zurück in das Cytosol transportiert und durch das Proteasom abgebaut (Cresswell and Hughes, 1997). Interessant ist die Frage, wie die Zelle missgefaltete oder unvollständig assemblierte Proteine erkennt und deren weiteren Transport im sekretorischen Weg verhindert. Für verschiedene Proteine werden unterschiedliche Retentionsmechanismen beschrieben. Der am häufigsten beobachtete Mechanismus der primären Qualitätskontrolle ist die Assoziation neusynthetisierter Proteine mit ER-Chaperonen und Enzymen, wie z.B. BiP, Calnexin, Calretikulin, GRP94, Proteindisulfidisomerase (PDI), Erp57 und Erp72. Diese Proteine assistieren nicht nur bei der Faltung und bei der Zusammenlagerung von Proteinen, sondern sie sind auch in der Lage, unreife Proteine im ER zurückzuhalten.

Calnexin erkennt monoglukosylierten Oligosaccharidseitenketten von unvollständig gefalteten Proteinen und retentiert sie im ER (Cannon and Helenius, 1999; Hammond et al., 1994). Auch

Endo H-sensitives gp48 wird in Assoziation mit Calnexin gefunden. Calnexin stellt deshalb einen Kandidaten dar, der nichtassembliertes gp48 erkennt und an einem Weitertransport im sekretorischen Weg hindert.

Weitere Mechanismen der ER-Retention von unreifen Proteinen sind die Verknüpfung der Proteine über Disulfidbrücken mit PDI und ERp72 (Reddy and Corley, 1998; Sitia et al., 1990), und die Aggregation der Proteine in größere Komplexe, in die z.T. auch BiP und Calnexin eingeschlossen sind (Kellokumpu et al., 1997; Kim et al., 1992; Marks et al., 1995). Bisher gibt es keine Hinweise, dass nichtassembliertes gp48 in solche hochmolekularen Aggregate eingeschlossen ist oder über Disulfidbrücken mit PDI retentiert wird.

Ein ganz anderer Mechanismus, der gp48, welches nicht mit MHC-Klasse-I-Molekülen komplexiert ist, im ER retentieren und zur ERAD führen könnte, beruht auf Peptidsignalen im Transmembransegment. Bei diesen Peptidsignalen handelt es sich um polare Seitengruppen in der hydrophoben Transmembrandomäne, die erst nach Maskierung durch das Transmembransegment eines anderen Proteins einen Export aus dem ER erlauben. Das erste beschriebene Beispiel hierfür sind geladene Aminosäuren in der TcR α -Kette, die ein Signal für selektive Degradation der α -Kette darstellen, wenn die restlichen TcR-Untereinheiten nicht zur Verfügung stehen (Bonifacino et al., 1990). Des Weiteren wurde für die Ig μ Kette gezeigt, dass zwei hydrophile Seitengruppen im Transmembransegment in der Abwesenheit der leichten Kette ER-Retention vermitteln (Stevens et al., 1994).

MCMV gp48 enthält 6 und gp34 8 polare Aminosäuren in seiner Transmembrandomäne. Diese Aminosäuren könnten, wenn sie nicht durch Seitengruppen der Transmembrandomäne eines anderen Proteins, maskiert werden, zur Retention und folgenden Degradation von gp48 und gp34 führen. Da für gp48 und für gp34 eine Assoziation mit MHC-Klasse-I-Komplexen als Voraussetzung für ER-Export postuliert wird, müsste die Transmembrandomäne der MHC-Klasse-I schweren Kette in der Lage sein, das putative Retentionsignal von gp48 bzw. gp34 zu verdecken. Mutationsanalysen der Transmembranregion von gp34 und gp48 könnten zeigen, ob es sich bei den polaren Aminosäuren tatsächlich um diese Signale handelt, die die Retention vermitteln. Durch den Austausch der Transmembrandomäne der MHC-Klasse-I schweren Kette, könnte überprüft werden, ob ihre Gegenwart erst einen ER-Export der gp34 bzw. gp48/MHC-Klasse-I-Moleküle erlaubt.

4.4 Die MHC-Klasse-I-bindende Domäne von gp48 im Vergleich mit anderen viralen MHC-Klasse-I-bindenden Proteinen

Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit gp48-Mutanten haben gezeigt, dass eine Verkürzungsmutante ohne cytoplasmatischen Anteil an MHC-Klasse-I-Moleküle bindet, eine Mutante, der zusätzlich die Transmembranregion deletiert ist, jedoch nicht. Die Fusion der

luminalen Domäne von gp48 an eine heterologe Transmembranregion demonstriert, dass die luminal Domäne für die Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle ausreicht, wenn sie membranverankert vorliegt. Eine Beteiligung der Transmembranregion an der MHC-Klasse-I Bindung kann daher ausgeschlossen werden. Vermutlich sorgt die Membranverankerung für eine höhere lokale Konzentration und korrekte Polarität und Konformation von gp48 in Membrannähe, wo sich auch MHC-Klasse-I-Moleküle befinden, sowie für eine verlängerte Aufenthaltsdauer der Moleküle im ER, was eine Assoziation der Bindungspartner erleichtern könnte.

Eine N-terminale FLAG-Markierung führte zu einem Funktionsverlust von gp48. Es ist anzunehmen, dass durch die FLAG-Markierung die MHC-Klasse-I-bindende Domäne so verändert wurde, dass das Protein eine Assoziation mit dem MHC-Molekül nicht mehr eingehen kann. Der cytoplasmatische Anteil des Proteins scheint nicht betroffen zu sein, da er von dem monoklonalen Antikörper CROMA231 erkannt wird. Aus diesem Befund kann aber nicht gefolgert werden, dass der N-Terminus von gp48 bei der MHC-Bindung beteiligt ist, da generelle Strukturveränderungen durch die Fusion mit dem relativ sauren FLAG-Epitop nicht ausgeschlossen werden können.

Mit dem Kaninchenserum m06-2, welches eine Peptidepitop aus dem luminalen Anteil von gp48 erkennt, ist eine Ko-Immünpräzipitation von MHC-Klasse-I-Molekülen nicht möglich. Vermutlich wird das Epitop durch die Assoziation mit dem MHC-Klasse-I-Molekül verdeckt, oder die Antikörperbindung führt zur Dissoziation des gp48/MHC-Klasse-I-Komplexes. Eine Mutationsanalyse des m06-2 Epitops könnte zeigen, ob dieser Teil von gp48 tatsächlich bei der Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle involviert ist. Negative Befunde solcher Mutationsanalysen, d.h. Verlust der Komplexbildung, müssen jedoch mit Vorsicht interpretiert werden, da selbst bei Punktmutationen umfangreiche strukturelle Änderungen des Proteins nicht ausgeschlossen werden können.

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Mutationsanalysen kann das MCMV Glykoprotein gp48 in eine Domäne, die lysosomalen Transport vermittelt, und eine MHC-Klasse-I-bindende Domäne geteilt werden.

Auf der Seite der MHC-Klasse-I-Moleküle ist für die gp48/MHC-Klasse-I-Komplexbildung eine Assoziation der MHC-Klasse-I schweren Kette mit β_2M Voraussetzung, eine Peptidbeladung der MHC-Moleküle jedoch nicht. Ob die Klasse I-Moleküle für die gp48 Bindung einen cytosolischen Anteil und/oder eine Transmembranregion besitzen müssen, ist noch nicht bekannt. Es kann aber angenommen werden, dass eine Membranverankerung, auch wenn durch eine heterologe Transmembranregion vermittelt, notwendig ist, um MHC und gp48 Moleküle in räumliche Nähe zu bringen. Neben allen getesteten murinen MHC-Klasse-I-Molekülen wirkt gp48 auch auf HLA-

Moleküle, zumindest die in 293-Zellen exprimierten Klasse I-Moleküle HLA-A2 und -B7. Die Untersuchung weiterer HLA-Allele und MHC-Klasse-I-Moleküle weiterer Spezies steht aus.

Das am besten charakterisierte virale Protein, welches mit dem MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg interferiert, ist das E3/19K Protein von Adenovirus (siehe 1.1.4.3). E3/19K bindet früh nach seiner Synthese über seine luminale Domäne selektiv mit unterschiedlicher Affinität verschiedene HLA-Allele und einzelne murine H-2-Moleküle (Beier et al., 1994; Burgert and Kvist, 1987). Wie gp48 bindet E3/19K über seine luminale Domäne MHC-Moleküle, wobei sich zwei intramolekulare Disulfidbrücken als absolut essenziell erwiesen haben (Sester and Burgert, 1994). Die Bindung ist unabhängig von der Glykosylierung der einzelnen Komponenten und benötigt keine weiteren zellulären Kofaktoren (Burgert and Kvist, 1987; Levy and Kvist, 1990). Im Gegensatz zu MCMV gp48 kann E3/19K auch an MHC schwere Ketten binden, die nicht mit β_2M assoziiert sind (Cox et al., 1990; Kämpe et al., 1983; Severinsson and Peterson, 1985). Durch die Analyse chimärer MHC-Klasse-I-Moleküle, die sich aus Domänen von E3/19K-sensitiven und E3/19K-resistenten MHC-Klasse-I-Allelen zusammensetzen, konnte festgestellt werden, dass die $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domänen der MHC schweren Ketten essenzielle Strukturen für die Bindung durch E3/19K darstellen (Beier et al., 1994; Burgert and Kvist, 1987). Erst wenn ein MHC-Klasse-I-Allel gefunden wird, welches sich resistent gegenüber MCMV gp48 verhält, könnte ebenfalls über chimäre MHC-Klasse-I-Moleküle getestet werden, welche MHC-Domäne essenziell für eine Bindung an gp48 ist.

Das humane Cytomegalovirus kodiert für drei Glykoproteine, für die eine Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle nachgewiesen werden konnte (siehe 1.1.4.3 und 1.1.4.4). Das US3 Protein, welches über eine transiente Interaktion MHC-Klasse-I-Komplexe im ER retentiert, bindet an β_2M -assoziierte, peptidbeladene MHC-Moleküle (Ahn et al., 1996; Jones et al., 1996). Welche Domänen der MHC-Klasse-I-Moleküle bzw. des viralen Proteins für eine Interaktion notwendig sind, ist unbekannt. Die Genprodukte von *US2* und *US11* vermitteln unabhängig voneinander die Dislokation von neusynthetisierten schweren Kette aus dem ER durch das Translokon ins Cytosol, wo die schweren Ketten nach Deglykosylierung durch das Proteasom abgebaut werden. *US2* und *US11* unterscheiden sich nicht in der Destabilisierung verschiedener HLA-Antigene (Wiertz et al., 1996a; Wiertz et al., 1996b), zeigen jedoch unterschiedliche Allelpräferenzen unter den murinen MHC-Klasse-I-Molekülen (Machold et al., 1997). Eine Mutationsanalyse dieser viralen Proteine steht noch aus. Für die MHC-Klasse-I schwere Kette konnte aber gezeigt werden, dass der cytoplasmatische Anteil für die Dislokation ins Cytosol essenziell ist, für die Bindung an das *US2* bzw. *US11* Genprodukt jedoch nicht (Story et al., 1999). Deshalb können bei *US2* und *US11*, wie bei gp48, die Substraterkennung und die Transportfunktion zwei unabhängigen Proteindomänen zugeordnet werden.

Wie gp48 ist das MCMV *m04* kodierte Glykoprotein gp34, ein Genprodukt aus der MCMV *m02* Genfamilie. Es bindet im ER nur an β_2 M-assoziierte MHC-Klasse-I-Moleküle und führt sie nicht in die Lysosomen, sondern begleitet sie bis an die Plasmamembran (siehe 1.3.2.2). Bemerkenswerterweise besitzt gp34 in seinem cytosolischen Anteil kein di-Leucin-Motiv, wie es in den Genprodukten von *m06*, *m08*, *m09* und *m10* der *m02* Genfamilie gefunden wird. Im Gegensatz zu gp48 bindet gp34 nicht alle murinen MHC-Klasse-I-Moleküle; von den bisher untersuchten Klasse I-Molekülen werden K^b , D^b , L^d und D^d von gp34 gebunden, K^d aber nicht (Kleijnen et al., 1997). Für gp48 wurde gezeigt, dass die luminal Domäne für die Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle ausreicht, für gp34 noch nicht. Es ist jedoch anzunehmen, dass es bei der gp34/Klasse I-Interaktion ähnlich ist, da ein Fusionsprotein aus der luminalen Domäne und der Transmembranregion von gp34 und dem cytoplasmatischen Anteil von gp48 an MHC-Klasse-I-Moleküle binden kann. Gp48 und gp34 sind auf Aminosäureebene zu 53% ähnlich und zu 27% identisch. Zusätzlich teilen sie zusammen mit *m02*, *m03* und *m05* die Sequenz CXLXXC L/P W/R ϕ und mit *m03* und *m05* NAXWXX E/H W ϕ (wobei X eine beliebige und ϕ eine hydrophobe Aminosäure repräsentiert). Aufgrund dieser Sequenzhomologien bzw. Konsensussequenzen, kann nicht auf MHC-Klasse-I-bindende Domänen geschlossen werden. Es wäre aber trotzdem interessant herauszufinden, ob die MHC-Klasse-I-bindenden Eigenschaften von gp34 und gp48 auf gemeinsamen Strukturen zurückgeführt werden können.

4.5 Vergleich der MHC-spezifischen Funktion von MCMV gp48 mit der von HIV Nef

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene MHC-spezifische Funktion von MCMV gp48 weist die meisten Gemeinsamkeiten mit der von HIV-1 Nef auf (siehe 1.1.4.5). Eine detailliertere Analyse offenbart jedoch, dass gp48 und Nef über unterschiedliche Mechanismen die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Plasmamembran modulieren. Im Gegensatz zu gp48 ist Nef ein cytoplasmatisches Phosphoprotein, welches nur nach Myristylierung membranverankert vorliegen kann. Neben der MHC-Klasse-I-Modulation vermittelt Nef die Endozytose von CD4 Molekülen und verändert verschiedene Signaltransduktionswege in der Zelle (Harris, 1996; Oldridge and Marsh, 1998; Peter, 1998). Wie gp48 enthält HIV-1 Nef ein di-Leucin-Motiv, für das gezeigt werden konnte, dass es an die β -Untereinheit von AP-1 und AP-2 Komplexen bindet (Greenberg et al., 1998). Die N-terminale Domäne von Nef des HIV-2 und SIV enthält jeweils ein YXX ϕ Motiv, welches für die Interaktion mit den μ -Untereinheiten von AP-1 und AP-2 entscheidend ist (Le Gall et al., 1998; Piguet et al., 1998). Diese Transportmotive sind jedoch nur für die Endozytose von CD4, nicht aber von MHC-Klasse-I-Molekülen relevant. Für die CD4 Modulation ist des weiteren ein di-Leucin-Motiv im cytoplasmatischen Anteil von CD4 (Aiken et al., 1994), und auf der Seite von Nef eine CD4 Bindestelle (Iafate et al., 1997) und ein saures

Dipeptid essenziell, welches durch die Assoziation mit β -COP in Endosomen als lysosomales Transportmotiv dient (Piguet et al., 1999).

Für die Modulation von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Plasmamembran sind andere Eigenschaften von Nef erforderlich als für die Modulation von CD4. Im Gegensatz zu gp48 und der Nef-vermittelten Endozytose von CD4 ist für die MHC-spezifische Funktion keine direkte Interaktion zwischen Nef und MHC nachgewiesen worden. Auf der Seite der MHC-Moleküle ist ein YXX ϕ Motiv im cytoplasmatischen Anteil essenziell (Le Gall et al., 1998). Dieses YXX ϕ Motiv ist in der im Exon 6 kodierten Domäne des MHC-Klasse-I-Allels lokalisiert und ist deshalb nicht identisch mit dem Motiv, welches im Exon 7 kodierten Bereich liegt und für die spontane Endozytose von MHC-Klasse-I-Molekülen in T-Zellen verantwortlich ist (Vega and Strominger, 1989). Dahingegen benötigt Nef eine Region, die SH3-Domänen binden kann, und eine Reihe saurer Aminosäuren (Greenberg et al., 1998). Welche Rolle diese zwei Motive bei der Nef-vermittelten MHC-Modulation einnehmen ist noch unbekannt. Das Schicksal der internalisierten MHC-Klasse-I-Moleküle scheint vom Zelltyp abhängig zu sein. In lymphoiden Zellen verursacht Nef eine gesteigerte Endozytose von Klasse-I-Molekülen, die zunächst in Endosomen akkumulieren und daraufhin in einem Ammoniumchlorid-sensitiven Kompartiment abgebaut werden (Schwartz et al., 1996). In *nef*-transfizierten Fibroblasten dagegen, akkumulieren internalisierte MHC-Klasse-I-Moleküle in Vesikeln am TGN, die mit AP-1 Komplexen kolokalisieren (Greenberg et al., 1998). Wie Nef letztendlich zur Endozytose von MHC-Klasse-I-Molekülen führt und den Transport in Endosomen bzw. Lysosomen vermittelt ist noch unklar. Es wird jedoch postuliert, dass Nef eine Verbindung zwischen dem YXX ϕ Motiv im cytoplasmatischen Anteil der MHC-Moleküle und den Adaptorkomplexen herstellt, welche die Ausbildung von Clathrin-*coated* Vesikeln initiieren, indem sie cytosolische Transportsignale von Proteinen erkennen und gleichzeitig Clathrin rekrutieren. Dabei könnte Nef die Adaptorkomplexe so verändern, dass sie das YXX ϕ Signal der MHC-Klasse-I schweren Kette erkennen, oder Nef könnte ein Bindeglied zwischen Klasse-I-Molekülen und Adaptorkomplexen darstellen.

Der Vergleich der MHC-Klasse-I Modulation durch HIV Nef mit der durch MCMV gp48 verdeutlicht, dass die MHC-Klasse-I-Phänotypen der beiden immunmodulatorischen Proteine nahezu identisch sind. In beiden Fällen verläuft der Transport der MHC-Klasse-I-Moleküle im sekretorischen Weg bis zum Golgi ungestört. Erreichen sie jedoch den *trans*-Golgi bzw. die Plasmamembran werden sie entweder direkt in die Endosomen umgeleitet oder endozytiert, und letztendlich in den Lysosomen abgebaut. Die Analyse der molekularen Mechanismen, die zu dieser MHC-Klasse-I-Degradation führen, demonstriert jedoch, dass die Wirkungsweisen der beiden viralen Proteine - schon allein aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Proteine - deutlich voneinander abzugrenzen sind.

4.6 MCMV gp48 im Viruskontext

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Aufklärung des Mechanismus, über den MCMV gp48 die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran verhindert. Nahezu alle Experimente wurden mit Zellen durchgeführt, die gp48 nach stabiler Transfektion des isolierten Gens *m06* permanent exprimieren. Für die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die der MHC-Klasse-I-spezifischen Funktion von gp48 zugrunde liegen, sind diese stabilen Zelllinien in vielen Fällen geeignet. Die Situation in *m06*-Transfektanten kann jedoch die nach Infektion von Zellen mit MCMV nicht widerspiegeln. Erstens wird nach MCMV-Infektion gp48 nicht von Infektionsbeginn an synthetisiert, und zweitens werden nach Infektion, neben gp48, weitere Proteine, die mit dem MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg interferieren, exprimiert.

Experimente mit MCMV-Mutanten haben gezeigt, dass eine Infektion mit einem Virus, welches *m06* exprimiert, zu einem raschen Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran führt. Dieser Verlust kann nicht allein dadurch erklärt werden, dass nach Infektion keine neusynthetisierten MHC-Moleküle die Zellmembran erreichen, weil sie durch gp40 retentiert oder durch gp48 in die Lysosomen geleitet werden. Die Kinetik des MHC-Klasse-I Verlustes ist schneller als die Halbwertszeit der oberflächenresidenten Moleküle, wie sie nach Cycloheximidbehandlung gemessen werden kann. Dahingegen entspricht die MHC-Klasse-I Abnahme nach Infektion mit einer Mutante, bei der nur *m06* deletiert ist, der Kinetik nach Cycloheximidbehandlung. Diese relativ langsam ablaufende Kinetik ist auf die *m152*-vermittelte Retention von MHC-Klasse-I-Molekülen im ERGIC zurückzuführen. Aufgrund dieser Ergebnisse muss gefolgert werden, dass nach Infektion gp40 bei der Modulation von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zellmembran nicht beteiligt ist. Im Gegensatz dazu ist gp48 für die MCMV-Funktion essenziell, die die an der Zellmembran lokalisierten MHC-Klasse-I-Moleküle aktiv entfernt. Es ist noch nicht klar, wie gp48 die oberflächenresidenten MHC-Klasse-I-Moleküle moduliert, da in *m06*-Transfektanten gezeigt werden konnte, dass gp48 nur in Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen das ER verlässt und durch den Golgi-Apparat zu den Lysosomen transportiert wird (vgl. 4.3). Diese zwei Beobachtungen stehen im Widerspruch zueinander. Unter der Voraussetzung, dass die Interpretation der experimentellen Befunde korrekt ist, gibt es folgende Möglichkeiten den Widerspruch zu klären: Unter Infektionsbedingungen könnte gp48 in der Lage sein, auch ohne Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle das ER zu verlassen und an die Zellmembran transportiert zu werden. Dabei könnten ein oder mehrere Virusproteine gp48, welches nicht mit MHC-Molekülen assoziiert ist, stabilisieren und einen Transport im sekretorischen Weg erlauben. Außerdem gibt es die Möglichkeit, dass nach MCMV-Infektion gp48 allein oder im Komplex mit anderen Proteinen zur Endozytose und zum lysosomalen Abbau von

oberflächenresidenten MHC-Klasse-I-Molekülen führt, selbst aber nicht sofort in den Lysosomen abgebaut wird. Durch mehrmaligen Transport von den Endosomen an die Zellmembran und wiederholten Rücktransport durch Endozytose, wie es für verschiedene Rezeptoren beschrieben ist (Mellman, 1996), könnte gp48 MHC-Klasse-I-Moleküle von der Oberfläche entfernen.

In Transfektanten konnte gezeigt werden, dass die Expression von *m06* die Halbwertszeit neusynthetisierter MHC-Klasse-I-Moleküle verkürzt. Ob dies auch für neusynthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle nach MCMV-Infektion der Fall ist, ist nicht klar. Die publizierten *pulse-chase* Experimente nach MCMV-Infektion zeigen alle eine allelunabhängige Retention von Endo H-sensitiven MHC-Klasse-I-Molekülen, ergeben jedoch hinsichtlich einer Degradation der Klasse-I-Moleküle kein einheitliches Bild. In einer primären Fibroblasten-Zelllinie ist ein geringer Verlust von K^b-Molekülen (Kleijnen et al., 1997), und in BALB.SV-Fibroblasten eine etwas deutlichere Degradation von K^d-Molekülen nach wt-MCMV-Infektion, jedoch nicht nach Infektion mit Δ MS94.5 (Δ *m152*) beschrieben (Thäle et al., 1995). Des Weiteren ist eine Abnahme von L^d, nicht aber von D^d-Molekülen in BALB.SV-Fibroblasten nach wt-MCMV Infektion gezeigt (Del Val et al., 1992). *Pulse-chase* Experimente nach Infektion mit wt-MCMV und MCMV Δ *m06* müssen zeigen, ob gp48 auch unter Infektionsbedingungen zur Degradation von MHC-Klasse-I-Molekülen führt, und wenn ja, ob eventuell eine Allelpräferenz gegeben ist, oder ob die Effizienz der Klasse-I-Modulation vom Zelltyp abhängig ist.

Neben der Analyse von Genfunktionen *in vitro* bietet MCMV die Möglichkeit, die Rolle von einzelnen Genen *in vivo* zu untersuchen. Für *m152* konnte bereits gezeigt werden, dass ein *m152*-defizientes Virus stark attenuiert ist und in verschiedenen Organen signifikant geringere Titer erreicht (Krmptotic et al., 1999). In Mäusen jedoch, die für β_2 M, CD8-Moleküle oder T-Zellen depletiert sind, ist der Unterschied in der Replikation zu wt-MCMV aufgehoben. Diese Ergebnisse beweisen, dass das *m152* Genprodukt immunmodulatorische Funktion besitzt und infizierte Zellen vor einem Angriff durch CD8⁺ Zellen schützt.

Mit Hilfe von Virusmutanten, bei denen gezielt einzelne oder mehrere Immunevasionsgene deletiert sind, wird es möglich sein die Rolle von *m04*, *m06* und *m152* *in vitro* als auch *in vivo* zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Cytomegaloviren, die, wie alle Herpesviren, persistente Infektionen in ihren Wirten etablieren, haben Mechanismen entwickelt, um einer Elimination durch das Immunsystem zu entgehen. Alle bisher untersuchten Herpesviren interferieren mit der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation. Murines Cytomegalovirus verfügt neben der *m152*-vermittelten Retention von MHC-Klasse-I-Molekülen im ERGIC/*cis*-Golgi über weitere Mechanismen, den Transport von MHC-Klasse-I-Molekülen an die Plasmamembran zu verhindern (Thäle et al., 1995; Ziegler et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte das MCMV Glykoprotein gp48, welches durch das in der *early* Phase der Infektion exprimierte Gen *m06* kodiert wird, als weiteres MHC-Klasse-I-reaktives Protein identifiziert werden. Zellen, die das Gen *m06* stabil exprimieren, weisen eine stark verminderte Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf, und sind dadurch in ihrer Fähigkeit, Peptide gegenüber CD8⁺ cytotoxischen T-Zellen zu präsentieren, beschränkt. Das Typ I Transmembranprotein gp48 bindet im Endoplasmatischen Retikulum (ER) an neu-synthetisierte β_2 -Mikroglobulin-assoziierte MHC-Klasse-I-Moleküle, wobei eine Peptidbeladung der Komplexe nicht erforderlich ist. Die gp48/MHC-Klasse-I-Komplexe verlassen das ER und werden durch den Golgi-Apparat in ein Lamp-1⁺ Kompartiment, höchst wahrscheinlich in die Lysosomen, transportiert und dort rasch abgebaut. Die Degradation ist sensitiv gegenüber verschiedenen endosomalen/lysosomalen Inhibitoren. Eine Hemmung führt zur Akkumulation von komplex glykosylierten MHC-Klasse-I- und gp48 Molekülen, die sich resistent gegenüber Endoglykosidase H verhalten. Gp48 Moleküle, welche nicht mit MHC-Klasse-I-Komplexen assoziiert sind, werden nicht in die Lysosomen transportiert, sondern durch das Proteasom abgebaut.

Das virale Glykoprotein gp48 kann in eine MHC-Klasse-I-bindende Domäne und eine Transportdomäne unterteilt werden. Der gerichtete Transport der MHC-Klasse-I/gp48-Komplexe in die Lysosomen wird durch ein di-Leucin-Motiv im cytoplasmatischen Anteil von gp48 vermittelt. Eine Deletion des gesamten cytoplasmatischen Anteils bzw. eine Mutation des Membran-proximalen di-Leucin-Motivs führt zur Wiederherstellung der MHC-Klasse-I Oberflächenexpression, ohne die gp48/MHC-Klasse-I-Assoziation zu beeinflussen. Für die Bindung von gp48 an MHC-Klasse-I-Moleküle ist die luminale Domäne ausreichend, sofern diese in membranverankerter Form vorliegt.

Die direkte Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle über die luminale Domäne von MCMV gp48 und der gerichtete Transport, vermittelt über ein di-Leucin-Motiv im cytoplasmatischen Anteil von gp48, stellt einen neuartigen viralen Immunevasionsmechanismus dar, die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation zu verhindern.

6 Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

β_2 M	β_2 -Mikroglobulin
aa	Aminosäure(n)
Abb	Abbildung
ActD	Actinomycin D
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
AP	Adaptor Protein
APC	<i>antigen presenting cell</i>
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial arteficial chromosome</i>
BiP	<i>immunoglobulin binding protein</i>
bp	Basenpaare
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD-M6PR	<i>cation-dependend mannose 6-phosphate receptor</i>
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
CI-M6PR	<i>cation-independend mannose 6-phosphate receptor</i>
CMV	Cytomegalovirus
CNX	Calnexin
COP	<i>coatomer</i> Proteine
cpm	<i>counts per minute</i>
CROMA	<i>croatia monoclonal antibody</i>
CRT	Calreticulin
CT	<i>cytoplasmic tail</i>
CTL	cytotoxische T Lymphozyten
Cys	Cystein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	<i>early</i>
EBNA	<i>Epstein-Barr virus nuclear antigen</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
ECT	Ektodomäne
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
ERGIC	ER-Golgi <i>intermediate compartment</i>
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (Durchflußzytometer)
Fc	konstantes Fragment von Immunglobulin
FITC	Fluoresceinisocyanat
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
GVHD	<i>graft versus host disease</i>
h	Stunde(n)
H-2	murines MHC-Klasse-I

hc	MHC-Klasse-I schwere Kette (<i>heavy chain</i>)
HCMV	humanes CMV
HHV-8	Humanes Herpesvirus-8
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HOAc	Essigsäure
HSV	Herpes simplex Virus
ICP	<i>infected cell protein</i>
IE	<i>immediate-early</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
Ii	MHC-Klasse-II invariante Kette
kDa	Kilodalton
KIR	NK <i>inhibitory receptors</i>
KOAc	Kaliumacetat
L	<i>late</i>
Limp	lysosomales integrales Membranprotein
LIR	<i>leucocyte immunoglobulin-like receptors</i>
lg	Logarithmus mit der Basis 10
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MCMV	murines CMV
MEF	murine embryonale Fibroblasten
Met	Methionin
MetOH	Methanol
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MWM	Molekulargewichtsmarker
N	Asparagin
NK	natürliche Killer
Nt	Nukleotid
ORF	Offenes Leseraster
p.i.	<i>post infection</i>
PAA	Phosphonoessigsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pfu	<i>plaque forming units</i>
Pgp-1 (CD44)	Phagozyten-Glykoprotein-1
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
pp	Phosphoprotein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SP	Signalpeptid
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
TcR	T-Zell-Rezeptor
TGN	<i>trans-Golgi network</i>
TM	Transmembranregion
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Einheiten
U _L	<i>unique long region</i>
U _S	<i>unique short region</i>
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen

VZV	Varizella zoster Virus
w/o	ohne
w/v	Gewicht/Volumen
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 Literaturverzeichnis

- Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P.A., Yang, Y., and Früh, K. (1996). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 10990-10995.
- Ahn, K., Gruhler, A., Galocha, B., Jones, T.R., Wiertz, E.J., Ploegh, H.L., Peterson, P.A., Yang, Y., and Früh, K. (1997). The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity*. *6*, 613-621.
- Aiken, C., Konner, J., Landau, N.R., Lenburg, M.E., and Trono, D. (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* *76*, 853-864.
- Beier, D.C., Cox, J.H., Vining, D.R., Cresswell, P., and Engelhard, V.H. (1994). Association of human class I MHC alleles with the adenovirus E3/19K protein. *J Immunol* *152*, 3862-3872.
- Blobel, G. and Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* *67*, 835-851.
- Bonifacino, J.S., Cosson, P., and Klausner, R.D. (1990). Colocalized transmembrane determinants for ER degradation and subunit assembly explain the intracellular fate of TCR chains. *Cell* *63*, 503-513.
- Bottomley, M.J., Lo, S.P., and Driscoll, P.C. (1999). Endocytosis: How dynamin sets vesicles PHree! *Curr Biol* *9*, R301-R304
- Böttger, E.C. (1988). High-efficiency generation of plasmid cDNA libraries using electrotransformation. *Biotechniques* *6*, 878-880.
- Britt, W. and Alford, C. (1996). Cytomegalovirus. In *Fields Virology*. B. Fields, D.M. Knipe, and P. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott-Raven), pp. 2493-2523.
- Burgert, H.G. and Kvist, S. (1985). An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens. *Cell* *41*, 987-997.
- Burgert, H.G. and Kvist, S. (1987). The E3/19K protein of adenovirus type 2 binds to the domains of histocompatibility antigens required for CTL recognition. *EMBO J* *6*, 2019-2026.
- Calvin, N.M. and Hanawalt, P.C. (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol.* *170*, 2796-2801.
- Cannon, K.S. and Helenius, A. (1999). Trimming and readdition of glucose to N-linked oligosaccharides determines calnexin association of a substrate glycoprotein in living cells. *J Biol Chem* *274*, 7537-7544.
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchinson III, C.A., Kouzarides, T., Martignetti, J.A., Preddie, E., Satchwell, S.C., Tomlinson, P., Weston, K.M., and Barrell, B.G. (1990). Analysis of the Protein-Coding Content of the

- Sequence of Human Cytomegalovirus Strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* 154, 125-169.
- Clague, M.J., Urbe, S., Aniento, F., and Gruenberg, J. (1994). Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem* 269, 21-24.
- Cohen, G.B., Gandhi, R.T., Davis, D.M., Mandelboim, O., Chen, B.K., Strominger, J.L., and Baltimore, D. (1999). The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity*, 10, 661-671.
- Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., and Hsu, M.L. (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity*, 7, 273-282.
- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65, 801-847.
- Cox, J.H., Yewdell, J.W., Eisenlohr, L.C., Johnson, P.R., and Bennink, J.R. (1990). Antigen presentation requires transport of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum. *Science* 247, 715-718.
- Cozzarelli, N.R. (1977). The mechanism of action of inhibitors of DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* 46, 641-668.
- Cresswell, P. and Hughes, E.A. (1997). Protein degradation: the ins and outs of the matter. *Curr Biol* 7, R552-R555
- Dasgupta, J.D., Watkins, S., Slayter, H., and Yunis, E.J. (1988). Receptor-like nature of class I HLA: endocytosis via coated pits. *J Immunol* 141, 2577-2580.
- Degen, E. and Williams, D.B. (1991). Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *J Cell Biol* 112, 1099-1115.
- Del Val, M., Hengel, H., Häcker, H., Hartlaub, U., Ruppert, T., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. (1992). Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J Exp Med* 176, 729-738.
- Del Val, M., Münch, K., Reddehase, M.J., and Koszinowski, U.H. (1989). Presentation of CMV immediate-early antigen to cytolytic T lymphocytes is selectively prevented by viral genes expressed in the early phase. *Cell* 58, 305-315.
- Del Val, M., Schlicht, H.J., Ruppert, T., Reddehase, M.J., and Koszinowski, U.H. (1991a). Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein. *Cell* 66, 1145-1153.
- Del Val, M., Schlicht, H.J., Volkmer, H., Messerle, M., Reddehase, M.J., and Koszinowski, U.H. (1991b). Protection against lethal cytomegalovirus infection by a recombinant vaccine containing a single nonameric T-cell epitope. *J Virol* 65, 3641-3646.
- Dietrich, J., Kastrup, J., Nielsen, B.L., Odum, N., and Geisler, C. (1997). Regulation and function of the CD3 γ DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J Cell Biol* 138, 271-281.

- Ebeling, A., Keil, G.M., Knust, E., and Koszinowski, U.H. (1983). Molecular cloning and physical mapping of murine cytomegalovirus DNA. *J Virol* 47, 421-433.
- Ellgaard, L., Molinari, M., and Helenius, A. (1999). Setting the standards: Quality control in the secretory pathway. *Science* 286, 1882-1888.
- Falk, K., Rötzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H.G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296.
- Farrell, H.E., Vally, H., Lynch, D.M., Fleming, P., Shellam, G.R., Scalzo, A.A., and Davis, P.N. (1997). Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo [see comments]. *Nature* 386, 510-514.
- Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J., and Schreiber, S.L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268, 726-731.
- Fourie, A.M. and Yang, Y. (1998). Molecular requirements for assembly and intracellular transport of class I major histocompatibility complex molecules. *Curr Top Microbiol Immunol* 232, 49-74.
- Früh, K., Ahn, K., Djaballah, H., Sempe, P., van Endert, P.M., Tampe, R., Peterson, P.A., and Yang, Y. (1995). A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* 375, 415-418.
- Ganem, D. (1997). KSHV and Kaposi's sarcoma: the end of the beginning? *Cell* 91, 157-160.
- Gilbert, M.J., Riddell, S.R., Plachter, B., and Greenberg, P.D. (1996). Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* 383, 720-722.
- Godowski, P.J. and Knipe, D.M. (1986). Transcriptional control of herpesvirus gene expression: gene functions required for positive and negative regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 256-260.
- Greenberg, M., DeTulleo, L., Rapoport, I., Skowronski, J., and Kirchhausen, T. (1998). A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr Biol* 8, 1239-1242.
- Greenberg, M.E., Iafrate, A.J., and Skowronski, J. (1998). The SH3 domain-binding surface and an acidic motif in HIV-1 Nef regulate trafficking of class I MHC complexes. *EMBO J* 17, 2777-2789.
- Gromme, M., Uytdehaag, F.G., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R.S., Kenter, M.J., Tulp, A., Verwoerd, D., and Neefjes, J. (1999). Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10326-10331.
- Hammond, C., Braakman, I., and Helenius, A. (1994). Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 913-917.
- Harris, M. (1996). From negative factor to a critical role in virus pathogenesis: the changing fortunes of Nef. *J Gen Virol* 77, 2379-2392.

- Hebert, D.N., Foellmer, B., and Helenius, A. (1995). Glucose trimming and reglycosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* *81*, 425-433.
- Heemels, M.T. and Ploegh, H. (1995). Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* *64*, 463-491.
- Heilker, R., Spiess, M., and Crottet, P. (1999). Recognition of sorting signals by clathrin adaptors. *Bioessays* *21*, 558-567.
- Hengel, H., Koopmann, J.O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hämmerling, G.J., Koszinowski, U.H., and Momburg, F. (1997). A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity* *6*, 623-632.
- Hengel, H., Reusch, U., Gutermann, A., Ziegler, H., Jonjic, S., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. (1999). Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse. *Immunol Rev* *168*, 167-176.
- Hill, A., Jugovic, P., York, I., Russ, G., Bennink, J., Yewdell, J., Ploegh, H., and Johnson, D. (1995). Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* *375*, 411-415.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* *30*, 405-439.
- Honess, R.W. and Roizman, B. (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* *14*, 8-19.
- Honess, R.W. and Roizman, B. (1975). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *72*, 1276-1280.
- Höning, S., Griffith, J., Geuze, H.J., and Hunziker, W. (1996). The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp-1 mediates sorting into Golgi-derived clathrin-coated vesicles. *EMBO J* *15*, 5230-5239.
- Höning, S., Sandoval, I.V., and von Figura, K. (1998). A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J* *17*, 1304-1314.
- Hudson, J.B., Misra, V., and Mosmann, T.R. (1976). Cytomegalovirus infectivity: analysis of the phenomenon of centrifugal enhancement of infectivity. *Virology* *72*, 235-243.
- Hughes, E.A., Hammond, C., and Cresswell, P. (1997). Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 1896-1901.
- Iafate, A.J., Bronson, S., and Skowronski, J. (1997). Separable functions of Nef disrupt two aspects of T cell receptor machinery: CD4 expression and CD3 signaling. *EMBO J* *16*, 673-684.
- Jackson, M.R., Nilsson, T., and Peterson, P.A. (1990). Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* *9*, 3153-3162.

- Jackson, M.R., Song, E.S., Yang, Y., and Peterson, P.A. (1992). Empty and peptide-containing conformers of class I major histocompatibility complex molecules expressed in *Drosophila melanogaster* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 12117-12121.
- Jentsch, S. and Schlenker, S. (1995). Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell* *82*, 881-884.
- Johnson, D.C. and Hill, A.B. (1998). Herpesvirus evasion of the immune system. *Curr Top Microbiol Immunol* *232*, 149-177.
- Johnson, K.F. and Kornfeld, S. (1992a). A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function. *J Biol Chem* *267*, 17110-17115.
- Johnson, K.F. and Kornfeld, S. (1992b). The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi. *J Cell Biol* *119*, 249-257.
- Jondal, M., Schirmbeck, R., and Reimann, J. (1996). MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* *5*, 295-302.
- Jones, T.R., Wiertz, E.J., Sun, L., Fish, K.N., Nelson, J.A., and Ploegh, H.L. (1996). Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 11327-11333.
- Jonjic, S., Del Val, M., Keil, G.M., Reddehase, M.J., and Koszinowski, U.H. (1988). A nonstructural viral protein expressed by a recombinant vaccinia virus protects against lethal cytomegalovirus infection. *J Virol* *62*, 1653-1658.
- Jonjic, S., Pavic, I., Lucin, P., Rukavina, D., and Koszinowski, U.H. (1990). Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J Virol* *64*, 5457-5464.
- Jonjic, S., Pavic, I., Polic, B., Crnkovic, I., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. (1994). Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med* *179*, 1713-1717.
- Kämpe, O., Bellgrau, D., Hämmerling, U., Lind, P., Pääbo, S., Severinsson, L., and Peterson, P.A. (1983). Complex formation of class I transplantation antigens and a viral glycoprotein. *J Biol Chem* *258*, 10594-10598.
- Kärre, K. and Welsh, R.M. (1997). Viral decoy vetoes killer cell. *Nature* *386*, 446-447.
- Keller, P. and Simons, K. (1997). Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J Cell Sci* *110*, 3001-3009.
- Kellokumpu, S., Suokas, M., Risteli, L., and Myllyla, R. (1997). Protein disulfide isomerase and newly synthesized procollagen chains form higher-order structures in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* *272*, 2770-2777.
- Kelly, R.B. (1999). Deconstructing membrane traffic. *Trends Cell Biol* *9*, 29-33.
- Kerkau, T., Bacik, I., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., Hunig, T., Schimpl, A., and Schubert, U. (1997). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J Exp Med* *185*, 1295-1305.

- Kim, P.S., Bole, D., and Arvan, P. (1992). Transient aggregation of nascent thyroglobulin in the endoplasmic reticulum: relationship to the molecular chaperone, BiP. *J Cell Biol* *118*, 541-549.
- Kirchhausen, T., Bonifacino, J.S., and Riezman, H. (1997). Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr Opin Cell Biol* *9*, 488-495.
- Kleijnen, M.F., Huppa, J.B., Lucin, P., Mukherjee, S., Farrell, H., Campbell, A.E., Koszinowski, U.H., Hill, A.B., and Ploegh, H.L. (1997). A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J* *16*, 685-694.
- Koszinowski, U.H. (1991). Molecular aspects of immune recognition of cytomegalovirus. *Transplant Proc* *23*, 70-3, discussion.
- Krmpotic, A., Messerle, M., Crnkovic-Mertens, I., Polic, B., and Koszinowski, U.H. (1999). The immunoevasive function encoded by the mouse cytomegalovirus gene *m152* protects the virus against T cell control in vivo. *J Exp Med* *190*, 1285-1295.
- Le Borgne, R. and Hoflack, B. (1998a). Mechanisms of protein sorting and coat assembly: insights from the clathrin-coated vesicle pathway. *Curr Opin Cell Biol* *10*, 499-503.
- Le Borgne, R. and Hoflack, B. (1998b). Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* *1404*, 195-209.
- Le Gall, S., Erdtmann, L., Benichou, S., Berlioz, T.C., Liu, L., Benarous, R., Heard, J.M., and Schwartz, O. (1998). Nef interacts with the μ subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity* *8*, 483-495.
- Leong, C.C., Chapman, T.L., Bjorkman, P.J., Formankova, D., Mocarski, E.S., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (1998). Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog. *J Exp Med* *187*, 1681-1687.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., and Masucci, M.G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12616-12621.
- Levy, F. and Kvist, S. (1990). Co-expression of the human HLA-B27 class I antigen and the E3/19K protein of adenovirus-2 in insect cells using a baculovirus vector. *Int Immunol* *2*, 995-1002.
- Lindquist, J.A., Jensen, O.N., Mann, M., and Hämmerling, G.J. (1998). ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *EMBO J* *17*, 2186-2195.
- Lucin, P., Jonjic, S., Messerle, M., Polic, B., Hengel, H., and Koszinowski, U.H. (1994). Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon-gamma and tumour necrosis factor. *J Gen Virol* *75*, 101-110.
- Lucin, P., Pavic, I., Polic, B., Jonjic, S., and Koszinowski, U.H. (1992). Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *J Virol* *66*, 1977-1984.

- Machold, R.P., Wiertz, E.J., Jones, T.R., and Ploegh, H.L. (1997). The HCMV gene products US11 and US2 differ in their ability to attack allelic forms of murine major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chains. *J Exp Med* 185, 363-366.
- Maizel, J.V. (1969). Acrylamide gelelectrophoresis of proteins and nucleic acids. In *Fundamental Techniques in Virology*. K. Habel and N.P. Salzman, eds. (New York: N.P. Academic Press), pp. 334-362.
- Marks, M.S., Germain, R.N., and Bonifacino, J.S. (1995). Transient aggregation of major histocompatibility complex class II chains during assembly in normal spleen cells. *J Biol Chem* 270, 10475-10481.
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 575-625.
- Michalek, M.T., Grant, E.P., Gramm, C., Goldberg, A.L., and Rock, K.L. (1993). A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* 363, 552-554.
- Momburg, F. and Hämmerling, G.J. (1998). Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv Immunol* 68, 191-256.
- Momburg, F., Koch, N., Moller, P., Moldenhauer, G., Butcher, G.W., and Hämmerling, G.J. (1986). Differential expression of Ia and Ia-associated invariant chain in mouse tissues after in vivo treatment with IFN-gamma. *J Immunol* 136, 940-948.
- Momburg, F., Neefjes, J.J., and Hämmerling, G.J. (1994). Peptide selection by MHC-encoded TAP transporters. *Curr Opin Immunol* 6, 32-37.
- Ohe, Y., Zhao, D., Saijo, N., and Podack, E.R. (1995). Construction of a novel bovine papillomavirus vector without detectable transforming activity suitable for gene transfer. *Hum Gene Ther* 6, 325-333.
- Oldridge, J. and Marsh, M. (1998). Nef--an adaptor adaptor? *Trends Cell Biol* 8, 302-305.
- Orange, J.S. and Biron, C.A. (1996). Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 156, 4746-4756.
- Orange, J.S., Wang, B., Terhorst, C., and Biron, C.A. (1995). Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J Exp Med* 182, 1045-1056.
- Pavic, I., Polic, B., Crnkovic, I., Lucin, P., Jonjic, S., and Koszinowski, U.H. (1993). Participation of endogenous tumour necrosis factor alpha in host resistance to cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* 74, 2215-2223.
- Peter, F. (1998). HIV nef: the mother of all evil? *Immunity* 9, 433-437.
- Piguet, V., Chen, Y.L., Mangasarian, A., Foti, M., Carpentier, J.L., and Trono, D. (1998). Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the μ chain of adaptor complexes. *EMBO J* 17, 2472-2481.

- Piguet, V., Gu, F., Foti, M., Demaurex, N., Gruenberg, J., Carpentier, J.L., and Trono, D. (1999). Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of β -COP in endosomes. *Cell* 97, 63-73.
- Ploegh, H.L. (1998). Viral strategies of immune evasion. *Science* 280, 248-253.
- Polic, B., Hengel, H., Krmpotic, A., Trgovcich, J., Pavic, I., Luccaronin, P., Jonjic, S., and Koszinowski, U.H. (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J Exp Med* 188, 1047-1054.
- Pond, L., Kuhn, L.A., Teyton, L., Schutze, M.P., Tainer, J.A., Jackson, M.R., and Peterson, P.A. (1995). A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J Biol Chem* 270, 19989-19997.
- Rammensee, H.G. (1995). Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* 7, 85-96.
- Rawlinson, W.D., Farrell, H.E., and Barrell, B.G. (1996). Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol* 70, 8833-8849.
- Reddehase, M.J., Jonjic, S., Weiland, F., Mutter, W., and Koszinowski, U.H. (1988). Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *J Virol* 62, 1061-1065.
- Reddehase, M.J., Mutter, W., Münch, K., Bühring, H.J., and Koszinowski, U.H. (1987). CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol* 61, 3102-3108.
- Reddy, P.S. and Corley, R.B. (1998). Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *Bioessays* 20, 546-554.
- Reusch, U. Lokalisation und isolierte Expression eines early Glykoproteins des murinen Cytomegalovirus. 1995. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen.
- Reyburn, H.T., Mandelboim, O., Vales, G.M., Davis, D.M., Pazmany, L., and Strominger, J.L. (1997). The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 386, 514-517.
- Rock, K.L. (1996). A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* 17, 131-137.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.
- Roizman, B. (1996). Herpesviridae. In *Fields Virology*. B. Fields, D.M. Knipe, and P. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott-Raven), pp. 2221-2230.
- Rothman, J.E. and Wieland, F.T. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272, 227-234.
- Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T., and Cresswell, P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5, 103-114.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual.* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sandoval, I.V., Arredondo, J.J., Alcalde, J., Gonzalez, N.A., Vandekerckhove, J., Jimenez, M.A., and Rico, M. (1994a). The residues Leu(Ile)475-Ile(Leu, Val, Ala)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes. *J Biol Chem* 269, 6622-6631.
- Sandoval, I.V. and Bakke, O. (1994b). Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol* 4, 292-297.
- Scalzo, A.A., Fitzgerald, N.A., Wallace, C.R., Gibbons, A.E., Smart, Y.C., Burton, R.C., and Shellam, G.R. (1992). The effect of the Cmv-1 resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J Immunol* 149, 581-589.
- Scalzo, A.A., Lyons, P.A., Fitzgerald, N.A., Forbes, C.A., Yokoyama, W.M., and Shellam, G.R. (1995). Genetic mapping of Cmv1 in the region of mouse chromosome 6 encoding the NK gene complex-associated loci Ly49 and musNKR-P1. *Genomics* 27, 435-441.
- Schmid, S.L., McNiven, M.A., and De Camilli, P. (1998). Dynamin and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol* 10, 504-512.
- Schutze, M.P., Peterson, P.A., and Jackson, M.R. (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 13, 1696-1705.
- Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., and Heard, J.M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 2, 338-342.
- Seglen, P.O. (1983). Inhibitors of lysosomal function. *Methods Enzymol.* 96, 737-764.
- Sester, M. and Burgert, H.G. (1994). Conserved cysteine residues within the E3/19K protein of adenovirus type 2 are essential for binding to major histocompatibility complex antigens. *J Virol* 68, 5423-5432.
- Severinsson, L. and Peterson, P.A. (1985). Abrogation of cell surface expression of human class I transplantation antigens by an adenovirus protein in *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Biol* 101, 540-547.
- Sitia, R., Neuberger, M., Alberini, C., Bet, P., Fra, A., Valetti, C., Williams, G., and Milstein, C. (1990). Developmental regulation of IgM secretion: the role of the carboxy-terminal cysteine. *Cell* 60, 781-790.
- Smith, J.D., Myers, N.B., Gorka, J., and Hansen, T.H. (1993). Model for the in vivo assembly of nascent Ld class I molecules and for the expression of unfolded Ld molecules at the cell surface. *J Exp Med* 178, 2035-2046.

- Solheim, J.C., Carreno, B.M., Smith, J.D., Gorka, J., Myers, N.B., Wen, Z., Martinko, J.M., Lee, D.R., and Hansen, T.H. (1993). Binding of peptides lacking consensus anchor residue alters H-2Ld serologic recognition. *J Immunol* *151*, 5387-5397.
- Stevens, T.L., Blum, J.H., Foy, S.P., Matsuuchi, L., and DeFranco, A.L. (1994). A mutation of the mu transmembrane that disrupts endoplasmic reticulum retention. Effects on association with accessory proteins and signal transduction. *J Immunol* *152*, 4397-4406.
- Story, C.M., Furman, M.H., and Ploegh, H.L. (1999). The cytosolic tail of class I MHC heavy chain is required for its dislocation by the human cytomegalovirus US2 and US11 gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 8516-8521.
- Sugita, M. and Brenner, M.B. (1995). Association of the invariant chain with major histocompatibility complex class I molecules directs trafficking to endocytic compartments. *J Biol Chem* *270*, 1443-1448.
- Tarentino, A.L. and Plummer-TH, J. (1994). Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enzymol.* *230*, 44-57.
- Tay, C.H., Welsh, R.M., and Brutkiewicz, R.R. (1995). NK cell response to viral infections in beta 2-microglobulin-deficient mice. *J Immunol* *154*, 780-789.
- Tector, M., Zhang, Q., and Salter, R.D. (1997). Beta 2-microglobulin and calnexin can independently promote folding and disulfide bond formation in class I histocompatibility proteins. *Mol Immunol* *34*, 401-408.
- Thäle, R., Lucin, P., Schneider, K., Eggers, M., and Koszinowski, U.H. (1994). Identification and expression of a murine cytomegalovirus early gene coding for an Fc receptor. *J Virol* *68*, 7757-7765.
- Thäle, R., Szepan, U., Hengel, H., Geginat, G., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. (1995). Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class I molecule transport. *J Virol* *69*, 6098-6105.
- Tomazin, R., Hill, A.B., Jugovic, P., York, I., van Endert, P.M., Ploegh, H.L., Andrews, D.W., and Johnson, D.C. (1996). Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. *EMBO J* *15*, 3256-3266.
- Townsend, A. and Bodmer, H. (1989). Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* *7*, 601-624.
- Tse, D.B. and Pernis, B. (1984). Spontaneous internalization of Class I major histocompatibility complex molecules in T lymphoid cells. *J Exp Med* *159*, 193-207.
- van Leeuwen, J. and Kearse, K.P. (1996). Deglycosylation of N-linked glycans is an important step in the dissociation of calreticulin-class I-TAP complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 13997-14001.
- Vega, M.A., Segui, R.B., Garcia, J.A., Cales, C., Rodriguez, F., Vanderkerckhove, J., and Sandoval, I.V. (1991). Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J Biol Chem* *266*, 16818-16824.

- Vega, M.A. and Strominger, J.L. (1989). Constitutive endocytosis of HLA class I antigens requires a specific portion of the intracytoplasmic tail that shares structural features with other endocytosed molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2688-2692.
- Volkmer, H., Bertholet, C., Jonjic, S., Wittek, R., and Koszinowski, U.H. (1987). Cytolytic T lymphocyte recognition of the murine cytomegalovirus nonstructural immediate-early protein pp89 expressed by recombinant vaccinia virus. *J Exp Med* 166, 668-677.
- von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* 14, 4683-4690.
- Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J., and Ploegh, H.L. (1996a). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 84, 769-779.
- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A., and Ploegh, H.L. (1996b). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384, 432-438.
- York, I.A., Roop, C., Andrews, D.W., Riddell, S.R., Graham, F.L., and Johnson, D.C. (1994). A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. *Cell* 77, 525-535.
- Zhang, Q., Tector, M., and Salter, R.D. (1995). Calnexin recognizes carbohydrate and protein determinants of class I major histocompatibility complex molecules. *J Biol Chem* 270, 3944-3948.
- Ziegler, H., Thäle, R., Lucin, P., Muranyi, W., Flohr, T., Hengel, H., Farrell, H., Rawlinson, W., and Koszinowski, U.H. (1997). A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* 6, 57-66.

8 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Reusch, U., Muranyi, W., Lucin, P., Burgert, H.G., Hengel, H., and Koszinowski, U.H. (1999). A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J* 18, 1081-1091.

Hengel, H., Reusch, U., Gutermann, A., Ziegler, H., Jonjic, S., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. (1999). Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse. *Immunol Rev* 168, 167-176.

Weitere Publikationen:

Hengel, H., Reusch, U., Geginat, G., Holtappels, R., Ruppert, T., Hellebrand, E., and Koszinowski, U.H. (2000). Macrophages escape inhibition of major histocompatibility complex class I dependent antigen presentation by cytomegalovirus. *J Virol* 74, 7861-7868.

Benz, C., Reusch, U., Muranyi, W., Brune, W., and Hengel, H. (2000). Distinct regulation of major histocompatibility class I expression in human cytomegalovirus-infected hepatobiliary and intestinal cells. Submitted.

Pawelec, G., Baumgartner, P., Rehbein, A., Reusch, U., and Schaudt, K. (1990). Cytokine regulation of the balance between alloindifferent and allospecific suppressor induction in mixed lymphocyte cultures. *Transplantation* 49, 615-619.

Pawelec, G., Balko, I., Reusch, U., and Rehbein, A. (1988). Regulation of allospecific suppressive cell generation in vitro. *Immunol Lett* 19, 121-126.

9 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. U.H. Koszinowski für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Herrn Prof. L. Gürtler danke ich für die Übernahme der Doktorvaterschaft bei der Biologischen Fakultät .

Bei Thomas Ruppert, Irena Crnkovic-Mertens, Pero Lucin und Stipan Jonjic bedanke ich mich für die Herstellung und Reinigung von Peptidantiseren und Ascites. Irena Crnkovic-Mertens und Markus Wagner danke ich für die Bereitstellung rekombinanter Mauscytomegaloviren. Für die Hilfe bei der Durchführung des ⁵¹Cr-Freisetzungsversuche bedanke ich mich bei Maren Eggers und Hartmut Hengel. Ein besonderer Dank gilt Walter Muranyi für die tatkräftige Unterstützung bei der Immunfluoreszenzfärbungen und konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie. Bei Christine Benz, Albrecht Gruhler und Stefanie Kliche bedanke ich mich für die Korrektur des Manuskriptes.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeitern am Genzentrum für das freundliche Arbeitsklima und Unterstützung, insbesondere bei Christine Benz, Anja Bubeck, Andreas Bültmann, Irena Crnkovic-Mertens, Andreas Elsing, Stefanie Kliche, Walter Muranyi, Markus Wagner, Peter Weinzierl und Heike Ziegler.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und F.S., ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

10 Lebenslauf

Name:	Uwe Reusch	
Geburtsdatum:	01.07.1967	
Geburtsort:	Gomadingen, Kreis Reutlingen	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Familienstand:	ledig	
Schulbildung:	1974-1978	Grundschule in Gomadingen
	1978-1987	Gymnasium in Münsingen
	Juni 1987	Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst:	1987-1989	Medizinische Universitätsklinik Tübingen
Studium:	1989-1995	Studium der Biologie (Diplom) an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
	WS 1993/94	Diplomprüfungen
	Mai 1994 - April 1995	Diplomarbeit bei Herrn Prof. U.H. Koszinowski am Hygiene-Institut, Abteilung Virologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Doktorarbeit:	Mai 1995	Beginn der Doktorarbeit bei Herrn Prof. U.H. Koszinowski am Hygiene-Institut, Abteilung Virologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
	September 1996	Fortsetzung der Doktorarbeit bei Herrn Prof. U.H. Koszinowski am Max-von-Pettenkofer Institut, Abteilung Virologie, am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ort/Datum

Unterschrift