

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

**MCMV interferiert mit der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation:  
Untersuchungen zur Speziesspezifität und zur Interaktion der viralen  
Effektormoleküle während der Virusinfektion**

vorgelegt von  
Anja Gutermann  
25.10.2001

Erstgutachterin: Prof. Elisabeth H. Weiß  
Zweitgutachter: Prof. Dirk Eick  
Sondergutachter: Prof. Ulrich H. Koszinowski

Tag der mündlichen Prüfung : 11.03.2002

---

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>4</b>
1.1	<i>Die Familie der Herpesviren .....</i>	4
1.2	<i>Struktur der Herpesviren .....</i>	5
1.3	<i>Vermehrung der Herpesviren.....</i>	6
1.4	<i>Übertragung und Verbreitung des Zytomegalievirus beim Menschen.....</i>	7
1.5	<i>Krankheitssymptome beim Menschen nach einer Zytomegalievirusinfektion .....</i>	8
1.6	<i>Therapie von Zytomegalievirusinfektionen beim Menschen.....</i>	8
1.7	<i>MCMV als Modell .....</i>	8
1.8	<i>Immunantwort gegen virale Erreger .....</i>	9
1.9	<i>Immunantwort gegen MCMV.....</i>	10
1.10	<i>MHC-Klasse-I-vermittelte Antigenpräsentation .....</i>	11
1.11	<i>Antigenpräsentation unter MCMV-Infektion .....</i>	13
1.12	<i>Inhibition der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation .....</i>	13
1.13	<i>MCMV interferiert mit der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation.....</i>	14
1.14	<i>Fragestellung der Arbeit.....</i>	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1	<i>Material.....</i>	18
2.1.1	<i>Reagenzien.....</i>	18
2.1.2	<i>Antikörper.....</i>	19
2.2	<i>Klonierung der Plasmide .....</i>	20
2.2.1	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR).....</i>	20
2.2.2	<i>DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen.....</i>	21
2.2.3	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel.....</i>	21
2.2.4	<i>Ligation .....</i>	21
2.2.5	<i>Übersicht der verwendeten Plasmide .....</i>	22
2.2.6	<i>Herstellung chemisch kompetenter Bakterien mit Hilfe von CaCl<sub>2</sub> .....</i>	22
2.2.7	<i>Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....</i>	23
2.2.8	<i>Präparation von Plasmid-DNA .....</i>	23
2.3	<i>Eukaryontische Zellen.....</i>	24
2.3.1	<i>Zelllinien.....</i>	24
2.3.2	<i>Zellkultur .....</i>	24
2.3.3	<i>Stabile Transfektion mittels eines Calcium-Phosphat-Präzipitats .....</i>	25
2.4	<i>Vaccinia-Viren.....</i>	26
2.4.1	<i>Vaccinia-Viren.....</i>	26
2.4.2	<i>Herstellung eines Vaccinia-Virusstocks.....</i>	27
2.4.3	<i>Bestimmung des Titers eines Vaccinia-Virusstocks.....</i>	27
2.5	<i>Radio-Immunpräzipitation.....</i>	28
2.6	<i>Endoglykosidase H (Endo H) – Verdau.....</i>	29
2.7	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....</i>	29

2.8	<i>Fluoreszenzzytometrie</i> .....	30
2.9	<i>Konfokale Laserscanmikroskopie</i> .....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
3.1	<i>Transportinhibition von MHC-Klasse-I-Molekülen von Mensch und Maus durch m06/gp48 und m152/gp40</i> .....	33
3.1.1	Das MCMV-Protein m06/gp48 inhibiert MHC-Klasse-I-Moleküle von Mensch und Maus im Transport .....	33
3.1.2	Humane MHC-Klasse-I-Moleküle werden durch m152/gp40 nicht im Transport gehemmt.....	37
3.2	<i>Mögliche Ursachen für die speziesspezifische Hemmung des Transports von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m152/gp40</i> .....	44
3.2.1	Die $\beta_2m$ -Spezies spielt keine Rolle bei der speziesspezifischen Inhibition des Transports durch m152/gp40.....	45
3.2.2	Die zusätzliche Glykosylierung in MHC-Klasse-I-Molekülen der Maus ist nicht Grund für die Inhibition des Transports durch m152/gp40 .....	51
3.3	<i>Welcher Bereich der schweren Kette von MHC-Klasse-I-Molekülen wird von m152/gp40 erkannt ?</i> .....	55
3.3.1	Die luminale Domäne von MHC-Klasse-I-Molekülen wird von m152/gp40 zurückgehalten .....	55
3.3.2	Die $\alpha_1$ -Domäne der schweren Kette ist wichtig für den m152/gp40-Effekt....	62
3.4	<i>Untersuchung der immunmodulierenden Genprodukte m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 während der Virusinfektion</i> .....	66
3.4.1	Neben m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 kodiert MCMV für keine weiteren Gene mit Einfluss auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression....	67
3.4.2	M06/gp48 und m152/gp40 sind die einzigen MCMV-Genprodukte, welche die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen reduzieren.....	70
3.4.3	Die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression verschiedener Allele ist nach MCMV-Infektion unterschiedlich stark reduziert.....	70
3.4.4	Die Deletion von m06/gp48 verringert deutlich die Retention von MHC-Klasse-I-Molekülen, wohingegen die Deletion von m152/gp40 die Retention der MHC-Klasse-I-Moleküle nur minimal aufheben kann .....	71
3.4.5	M04/gp34 behindert die Retention von H-2K <sup>b</sup> .....	77
3.4.6	M04/gp34 kann der Oberflächenreduktion von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m152/gp40 entgegenwirken, aber kaum der Oberflächenreduktion durch m06/gp48 .....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>81</b>
4.1	<i>Untersuchungen zur Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m06/gp48 und m152/gp40</i> .....	82
4.2	<i>Die viralen Proteine m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 beeinflussen sich während der Virusinfektion</i> .....	87
4.3	<i>Ausblick</i> .....	92
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>93</b>

<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>105</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>106</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>107</b>

# 1 EINLEITUNG

Als Erreger von Infektionskrankheiten bei Mensch, Tier und Pflanze konnten Viren aufgrund ihrer geringen Größe lange Zeit nicht entdeckt werden. Mit einem Durchmesser von 20 – 300 nm waren sie in den um 1900 entwickelten Lichtmikroskopen nicht erkennbar und man vermutete ursprünglich „Gifte“ als Ursache für Erkrankungen, die wir heute als Viruserkrankungen kennen. Daraus leitet sich der Name „Virus“ (lateinisch „Gift, Saft, Schleim“) ab. Der erste Nachweis eines „ultrafiltrierbaren“ Agens, das damit deutlich unter Bakteriengröße liegt, gelang 1892 Dimitri I. Iwanowski für das Tabakmosaikvirus und wurde 1898 vom Nachweis des Erregers der Maul-und-Klauenseuche von Friedrich Loeffler und Paul Frosch gefolgt. Als erstes humanpathogenes Virus wurde das Gelbfiebervirus 1900 von Walter Reed nachgewiesen und in den folgenden zwanzig Jahren wurden weitere human- und tierpathogene Viren entdeckt, sowie Bakteriophagen: Viren, die Bakterien befallen können. Unter den bis heute bekannten humanpathogenen Viren gehören die Herpesviren zu einer der erfolgreichsten Familien, da sie weltweit einen hohen Durchseuchungsgrad der Bevölkerung erreichen.

## 1.1 Die Familie der Herpesviren

Infektionen mit Herpesviren findet man beim Menschen und vielen Wirbeltierarten und kennt heute zirka 100 verschiedene Vertreter der Familie der Herpesviren. Die verschiedenen Herpesviren rufen unterschiedliche Symptome bei einer Infektion des Menschen hervor. Der Name der Herpesviren leitet sich ab von der kriechenden Ausbreitung des Hautausschlags bei Herpes-simplex-Virusinfektionen (griechisch *herpein* : kriechen). Neben dem Herpes-simplex-Virus verursacht auch das Varicella-Zoster-Virus sehr charakteristische Hautveränderungen. Das Epstein-Barr-Virus verursacht ebenfalls eine sehr typische Erkrankung und ist an der Bildung von Tumoren beteiligt (Burkitt-Lymphom, Nasopharynxkarzinom). Die Primärinfektion mit Zytomegalievirus (*Cytomegalovirus* – CMV) verläuft beim Menschen meist inapparent.

Herpesviren besitzen folgende gemeinsame Eigenschaften :

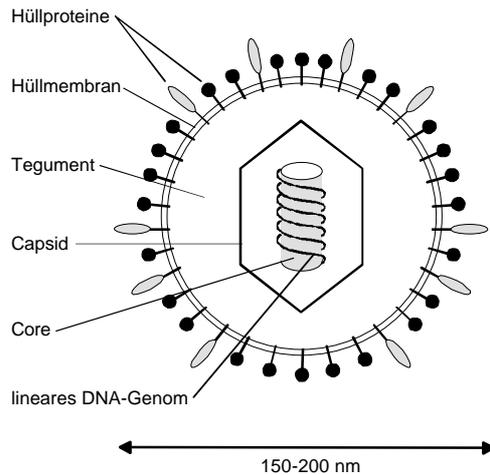
- a) Sie besitzen eine ähnliche Partikelmorphologie.
- b) Die Synthese der viralen DNA findet im Zellkern statt und die Produktion von Viruspartikeln während des lytischen Zyklus geht mit der Zerstörung der infizierten Zelle einher.

- c) Sie besitzen eine Vielzahl von Enzymen, die am Nukleinsäuremetabolismus, der DNA-Synthese und der Prozessierung von Proteinen beteiligt sind.
- d) Herpesviren haben die Fähigkeit, in einem Latenz genannten Zustand in Zellen des Wirts zu persistieren. Während der Latenz werden keine infektiösen Viruspartikel produziert. Dabei ist das Virus für das Immunsystem des Wirts nicht erkennbar, bis eine Reaktivierung stattfindet (Roizman, 1996).

Aufgrund der Pathogenität, des Zelltropismus und der Vermehrungseigenschaften unterscheidet man drei Unterfamilien :  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Herpesviren. Die  $\alpha$ -Herpesviren besitzen ein breites Wirtsspektrum und einen kurzen Replikationszyklus. Sie persistieren im Wirtsorganismus meist in den Nervenzellen der Ganglien. Zu den  $\alpha$ -Herpesviren zählen das Herpes-simplex-Virus 1 und 2 (HSV-1, HSV-2) und das Varicella-Zoster-Virus (VZV). Die  $\beta$ -Herpesviren hingegen besitzen ein enges Wirtsspektrum, einen langen Replikationszyklus und sind latent in Endothelzellen und in Vorläuferzellen des Monozyten-Makrophagen-Systems zu finden. Zu den  $\beta$ -Herpesviren gehören das Zytomegalievirus (*Cytomegalovirus* – CMV) und das humane Herpesvirus 6 und 7 (HHV-6 und -7). Der Name „Zytomegalie“ leitet sich ab von der Größenzunahme infizierter Zellen, die nukleäre und zytoplasmatische Einschlüsse aufweisen. Das Wirtsspektrum der  $\gamma$ -Herpesviren ist auf die Familie oder Ordnung des natürlichen Wirts begrenzt. Die Viren dieser Gruppe infizieren B- und T-Lymphozyten. Zu den  $\gamma$ -Herpesviren werden das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das humane Herpesvirus 8 (HHV-8) gezählt (Roizman, 1996).

## 1.2 Struktur der Herpesviren

Die Viruspartikel der Herpesviren haben einen Durchmesser von 150-200 nm (Abb. 1). Das Partikel besteht aus einem Kern (*core*), in dem die lineare, doppelsträngige DNA mit einer fibrillären Proteinmatrix assoziiert ist. Die DNA ist umgeben von einem ikosaedrischen Capsid. Der Bereich zwischen Capsid und der Hüllmembran wird als Tegument bezeichnet und beinhaltet eine elektronenoptisch unstrukturiert erscheinende Proteinmatrix. Einige Proteine haben während der frühen Phase des Replikationszyklus eine regulatorische Funktion. Die Hüllmembran umgibt das Viruspartikel und enthält virale Glykoproteine (Roizman, 1996).



**Abb. 1 Schematische Darstellung eines Herpesvirions.**

Das Herpesvirion besteht aus der linearen, doppelsträngigen DNA, die mit dem Kern (core) assoziiert ist und von einem ikosaedrischen Capsid umgeben wird. Der Raum zwischen der Hüllmembran, in die virale Glykoproteine eingelagert sind, und dem Capsid wird als Tegument bezeichnet und enthält verschiedene regulatorisch aktive Proteine.

### 1.3 Vermehrung der Herpesviren

Die produktive Infektion (lytischer Infektionszyklus) der Herpesviren besteht aus dem Eindringen der Virionen in die Zelle und der Vermehrung und Morphogenese im Zellkern. Dabei wird schließlich die infizierte Zelle getötet. Die Adsorption des Virions findet über Oberflächenrezeptoren statt und hat ein Verschmelzen der Virus- und Wirtszellmembran zur Folge. Das Capsid und das Tegument gelangen ins Zytoplasma und das Capsid wird an den Mikrotubuli zum Kern transportiert. Durch eine Kernpore gelangt das Virus-Genom ins Nukleoplasma und zirkularisiert sich zu einem Episom. Ist das Virus-Genom im Zellkern, so beginnt die Synthese der *immediate early* (IE)-Gene. Die daraus gebildeten regulatorischen Proteine aktivieren wiederum die *early* (E)-Gene, deren Produkte für die DNA-Replikation wichtig sind. Die DNA-Synthese findet nach dem *rolling circle*-Mechanismus statt. Dabei entsteht ein einziger DNA-Strang, der mehrere Einheiten des Virusgenoms enthält (Konkatemere). Während der DNA-Synthese werden auch die *late* (L)-Gene transkribiert. Diese kodieren für Glykoproteine, die für die Bildung und den Zusammenbau (*assembly*) von Capsid, Tegument und Hüllmembran wichtig sind. Die Verpackung der Viruspartikel findet im Zellkern statt. Capsid, DNA und Tegumentproteine assemblieren mit der inneren Kernmembran, diese stülpt sich aus und das Viruspartikel wird über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert (Mocarski, 1996). Das Genom der Zytomegalieviren besitzt mit zirka 230 kb eine sehr hohe Kodierungskapazität und kann potentiell zirka 200 Genprodukte bilden.

Herpesviren persistieren nach der Primärinfektion lebenslang im Menschen. In diesem Zustand der Latenz liegt die Virus-DNA als Episom vor und es werden nur wenige virale

Proteine synthetisiert. Das Virus-Genom wird parallel mit dem Genom der Zelle repliziert und kann durch Stress, Immunsuppression und andere Faktoren reaktiviert werden. Der genaue Mechanismus der Reaktivierung ist bisher unbekannt (Mocarski, 1996).

#### **1.4 Übertragung und Verbreitung des Zytomegalievirus beim Menschen**

Die Durchseuchungsrate mit dem humanem CMV (HCMV) schwankt in der Bevölkerung zwischen 40 und 80%. Dabei ist die Durchseuchung in Ländern der dritten Welt generell höher (bis zu 100%). Die Übertragung von HCMV findet durch Speichel, seltener Muttermilch, sowie Schmierkontamination mit virushaltigem Blut oder Urin statt. Viren sind auch in Zervixsekret und Samenflüssigkeit nachweisbar, so dass eine sexuelle Übertragung möglich ist. Neben diesen häufigen Übertragungswegen kann auch eine Infektion durch Organtransplantate oder Blutpräparate erfolgen. Innerhalb der Gruppe der Transplantatempfänger werden immerhin 60 - 90 % der Patienten durch Organe seropositiver Spender infiziert (Britt und Alford, 1996; Ho, 1990). Ist ein Organismus mit CMV infiziert, so breiten sich die Viren über den Blutstrom in freier Form oder zellgebunden aus, wobei wahrscheinlich mononukleäre Phagozyten und zirkulierende Endothelzellen Träger des Virus sind (Stoddart et al., 1994). Das Zytomegalievirus infiziert Zellen der Speicheldrüse, Niere und Nebenniere, aber auch der Leber, Milz, Lunge und des Knochenmarks (Britt und Alford, 1996; Plachter et al., 1996). Den Zustand der Latenz etabliert CMV in Endothelzellen und in Vorläuferzellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (Fish et al., 1998; Hahn et al., 1998; Soderberg et al., 1997). Der genaue Mechanismus, der die Einleitung und Erhaltung der Latenz bewirkt, ist bisher unbekannt (Prosch et al., 1999; Soderberg-Naucler und Nelson, 1999).

Eine große Rolle spielt die Übertragung des Virus von der Mutter auf das Kind. Die Übertragung kann während der Schwangerschaft (congenital), während der Geburt (perinatal aufgrund vorhandener Viren im Geburtskanal oder Schmierinfektion) oder nach der Geburt (postnatal durch Schmierinfektion oder über die Muttermilch) stattfinden (Alford et al., 1979). Es werden ca. 1% aller Kinder congenital infiziert, davon zeigen ca. 19 % Symptome, d.h. ca. 0,2% aller Kinder sind durch eine Infektion mit HCMV geschädigt (Ho, 1990). Dies betrifft insbesondere Föten, deren Mutter während der Schwangerschaft eine Primärinfektion durchmacht. Daher wird vermutet, dass eine bereits vor der Schwangerschaft seropositive Mutter dem Fötus einen gewissen Schutz vor einer CMV-Infektion übertragen kann (Stagno et al., 1986).

### **1.5 Krankheitssymptome beim Menschen nach einer Zytomegalievirusinfektion**

Die Primärinfektion mit Zytomegalievirus verläuft beim Menschen meist inapparent. Bei immunsupprimierten oder immundefizienten Personen jedoch (z.B. Transplantatempfänger, Tumor- und AIDS-Patienten) kann eine Zytomegalievirusinfektion Leberschädigungen, Chorioretinitis, gastrointestinale Ulcerationen und selten eine Enzephalitis hervorrufen (Meyers, 1984; Smith und Brennessel, 1994). Eine CMV-Pneumonie ist die häufigste Todesursache bei AIDS-Patienten und Knochenmarktransplantatempfängern (Enright et al., 1993; Moskowitz et al., 1985). Von den Krankheitssymptomen congenital infizierter Föten sind am häufigsten eine Hepatosplenomegalie, Thrombozytopenie, Hörschäden und Entwicklungsdefekte aufgrund der Infektion des zentralen Nervensystems, sowie Schädigungen der Netzhaut mit möglicher Erblindung (Boppana et al., 1992; Britt und Alford, 1996; Hanshaw und Dudgeon, 1978).

### **1.6 Therapie von Zytomegalievirusinfektionen beim Menschen**

Ansatzpunkte für eine Therapie von Zytomegalievirusinfektionen bieten sich in der DNA-Synthese des Virus, die durch die Gabe von Ganciclovir oder Foscarnet verhindert werden kann. Ganciclovir ist ein Nukleosidanalogue und wird von der viralen Proteinkinase UL97 phosphoryliert und in die DNA eingebaut, gefolgt von einem Abbruch der DNA-Synthese (Drew, 1991; Littler et al., 1992; Sullivan et al., 1992). Foscarnet (Phosphonoameisensäure) bindet an die virale DNA-Polymerase und verhindert während der DNA-Synthese die Bindung der Nukleoside an die Polymerase (Crumpacker, 1992). Die Verabreichung dieser Präparate führt allerdings zu Nebenwirkungen.

Ein in seiner Wirksamkeit umstrittener prophylaktischer Therapie-Ansatz besteht in der Gabe von Immunglobulinpräparaten bei Verdacht auf perinatale Infektionen oder bei Transplantatempfängern (Metselaar et al., 1989).

### **1.7 MCMV als Modell**

Das Wirtsspektrum von Zytomegalieviren ist auf eine Spezies beschränkt, was bedeutet, dass das Maus-CMV (MCMV) nur Mäuse infizieren kann, wogegen das humane CMV (HCMV) nur den Menschen infiziert. Die HCMV-Infektion kann also in keinem Tiermodell untersucht werden. Da jedoch der Verlauf einer Infektion und die Etablierung der Latenz bei MCMV und HCMV im jeweiligen Wirt sehr ähnlich sind (Hudson, 1979; Kelsey et al., 1977), wird

---

MCMV als Modellsystem für Untersuchungen von HCMV verwendet: Symptome in immunsupprimierten Mäusen nach einer MCMV-Infektion sind unter anderem eine Pneumonie (Brody und Craighead, 1974; Reddehase et al., 1985), Hepatitis (Bolger et al., 1999) und Entzündungen der Nebenniere (Smith und Wehner, 1980). Auch die Reaktivierung aus der Latenz ist vergleichbar mit HCMV (Gonczol et al., 1985; Mayo et al., 1977). Im Mausmodell konnte z.B. gezeigt werden, dass im Falle einer Nierentransplantation nicht nur das Blut, sondern auch das Transplantat Viren übertragen kann (Hamilton und Seaworth, 1985).

### 1.8 Immunantwort gegen virale Erreger

Die Stadien der Immunantwort nach einer Virusinfektion lassen sich in die angeborene und die adaptive Immunantwort unterteilen. In der frühen Phase der Infektion treten unspezifische Mechanismen in Aktion: Phagozyten (Makrophagen und neutrophile Granulozyten) können Bestandteile von Krankheitserregern erkennen und diese zerstören. Dabei werden Zytokine von den Phagozyten produziert, die für die folgende, adaptive Phase der Immunantwort wichtig sind. Es werden zum Beispiel Interferone gebildet, welche die virale Replikation hemmen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aktivieren. NK-Zellen können virusinfizierte Zellen aufgrund einer geänderten Expression von Molekülen auf der Oberfläche erkennen und deren Zerstörung bewirken. Die Mechanismen der angeborenen Immunantwort führen aber zu keiner schützenden Immunität. Eine wichtige Funktion der angeborenen Immunantwort ist die Bekämpfung der Virusinfektion im frühen Stadium, bis die adaptive Immunantwort angreifen kann.

Zur Ausbildung der adaptiven Immunantwort werden einige Tage benötigt, da die T- und B-Lymphozyten den spezifischen Antigenen begegnen müssen, um sich dann zu vermehren und zu Effektorzellen zu differenzieren. Die T-Zellen werden in lymphatischen Geweben aktiviert, wenn ihnen ein spezifisches Antigen präsentiert wird. Antigene können endogen durch proteolytische Spaltung eines zellulären oder viralen Proteins entstehen. Anschließend gelangen sie als Peptide in den sekretorischen Transportweg und bilden mit Genprodukten des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex* – MHC) einen Komplex. Der MHC-Klasse-I-Komplex präsentiert an der Zelloberfläche das antigene Peptid und kann von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (CTL) erkannt werden, welche dann die infizierte Zelle zerstören. Exogene virale Genprodukte gelangen über den endosomal/lysosomalen Transportweg zu MHC-Molekülen der Klasse II, welche Peptide binden und auf der Zelloberfläche den CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen präsentieren. Helfer-T-Zellen können durch

Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine entweder Makrophagen aktivieren oder die Antikörperproduktion stimulieren. Während MHC-Klasse-I-Moleküle auf nahezu allen Zellen exprimiert werden, sind MHC-Klasse-II-Moleküle konstitutiv nur auf „professionellen“ Antigen-präsentierenden Zellen (APC), wie Makrophagen, B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und epithelialen Zellen des Thymus, exprimiert. Durch Interferone können auch andere Zelltypen zur Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen stimuliert werden. Die adaptive Immunantwort führt im Idealfall zur Beseitigung des Erregers und zu einem Zustand der schützenden Immunität. Durch diesen Schutz kann eine Reinfektion mit demselben Erreger verhindert oder zumindest abgeschwächt werden.

### **1.9 Immunantwort gegen MCMV**

Bei der Bekämpfung der akuten CMV-Infektion spielt die zelluläre Immunantwort durch  $CD8^+$  T-Lymphozyten eine wichtige Rolle. Anhand eines Maus-Modells konnte mittels adoptivem Transfer von  $CD8^+$  T-Lymphozyten gezeigt werden, dass diese Zellpopulation für die Kontrolle der CMV-Infektion wichtig ist. Die Sterblichkeitsrate frisch infizierter Mäuse wurde dadurch reduziert, dass sie  $CD8^+$  T-Lymphozyten aus einer CMV-positiven Maus erhielten.  $CD4^+$  T-Lymphozyten alleine wirken nicht antiviral und werden auch nicht als Helferzellen für Funktion der  $CD8^+$  T-Lymphozyten benötigt (Reddehase et al., 1985; Reddehase et al., 1988).

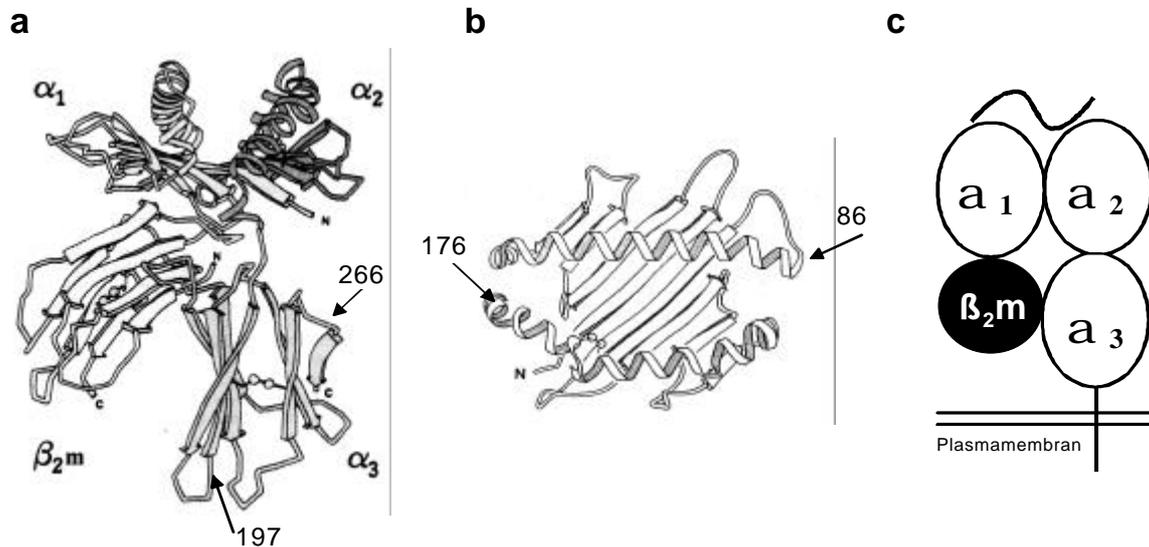
NK-Zellen sind wichtig, um die MCMV-Infektion in den ersten Tagen zu kontrollieren (Welsh et al., 1994). Interferon gamma ( $IFN-\gamma$ ) verstärkt die Antigenpräsentation in infizierten Zellen und wirkt somit Virusmechanismen entgegen, welche die Antigenpräsentation reduzieren (Hengel et al., 1994). Tumornekrosefaktor alpha ( $TNF-\alpha$ ) beeinflusst die Ausübung der antiviralen Funktion von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen (Pavic et al., 1993).

Antikörper spielen keine entscheidende Rolle in der primären CMV-Infektion. Mäuse, die keine Antikörper produzieren können, zeigen einen ähnlichen Verlauf der Virusinfektion wie Wildtyp-Mäuse. Allerdings führt eine Reaktivierung des Virus in den Mäusen mit fehlender Antikörperproduktion zu erhöhten Virustitern. Möglicherweise spielen Antikörper bei der Verbreitung des reaktivierten Virus eine Rolle (Jonjic et al., 1994).

## 1.10 MHC-Klasse-I-vermittelte Antigenpräsentation

Die Kontrolle der Virusinfektion durch  $CD8^+$  T-Zellen setzt voraus, dass virusspezifische Peptide im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Zinkernagel und Doherty, 1974; Zinkernagel und Soherly, 1979). Der Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex* - MHC) befindet sich bei der Maus auf Chromosom 17 und wird auch als H-2 bezeichnet. Diese Region kodiert unter anderem für die schwere Kette der MHC-Klasse-I-Moleküle. Die drei Hauptgene der Klasse I werden als H-2K, -D und -L bezeichnet und sind polymorph, d.h. es gibt mehrere Allele für jedes Gen. Die Allele werden durch hochgestellte Kleinbuchstaben gekennzeichnet, z.B. H-2K<sup>d</sup>, H-2D<sup>d</sup> und H-2L<sup>d</sup>. Das  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ) ist auf einem anderen Chromosom kodiert (Chromosom 2 in der Maus), obwohl es Teil des MHC-Klasse-I-Komplexes ist. Die Struktur der MHC-Klasse-I-Moleküle wurde durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt (Bjorkman et al., 1987a; Young et al., 1994). Das MHC-Klasse-I-Molekül ist ein Heterodimer, bestehend aus einer schweren Kette (*heavy chain* (hc) oder  $\alpha$ -Kette) und einer leichten Kette ( $\beta_2m$ ), die nicht kovalent gebunden sind (Abb. 2). Die schwere Kette bildet die drei Domänen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  und die leichte Kette die vierte Domäne des Moleküls. Die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne bilden einen langen Spalt, in dem ein Peptid von ca. 8-11 Aminosäuren gebunden werden kann (Bjorkman et al., 1987b). Es werden Peptide gebunden, die beim zytosolischen Abbau von zellulären und viralen Proteinen durch das Proteasom - ein multikatalytischer Proteasekomplex - entstehen. Das Proteasom erkennt und spaltet Moleküle, die durch das Anhängen mehrerer Ubiquitin-Moleküle (Ubiquitinierung) markiert sind. Die Ubiquitinierung wird von einem Enzym-Komplex durchgeführt, der missgefaltete Proteine oder ein bestimmtes Signal in Proteinen erkennt (Kloetzel, 2001; Myung et al., 2001). Der Transport der Peptide in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) findet durch einen ATP-abhängigen Peptidtransporter statt (*Transporter associated with antigen processing* – TAP; Heemels und Ploegh, 1995; Hill und Ploegh, 1995). Im ER bindet das Peptid an das Heterodimer aus schwerer Kette und  $\beta_2m$  (siehe auch Abb. 3). Während der Komplexbildung des MHC-Klasse-I-Moleküls spielen Chaperone, unter anderem Calnexin, Calreticulin und Tapasin, eine wichtige Rolle (Grande und Van-Kaer, 2001). Die Chaperone kontrollieren den korrekten Zusammenbau des MHC-Klasse-I-Komplexes und missgefaltete Moleküle werden ins Zytosol transportiert und dort abgebaut (Hughes et al., 1997). Sind MHC-Klasse-I-Komplexe korrekt gefaltet und mit Peptid beladen, gelangen sie über den konstitutiv sekretorischen Transportweg an die Zelloberfläche. Dabei

wird die schwere Kette durch Anhängen von Zuckerresten modifiziert (Kornfeld und Kornfeld 1985).



**Abb. 2 Modell eines MHC-Klasse-I-Moleküls.**

(a) Banddiagramm der Struktur des luminalen Bereichs eines MHC-Klasse-I-Moleküls. Die  $\alpha_3$ -Domäne und das  $\beta_{2m}$  sind der konstanten Domäne von Immunglobulinen ähnlich und weisen einen hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen auf (breite Pfeile). Die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne bilden eine Struktur, die aus zwei  $\alpha$ -Helices (bandähnliche Struktur) besteht, welche auf einem Faltblatt aus acht antiparallelen  $\beta$ -Strängen liegen. Durch die Faltung der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne entsteht ein langer Spalt, in dem das Peptid bindet. Die Positionen, die durch Pfeile markiert sind, stellen Aminosäuren dar, welche möglicherweise die Bindung von m04/gp34 an die schwere Kette bestimmen (siehe Diskussion) (b) Ansicht des MHC-Klasse-I-Moleküls von oben. Die Seiten des peptidbindenden Spalts werden von den beiden  $\alpha$ -Helices der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne gebildet. Die flachen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne bilden den Boden des Spalts. Die Position der Glykosylierungsstellen in MHC-Klasse-I-Molekülen der Maus ist durch Pfeile und die Angabe der Aminosäureposition markiert (verändert aus Bjorkman et al., 1987a). (c) Schematische Darstellung eines MHC-Klasse-I-Moleküls. Die schwere Kette (weiß) setzt sich aus den drei Domänen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$ , der Transmembranregion und dem zytoplasmatischen Bereich zusammen und ist mit der Transmembranregion in der Plasmamembran verankert. In einer Spalte zwischen der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne bindet das antigene Peptid (geschwungene Linie) und an die  $\alpha_2$ -Domäne ist  $\beta_{2m}$  nicht kovalent gebunden.

Im *medialen* Bereich des Golgi wird diese Glykosylierung so verändert, dass das Enzym Endoglykosidase H (Endo H) die Zuckerreste nicht mehr abspalten kann. Diese Eigenschaft dient der groben Zuordnung der Lokalisation reifender MHC-Klasse-I-Moleküle im Transportweg. An der Zelloberfläche kann der MHC-Klasse-I-Komplex durch einen entsprechenden T-Zell-Rezeptor (*T-cell receptor* - TCR), der auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert ist, erkannt werden.

### 1.11 Antigenpräsentation unter MCMV-Infektion

Aufgrund der Größe des viralen Genoms von MCMV mit zirka 200 putativen Genen werden eine Vielzahl antigener Peptide während der Virusinfektion gebildet und präsentiert. Die Zahl der bekannten viralen Peptide, die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden und von CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden, ist jedoch verhältnismäßig gering (Holtappels et al., 2000a; Holtappels et al., 2000b; Reddehase, 2000). Als erstes Antigen wird das regulatorische IE-Protein pp89 erkannt, das eine spezifische Immunantwort durch CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten hervorruft (Koszinowski et al., 1986; Koszinowski et al., 1987; Volkmer et al., 1987; Jonjic et al., 1988). Die Antigen-Präsentation des Peptids von pp89 an der Zelloberfläche findet in infizierten Mausfibroblasten nur in der IE- und der L-Phase des viralen Replikationszyklus statt (Reddehase et al., 1986). Schon 30 Minuten nach Beginn der E-Phase können pp89-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (*cytotoxic T-lymphocytes* – CTL) infizierte Zellen nicht mehr erkennen und lysieren. Die Expression bestimmter viraler Gene während der E-Phase führt zu einer spezifischen Inhibition der Präsentation des pp89-Peptids. Diese Inhibition kann nicht durch eine generelle Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression erklärt werden (Campbell et al., 1992; Del Val et al., 1989).

Inzwischen sind auch Peptide viraler Antigene bekannt, die während der E-Phase präsentiert werden. So entsteht z.B. aus dem viralen Protein m04/gp34 ein Peptid, das präsentiert wird und in Mäusen eine Immunantwort durch CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten hervorruft (Holtappels et al., 2000a). Weitere bekannte antigene Peptide der E-Phase entstehen aus den Produkten der Gene M84 (Holtappels et al., 2000b; Morello et al., 2000) und M83 (Holtappels et al., 2001).

### 1.12 Inhibition der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation

Viren haben unter dem selektiven Druck des Immunsystems ihres Wirts im Laufe der Evolution Strategien entwickelt, um die Immunantwort zu beeinflussen. Eine dieser Strategien ist die Unterbindung der Antigenpräsentation von MHC-Klasse-I-Molekülen, um so der Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten zu entgehen. Das erste virale Protein, für das eine MHC-Klasse-I-modulierende Funktion beschrieben wurde, ist E3/19K des Adenovirus. E3/19K bindet an MHC-Klasse-I-Moleküle und hält sie im ER zurück (Andersson et al., 1985; Burgert und Kvist, 1985). Inzwischen kennt man für MCMV und HCMV verschiedene Proteine, die mit MHC-Klasse-I-Molekülen interagieren und deren Transport beeinflussen. Alle Mechanismen haben eine reduzierte Erkennung der infizierten

Zelle durch zytotoxische T-Lymphozyten zur Folge (Alcami-A und Koszinowski, 2000; Ploegh, 1998).

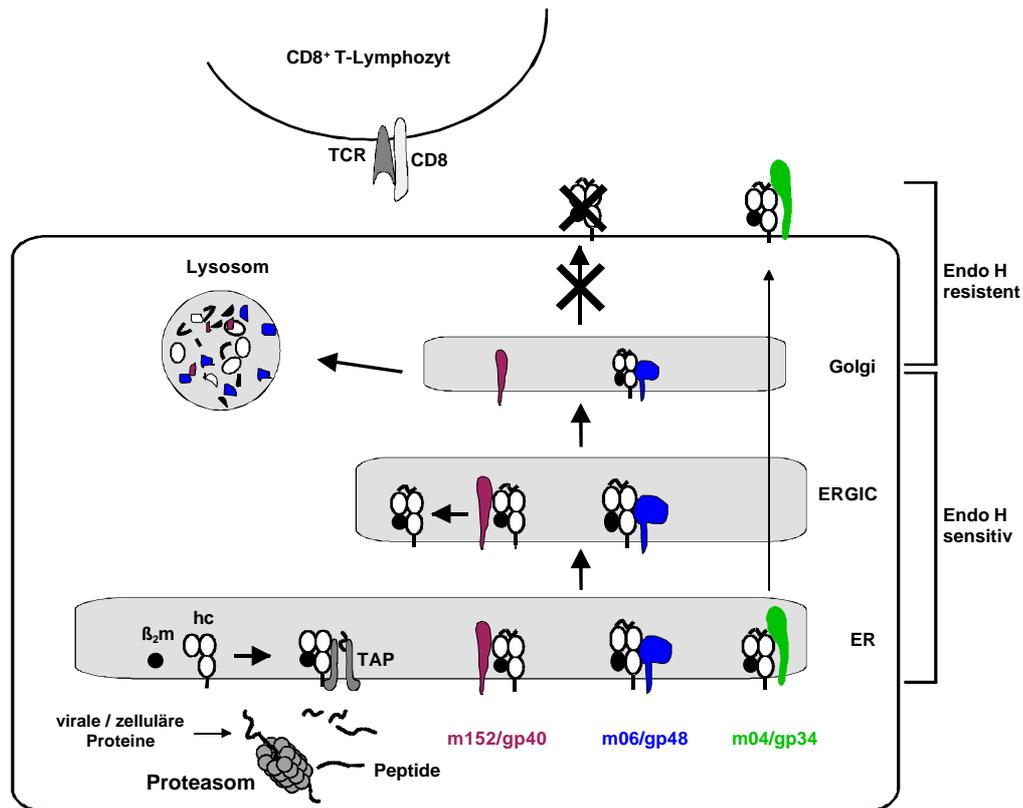
Doch diese Mechanismen des Virus sind nicht perfekt. Zum einen können trotzdem noch virale Peptide an der Zelloberfläche präsentiert werden (siehe 1.11). Weiterhin bietet die Retention der MHC-Klasse-I-Moleküle dem Immunsystem des Wirts Angriffspunkte. Eine Veränderung der Menge von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche hat nämlich zur Folge, dass NK-Zellen die infizierten Zellen erkennen und zerstören können (Karre, 1995; Lanier, 1997). Im Gegenzug haben Viren im Laufe der Evolution Strategien entwickelt, um den NK-Zellen einen unveränderten Status der Zellfunktionen vorzutäuschen. So gibt es z.B. virale MHC-Klasse-I-Homologe, die an der Oberfläche exprimiert werden und die Funktion von NK-Zellen inhibieren (Farrell et al., 2000; Farrell et al., 1999; Reyburn et al., 1997). Beschrieben wurde auch, dass HCMV ein virales Peptid auf bestimmten MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert. Diese MHC-Klasse-I-Moleküle können inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren binden und die Zerstörung der infizierten Zelle durch NK-Zellen verhindern (Tomasec et al., 2000; Ulbrecht et al., 2000).

Die verschiedenen Mechanismen des Wirts und des Virus bilden ein komplexes Geflecht von Interaktionen, das bis heute erst teilweise verstanden ist. Die Durchseuchung mit Zytomegalievirus in der menschlichen Bevölkerung zeigt, dass Virus und Wirt einen Zustand des Gleichgewichts erreicht haben. Die antivirale Immunantwort des Wirts kann vor einer Krankheit schützen, reicht aber nicht aus, um eine Etablierung der Latenz durch das Virus zu verhindern.

### **1.13 MCMV interferiert mit der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation**

Es sind verschiedene Strategien bekannt, die es dem Zytomegalievirus ermöglichen, die Kontrolle des Wirtsorganismus durch zytotoxische T-Lymphozyten abzuschwächen. Zunächst wurde eine selektive Verhinderung der Antigenpräsentation des viralen, antigenen Peptids des Proteins pp89 durch das Virus beobachtet (Del Val et al., 1989). Ein Mechanismus von allgemeinem Charakter wurde 1992 beschrieben: Es konnte gezeigt werden, dass die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation, unabhängig von dem gebundenen Peptid, generell während der E-Phase der MCMV-Infektion verhindert wird (Del Val et al., 1992). Das erste identifizierte Gen von MCMV, das generell die Reifung von MHC-Klasse-I-Molekülen behindert, ist *m152* (Ziegler et al., 1997). *M152* kodiert für ein Protein von 40 kDa Größe (*m152/gp40*), das die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche dadurch reduziert, dass es eine Akkumulation der Moleküle im ER-Golgi *intermediate compartment* (ERGIC)/ *cis*-Golgi

bewirkt (Abb. 3). Dies hat zur Folge, dass die infizierte Zelle von zytotoxischen T-Lymphozyten schlechter erkannt und zerstört werden kann. Bisher konnte keine direkte Interaktion von m152/gp40 mit MHC-Klasse-I-Molekülen gezeigt werden (Ziegler, 2000). Die kontinuierliche Neu-Synthese von m152/gp40 ist nicht notwendig, um den



**Abb. 3 Schematische Darstellung der Antigenpräsentation während der MCMV-Infektion.**

Virale und zelluläre Proteine werden im Zytosol vom Proteasom in Peptide gespalten. Diese werden über den *Transporter associated with antigen processing* (TAP) in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert und bilden mit der schweren Kette (hc) und dem  $\beta_2m$  einen Komplex. In der E-Phase der MCMV-Infektion wird die Präsentation der MHC-Klasse-I-Komplexe an der Zelloberfläche durch die Genprodukte m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 beeinflusst. M152/gp40 bewirkt, dass MHC-Klasse-I-Moleküle im ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC)/ cis-Golgi akkumulieren, während das virale Protein m152/gp40 in die Lysosomen gelangt und dort degradiert wird. M06/gp48 bindet an MHC-Klasse-I-Moleküle und gelangt mit diesen in die Lysosomen, wo beide Proteine degradiert werden. M04/gp34 bindet an MHC-Klasse-I-Moleküle und diese werden gemeinsam an die Zelloberfläche transportiert. Dort vermittelt m04/gp34 auf bisher unbekannte Weise einen Schutz der Zelle vor zytotoxischen T-Lymphozyten. Alle drei viralen Proteine verhindern die Zerstörung infizierter Zellen, indem sie die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation beeinflussen. MHC-Klasse-I-Moleküle besitzen Zuckerreste, die während des Transports zur Zelloberfläche im *medialen* Golgi verändert werden. Danach können die Zuckerreste nicht mehr durch das Enzym Endoglykosidase H (Endo H) gespalten werden: Die Glykoproteine sind Endo H-resistent geworden. Aufgrund der Änderung der Endo H-Sensitivität können Glykoproteine auf dem sekretorischen Weg zur Zelloberfläche ungefähr lokalisiert werden (rechts dargestellt).

---

Verbleib der MHC-Klasse-I-Moleküle im ERGIC/*cis*-Golgi zu gewährleisten. Es wird daher spekuliert, dass m152/gp40 mit den MHC-Klasse-I-Molekülen nur kurzzeitig interagiert und bei diesen eine Veränderung hervorruft. Diese Veränderung bewirkt die Akkumulation der MHC-Klasse-I-Moleküle im ERGIC/*cis*-Golgi. Die Beteiligung eines dritten Proteins an diesem Mechanismus ist dadurch nicht ausgeschlossen (Ziegler et al., 2000). Die *in vivo*-Rolle konnte für m152/gp40 in Mausexperimenten bewiesen werden. Die Deletion von *m152* hat ein reduziertes Wachstum der Virus-Mutante in Mäusen zur Folge. Das reduzierte Wachstum ist auf die Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zurückzuführen (Krmptotic et al., 1999). Dies lässt den Schluss zu, dass das MCMV-Protein m152/gp40, durch die Beeinflussung der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation, infizierten Zellen tatsächlich einen Schutz vor zytotoxischen T-Lymphozyten vermittelt.

M06/gp48 wird von dem viralen Gen *m06* kodiert und ist ein weiteres, immunmodulierendes Protein von MCMV. Es bindet an MHC-Klasse-I-Moleküle und leitet diese in den endosomalen Transportweg um (Abb.3), wobei beide Moleküle in Lysosomen gelangen und degradiert werden. Auch dieser virale Mechanismus bewirkt eine Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression und eine verringerte Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten (Reusch et al., 1999).

Während m06/gp48 und m152/gp40 die Präsentation von Peptiden an der Zelloberfläche vermindern, übt m04/gp34 durch einen anderen Mechanismus seine immunevasive Funktion aus. Es gibt Hinweise, dass m04/gp34 keine Oberflächenreduktion von MHC-Klasse-I-Molekülen bewirkt und es konnte gezeigt werden, dass es stark an MHC-Klasse-I-Moleküle bindet und nur im Komplex mit diesen Molekülen auf die Zelloberfläche gelangt (Abb. 3, Kleijnen et al., 1997). Die Expression von m04/gp34 verringert die Retention von H-2K<sup>b</sup>, so dass für m04/gp34 eine mögliche Rolle als Gegenspieler der MHC-Klasse-I-Retention vermutet wird (Kleijnen et al., 1997). Ein vermehrter Transport von H-2K<sup>b</sup> zur Zelloberfläche würde allerdings die Erkennung infizierter Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten bedeuten. Hier scheint MCMV durch eine weitere Funktion von m04/gp34 mit dem Immunsystem zu interferieren. Zytotoxische T-Lymphozyten, die spezifisch H-2K<sup>b</sup> erkennen, lysieren infizierte Zellen nur dann, wenn in diesen kein m04/gp34 exprimiert wird. Wird aber m04/gp34 exprimiert, so vermittelt es eine Schutzfunktion gegenüber der Zerstörung durch zytotoxische T-Lymphozyten (Kavanagh et al., 2001).

---

Dieses Phänomen wurde für H-2K<sup>b</sup> beschrieben, betrifft aber nicht H-2D<sup>b</sup>. H-2K<sup>b</sup> entkommt einerseits durch m04/gp34 einer Retention durch virale Proteine und ist andererseits an der Zelloberfläche vor der Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten geschützt. Möglicherweise beinhaltet die Funktion von m04/gp34 nicht nur den Schutz von H-2K<sup>b</sup> vor zytotoxischen T-Lymphozyten, sondern auch einen Schutz vor NK-Zellen, indem es H-2K<sup>b</sup> an die Zelloberfläche begleitet, wo es nicht mehr von CTL, aber noch von einem inhibitorischen NK-Zell-Rezeptor erkannt wird.

#### 1.14 Fragestellung der Arbeit

Das immunevasive Gen *m152* von MCMV kodiert für das Protein m152/gp40 und wurde bereits funktionell und biochemisch charakterisiert (Ziegler et al., 1997; Ziegler et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeiten konnte keine direkte Interaktion zwischen m152/gp40 und den im Transport gehemmten MHC-Klasse-I-Molekülen gezeigt werden. Der genaue Mechanismus der Retention blieb unklar. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das Zielmolekül, MHC-Klasse-I, untersucht. Es lagen Hinweise vor für die Speziespezifität der Retention von MHC-Klasse-I-Molekülen durch das virale Protein. Der Frage der Speziespezifität wurde nachgegangen um auf diese Weise Kenntnisse zum molekularen Wirkungsmechanismus zu gewinnen. Hierzu wurden die unterschiedliche Anzahl der Glykosylierungen und die Spezies des gebundenen  $\beta_2$ -Mikroglobulins genauer untersucht. Aufgrund der Ergebnisse bot sich die Möglichkeit, Chimären von MHC-Klasse-I-Molekülen des Menschen und der Maus zu untersuchen. Durch einen Austausch der Domänen sollte der Bereich, der von m152/gp40 erkannt wird, eingegrenzt werden.

Bisherige Untersuchungen zu den immunsubversiven Genen *m04*, *m06* und *m152* basieren im Wesentlichen auf der Expression der einzelnen Gene in Fibroblasten. Nunmehr sollte die Bedeutung der Genprodukte einzeln und in Kombination im Kontext der Virusinfektion *in vitro* untersucht werden. Es wurden Virusmutanten darauf untersucht, wie sie die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in Mausfibroblasten beeinflussen. In den Virusmutanten waren die drei immunmodulierenden Gene *m04*, *m06* und *m152* in allen möglichen Kombinationen deletiert. Dadurch konnte gefragt werden, ob und auf welche Weise sich die immunsubversiven Genprodukte gegenseitig bei einer Infektion *in vitro* beeinflussen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid (ProtoGel)	National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA
Agar für Bakterienplatten	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Agarose Typ I	Sigma, München
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, Richmond, USA
Ampicillin	Sigma, München
Bacto Hefe-Extrakt	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Bacto Trypton	Difco Lab., Detroit, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
[ <sup>35</sup> S]-Cystein/Methionin	Amersham Buchler, Braunschweig
Digitonin	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Gibco, NY, USA
Endoglykosidase H (Endo H)	Roche, Mannheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylendiamintetraacetat-Na-Salz (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Filme (BioMax MR)	Eastman Kodak Company, New Haven
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Marburg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Geneticinsulfat (G418)	Sigma, München
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Serva, Heidelberg
HAT-Supplement	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hygromycin	Roche, Mannheim
Igepal	Sigma, München
Iodoacetamid	Sigma, München
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Riedel-de Haën, Seelze
Kaliumacetat	Riedel-de Haën, Seelze
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Leupeptin	Sigma, München
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Merck, Darmstadt

Methanol	Merck, Darmstadt
Methionin	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Natriumacetat	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumhydroxid	J.T.Baker B.V., Deventer, Holland
Neugeborenen Kälberserum (NCS)	PAA, Marburg
dNTP	Roche, Mannheim
Penicillin	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, München
PIPES	Sigma, München
Protein A-Sepharose CL-4B	Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden
Restriktionsendonukleasen	Roche, Fermentas, Biolabs
RNAse A	Roche, Mannheim
RPMI 1640 ohne Cys/Met	BioWhittaker, Walkersville, Maryland, USA
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Roth, Karlsruhe
Streptomycinsulfat	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, München
Tris-Acetat	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, München
Trypsin	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Trypton	Difco Lab., Detroit, USA

### 2.1.2 Antikörper

20-8-4s, Maus anti H-2K <sup>b</sup>	ATCC HB-11
28-14-8s, Maus anti H-2L <sup>q</sup> ,L <sup>d</sup> ,D <sup>b</sup>	ATCC HB27
34-2-12s, Maus anti H-2D <sup>d</sup>	ATCC HB-87
Anti-Calnexin, Kaninchen	Biomol, Hamburg
Anti-Calretikulin, Kaninchen	StressGen, Victoria, Kanada
Anti-Dinitrophenyl-KLH, Texas Red-X-konjugiert	Molecular Probes, Leiden, The Netherlands
Anti-H-2K <sup>k</sup> , Maus	Pharmingen, Nr.06181D
Anti human Beta-2-Mikroglobulin, Kaninchen	DAKOPATTS, Dänemark
Anti-p58, Kaninchen-Serum	(Saraste und Svensson, 1991)
Anti-PDI, Maus	StressGen, Victoria, Kanada
Anti-Rab6, Kaninchen (C-19, #SC-310)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
B22.249, Maus anti H-2D <sup>b</sup>	(Lemke et al., 1979)
B8-24-3s, Maus anti H-2K <sup>b</sup>	ATCC TIB-139
B9.12.1, Maus anti HLA-A,-B,-C	Immunotech, Frankreich
BB7.1, Maus anti HLA-B7	ATCC HB-56
Croma 229, anti MCMV-gp48, Maus-Ascites	(Reusch et al., 1999)
Croma 231, anti MCMV-gp48, Maus	(Reusch et al., 1999)

---

MA2.1, Maus anti HLA-A2,-B17	ATCC HB-54
ME1, Maus anti HLA-B7,-B27,-Bw22	ATCC HB-119
p11, anti MCMV-gp40, Kaninchen-Serum	(Ziegler et al., 1997)
R1.21.2, Ratte anti H-2	(Koch et al., 1983)
SF1.1.1, Maus anti H-2K <sup>d</sup>	ATCC HB-159
W6/32, Maus anti HLA-A,-B,-C	ATCC HB-95
Y-3, Maus anti H-2K <sup>b</sup>	(Jones und Janeway, Jr., 1981)
Ziege anti Maus IgG FITC-konjugiert	SIGMA, München
Ziege anti Maus IgG Rhodamin-konjugiert	Dianova, Hamburg
Ziege anti Kaninchen IgG Rhodamin-konjugiert	Dianova, Hamburg
Ziege anti Ratte IgG FITC-konjugiert	Dianova, Hamburg

## 2.2 Klonierung der Plasmide

Es wurden molekularbiologische Standardmethoden angewendet (Maniatis et al., 1989). Die Methoden werden im folgenden kurz beschrieben.

### 2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die zu amplifizierende DNA wurden mit einer Konzentration von 100 ng in einem 50- $\mu$ l-Ansatz eingesetzt. Zugegeben wurden je 100 pmol der Oligonukleotide, jedes dNTP (Roche Diagnostics) mit einer Endkonzentration von 1,25 mM, Magnesiumchlorid (Perkin Elmer) mit einer Endkonzentration von 1,5 mM, entsprechender Reaktionspuffer (Perkin Elmer) in einfacher Konzentration und 1 Unit AmpliTaq<sup>®</sup> DNA-Polymerase (Perkin Elmer).

Die Reaktion wurde in einem Gerät von Perkin Elmer (Gene Amp PCR-System 2400) durchgeführt. Um die Nukleotidstränge vollständig zu denaturieren wurden die Ansätze für 5 min. bei 94°C erhitzt. Die PCR erfolgte über 25 Zyklen mit 94°C Denaturierungstemperatur (30 sek.), 62°C *Annealing*-Temperatur (30 sek.) und 72°C Extensions-Temperatur (1 min.). Anschließend wurden die Proben 7 min. bei 72°C inkubiert, um eventuell unvollständig synthetisierte DNA-Stränge zu vervollständigen. Der gesamte PCR-Ansatz wurde auf ein Agarosegel (1%) aufgetragen, die Bande ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 1.2.3). Die Menge des PCR-Produkts wurde auf einem Agarosegel mit Hilfe des DNA-Molekulargewichtsmarker III (Roche, Mannheim) abgeschätzt.

Die Oligonukleotide für die Klonierung von H-2K<sup>b</sup> sol. wurden hergestellt von *metabion* (Martinsried). Die Sequenz der Primer war 5'-GGA ATT CGC CGC CAT GGT ACC GTG CAC GCT G<sub>3</sub>' (K<sup>b</sup>ex1 Eco RI, der Primer für das 5'-Ende) und 5'-GCT CTA GAT CAA TCA GCA AGC TTC CAT CT -3' (K<sup>b</sup>s XbaIrev, der Primer für das 3'-Ende des verkürzten H-2K<sup>b</sup>).

### 2.2.2 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

Es wurden 1 µg des Vektors (pCR3 von Invitrogen, Niederlande) und 3-5 µg des Plasmids mit dem gewünschten Gen für einen Restriktionsverdau eingesetzt. Diese wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 5-10 U Enzymaktivität und entsprechendem Puffer für 2 Stunden bei 37 °C verdaut. Zur Dephosphorylierung wurden dem Verdau mit dem Vektor anschließend 10 000 U CIP (Alkalische Phosphatase, New England Biolabs) zugesetzt und dieser weitere 30 min. bei 37 °C inkubiert. Die Alkalische Phosphatase wurde bei 65°C für 20 min. inaktiviert.

### 2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Der gesamte Restriktionsansatz wurde auf ein 1% (w/v)-Agarosegel in TAE-Puffer aufgetragen und die DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden ausgeschnitten und mit Hilfe des „GFX™ Purification Kit“ (Pharmacia) nach Anleitung aufgereinigt. Von der eluierten DNA wurde 1/10 auf ein 1%-Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe des DNA-Molekulargewichtsmarker III (Roche, Mannheim) die Menge der eluierten DNA abgeschätzt.

TAE-Puffer :           40 mM Tris-Acetat  
                          2 mM EDTA  
                          pH 8,0

### 2.2.4 Ligation

Es wurden ca. 50 ng des Vektors mit der vier- bis sechsfachen DNA-Menge des zu klonierenden Gens für die Ligation eingesetzt. Diese wurden in entsprechendem Puffer mit 400 000 U T4-Ligase (New England Biolabs) in 30 µl Volumen angesetzt. Die Ligation fand bei 14 °C über Nacht statt. Parallel wurde der Vektor ohne das gewünschte Gen inkubiert, um die Vollständigkeit der Restriktion und Dephosphorylierung zu prüfen.

Für die Ligation des PCR-Produktes von H-2K<sup>b</sup> sol. und des Vektors pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup> wurde der TOPO XL PCR Cloning™ Kit von Invitrogen nach Vorschrift verwendet.

### 2.2.5 Übersicht der verwendeten Plasmide

Plasmid	kloniertes Gen	Quelle	Umklontiert
pBSV328 2/Eco	genom. H-2K <sup>b</sup>	Dr. Burgert, München	-
pTM-B7 (neo)	HLA-B7	Prof. E. Weiß, München	-
pcDNA-I-neo-A2	HLA-A2	Prof. H. Hengel, Berlin	-
pCDM8-A2	HLA-A2	Prof. E. Weiß, München	-
pRep10-A2	HLA-A2	-	aus pCDM8 Xba I in pUC19; Orientierung geprüft mit Kpn I; aus pUC19 Bam HI / Hind III in pRep10
pRep10-176N	Glykosylierungsmutante von HLA-A2	(Zhang und Salter, 1998)	-
pCR3-K <sup>b</sup> sol	luminale Domäne H-2K <sup>b</sup>	Prof. Arnold, Heidelberg	aus C62-neo über PCR in TOPO-TA Orientierung geprüft mit Not I; aus TOPO-TA über Eco R I/ Xba I in pCR3
pCR3-K <sup>b</sup>	H-2K <sup>b</sup>	Prof. Arnold, Heidelberg	aus pUC19 über Eco RI in pCR3
KKB	Chimäre H-2K <sup>b</sup> , HLA-B7	(Tanabe et al., 1989)	-
BBK	Chimäre H-2K <sup>b</sup> , HLA-B7	(Tanabe et al., 1989)	-
KBB	Chimäre H-2K <sup>b</sup> , HLA-B7	(Tanabe et al., 1989)	-
BKK	Chimäre H-2K <sup>b</sup> , HLA-B7	(Tanabe et al., 1989)	-
pGCneo635	Neomycin-Resistenz	Dr. Burgert, München	-

### 2.2.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien mit Hilfe von CaCl<sub>2</sub>

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurde der Stamm E.coli XL1-Blue MRF<sup>+</sup> verwendet. Es wurden 4 ml einer Bakterien-Kultur in 400 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C geschüttelt (250 rpm). Hatte die Bakteriendichte eine OD<sub>590</sub> von 0,375 erreicht, so wurde die Suspension auf 50-ml-Falcon-Gefäße verteilt und 5-10 min. auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden 7 min. bei 1600 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterien in 10 ml kaltem CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und 5 min. bei 1100 x g und 4°C zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 10 ml kaltem CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und 30 min. auf Eis gekühlt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 1100 x g wurden die Bakterien in 2 ml CaCl<sub>2</sub> aufgenommen, jeweils 100 µl in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und sofort bei -70°C eingefroren.

---

CaCl <sub>2</sub> -Lösung :	60 mM CaCl <sub>2</sub> 15% (v/v) Glycerol 10 mM PIPES, pH 7,0 autoklaviert
LB-Medium :	0,5 % (w/v) Bacto Hefe-Extrakt 1 % (w/v) Bacto Trypton 1 % (w/v) NaCl

### 2.2.7 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde zu 100 µl kompetenten Bakterien gegeben und beides mit der Pipette gemischt (ohne zu pipettieren). Die Mischung wurde 20-30 min. auf Eis inkubiert und anschließend 2 min. bei 42 °C erhitzt. Die Bakterien wurden sofort 1 min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl LB-Medium wurden die Bakterien gemischt und bei 37°C für 30-50 min. inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden auf einer Agarplatte mit Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

LB-Platten :                    LB-Medium (siehe 1.2.4) mit 1,5 % (w/v) Agar

### 2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA in kleinen Mengen wurden transformierte Bakterienklone über Nacht in 2 ml LB-Medium mit Antibiotikum (Ampicillin 100µg/ml) bei 37 °C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und kurz abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und anschließend mit 100 µl Lösung 2 durch invertieren gemischt. Dabei wurden die Bakterien lysiert und die Proteine anschließend durch Zugabe von 100 µl Lösung 3 gefällt. Nach Inkubation auf Eis für 10 min. wurden die Proteine bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Zu der DNA wurde das gleiche Volumen Ethanol gegeben und die DNA für 10 min. zentrifugiert. Die DNA wurde getrocknet, in 30 µl Aqua bidest gelöst und 1 µl davon für einen Restriktionsverdau verwendet.

Die Lösungen wurden aus dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit von QIAGEN verwendet.

Lösung 1 :                    50 mM Tris/HCl  
10 mM EDTA pH 8  
RNase A (100µg/ml)  
Lagerung bei 4 °C

Lösung 2 :                   200 mM NaOH  
                                  1 % (w/v) SDS

Lösung 3 :                   3 M Kaliumacetat pH 5,5

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu gewinnen wurde eine Plasmid Maxi Präparation durchgeführt. Es wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit von QIAGEN verwendet. Die Methode beruht auf einer Kombination der alkalischen Lyse und einer Anionenaustauschchromatographie. Die gelöste Plasmid-DNA bindet an eine Anionenaustauschermatrix, wo sie dann gewaschen und eluiert wird. Für den pCR3-Vektor wurden 100 ml Bakteriensuspension hergestellt und nach der Vorschrift des Herstellers die DNA daraus isoliert. Diese DNA-Präparation wurde für Transfektion von eukaryontischen Zellen verwendet.

## 2.3 Eukaryontische Zellen

### 2.3.1 Zelllinien

1T 22-6 293	Fibroblasten aus der „Swiss“-Maus, H-2 <sup>q</sup> Haplotyp (Arnold et al., 1984) ATCC CRL 1573, humane, Adenovirus Typ 5-transformierte primäre embryonale Nierenzellen
B12	Subklon mit SV40 immortalisierter, embryonaler BALB/c Fibroblasten (Del Val et al., 1991)
C57SV40	Fibroblasten aus C57BL/6-Mäusen, SV40-immortalisiert. H-2 <sup>b</sup> Haplotyp (Trinchieri et al., 1976)
CV-1	ATCC CCL 70, Nierenzelllinie aus der grünen Meerkatze
HeLa	ATCC CCL 2, human, epitheloide Cervix-Karzinomzellen
L929	ATCC CCL 1, Maus C <sub>3</sub> H/An, Bindegewebszellen, H-2 <sup>k</sup> Haplotyp
LC5	human, embryonale Lungenfibroblasten (Mellert et al., 1990)
Ltk-	ATCC CCL 1.3, Maus C <sub>3</sub> H/An, Bindegewebszellen, H-2 <sup>k</sup> Haplotyp, Deletion des Enzyms Thymidinkinase, resistent gegenüber 5-Bromo-2-Deoxyuridin (BudR)
NIH 3T3	ATCC CRL 1658, kontakt-inhibierte, embryonale Zelllinie aus der NIH „Swiss“-Maus, exprimiert H-2L <sup>q</sup>

### 2.3.2 Zellkultur

Für die Kultivierung eukaryontischer Zellen wurde DMEM-Vollmedium verwendet. Es enthielt zusätzlich 10% (v/v) FCS (fötale Kälberserum), bzw. 3% (v/v) NCS (neugeborenen Kälberserum) für NIH 3T3 Zellen, sowie 0,3 mg/ml L-Glutamin, 10 IU/ml Penicillin und 10 IU/ml Streptomycin. FCS wurde zuvor 20 min. bei 56°C inkubiert, um Komplement zu inaktivieren. Die stabil transfizierten Zelllinien B12-*m152*, NIH3T3-*m152*, 293-*m152*,

NIH3T3-*m06*, 293-gp48, sowie die HeLa-Transfektanten HeLa-B7, HeLa-K<sup>b</sup> und die entsprechenden Chimären wurden in Gegenwart von 500 µg/ml Geneticinsufat (G418) kultiviert. Die Zelllinien IC62-82 und I-K<sup>b</sup> wurden in 250 µg/ml G418 kultiviert. HeLa-A2 und HeLa-176N Transfektanten wurden mit 100 µg/ml Hygromycin B kultiviert. L-B7 Zellen wurden in Gegenwart von HAT-Supplement kultiviert. Die Zellen wurden bei 37°C in 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zellen wurden umgesetzt, indem sie mit PBS gewaschen und mit geringen Mengen Trypsin/EDTA abgelöst wurden. Die Zellen wurden in Vollmedium aufgenommen und je nach Verwendung 1/3 bis 1/10 der Zellen in einer neuen Kulturschale ausgesät.

#### Auftauen von Zellen :

Zellen wurden in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und langsam in ein Röhrchen mit 10 ml Vollmedium getropft. Die Zellen wurden bei 300 x g für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Vollmedium resuspendiert und in einer Kulturschale entsprechender Größe ausgesät.

#### Einfrieren von Zellen :

Zellen wurden eingefroren, wenn sie in der Wachstumsphase waren. Die Zellen wurden von der Kulturschale abtrypsiniert, in Vollmedium aufgenommen und 5 min. bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Cryotubes<sup>TM</sup> (Nalgene Nunc Itl., Dänemark) pipettiert und bei -70°C in einer Styroporbox eingefroren. Nach einigen Tagen wurden die Zellen zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium :           40% (v/v) DMEM-Vollmedium, 10% (v/v) DMSO in FCS

#### *2.3.3 Stabile Transfektion mittels eines Calcium-Phosphat-Präzipitats*

Für eine 6 cm Schale wurden 5-10 µg Plasmid-DNA verwendet. Die DNA wurde mit 250 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung gemischt und zu 250 µl 2 x HeBS-Puffer getropft, während die Lösung auf einem Vortex-Gerät gemischt wurde. Wurde ein Plasmid ohne Selektionsmarker transfiziert, so wurde zu 5 µg Plasmid-DNA 0,5 µg eines Plasmids mit Neomycin-Resistenzgen (pGCneo635) gemischt. Das entstandene Präzipitat wurde 20 min. bei RT inkubiert. Zu dem Präzipitat wurden 4 ml DMEM-Vollmedium gegeben und das Gemisch auf Zellen in einer 6

cm Schale pipettiert, die 50-60% des Bodens bedeckten. Die Zellen wurden mit dem Präzipitat über Nacht bei 37 °C und 7 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Am zweiten Tag wurde das Präzipitat verworfen und die Zellen mit warmem Vollmedium einmal gewaschen und in diesem inkubiert.

Am dritten Tag wurden die Zellen abtrypsiniert und in Verdünnungen von 1:10 bis 1:40 in Vollmedium ohne Selektion auf eine 10 cm Schale umgesetzt.

Das Vollmedium wurde am vierten Tag ersetzt durch Vollmedium mit entsprechendem Antibiotikum. Die Konzentration des Antibiotikums wurde zuvor ermittelt, indem die Zellen in verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums inkubiert wurden und das Absterben der Zellen beobachtet wurde. Es wurde eine Konzentration gewählt, bei der die Zellen nach ca. 4 Tagen abgestorben waren.

Das Medium mit Antibiotikum wurde regelmäßig erneuert und nach ca. 3-4 Wochen konnten einzelne Klone mit Hilfe von Klonierungsringen von der Schale abtrypsiniert und in eine Kulturschale mit 48 Vertiefungen überführt werden. Die Klone wurden mittels FACS-Analyse auf Expression des gewünschten Gens geprüft.

CaCl<sub>2</sub>-Lösung :            0,25 M CaCl<sub>2</sub> , autoklaviert

2 x HeBS-Puffer (HEPES buffered Saline) :  
                                  0,28 M NaCl  
                                  50 mM HEPES  
                                  1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
                                  pH 7,05 -7,12  
                                  Sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert

## 2.4 Vaccinia-Viren

### 2.4.1 Vaccinia-Viren

wildtyp-Vaccinia	Stamm Copenhagen, zur Verfügung gestellt von Dr. M. Kieny (Kieny et al., 1984)
<i>m152</i> -Vaccinia, ΔCT-,ΔTM-Vaccinia	<i>m152/gp40</i> - exprimierende Vaccinia-Rekombinante, bzw. Deletionsmutanten von <i>m152</i> (Ziegler et al., 1997)
A2-Vaccinia	HLA-A2 exprimierende Vaccinia-Rekombinante Hergestellt und zur Verfügung gestellt von Dr. Hartmut Hengel und Dr. Yasuo Yamashita
K <sup>b</sup> -Vaccinia	H-2K <sup>b</sup> exprimierende Vaccinia-Rekombinante,

h $\beta_2$ m-Vaccinia            humanes  $\beta_2$ -Mikroglobulin exprimierende Vaccinia-Rekombinante, beide Viren zur Verfügung gestellt von Dr. Yewdell (Deng et al., 1998)

#### 2.4.2 Herstellung eines Vaccinia-Virusstocks

Die Vaccinia-Viren wurden für die Infektion dreimal 10 sek. in einem Ultraschallgerät (Branson Sonifier 450 von Branson Ultrasonics Corporation, USA) bei 120-150 Watt beschallt. CV-1 Zellen wurden mit einer m.o.i. von 0,5 infiziert und kultiviert, bis alle Zellen einen zytopathischen Effekt zeigten. Die lysierten Zellen wurden mit einem Schaber von den Platten gelöst und in ein 50 ml Falcon Gefäß überführt. Die Zellsuspension wurde 20 min. bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500  $\mu$ l PBS aufgenommen. Die Suspension wurde dreimal 20 sek. im Ultraschallgerät beschallt und die Zelltrümmer anschließend bei 2000 x g für 10 min. abzentrifugiert. Der Überstand enthielt das Virus und wurde in ein neues Röhrchen überführt. Die Zelltrümmer wurden erneut in 100-200  $\mu$ l PBS aufgenommen und ein zweites Mal im Ultraschallgerät behandelt und zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt und anschließend der Titer bestimmt. Der Virusstock wurde bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

1 m.o.i. (multiplicity of infection) entspricht 1 Pfu (Plaque forming unit) pro Zelle

PBS :                            136 mM NaCl  
                                       2,6 mM KCl  
                                       8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                       1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                       pH 7,4

#### 2.4.3 Bestimmung des Titers eines Vaccinia-Virusstocks

CV-1-Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte mit 48 Vertiefungen ausgesät. Bedeckten die Zellen ca. 60% des Plattenbodens, so wurden sie mit Virus infiziert. Es wurden Verdünnungen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-10}$  hergestellt und die Zellen nach absaugen des Kulturüberstandes mit 100  $\mu$ l der Virusverdünnung infiziert. Nach Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$ , 7 % CO<sub>2</sub> für eine Stunde wurde 500  $\mu$ l Vollmedium pro Loch zugegeben. Die Platte wurde für 3 Tage inkubiert und die Verdünnung ausgezählt, welche die wenigsten Plaques zeigte. Der Titer wurde folgendermaßen bestimmt : Anzahl der gezählten Plaques x ausgezählte Verdünnung x 10 Pfu/ml.

## 2.5 Radio-Immunpräzipitation

Bei Verwendung von Vaccinia-Virus-infizierten Zellen für die Immunpräzipitation wurden die Zellen in 6 cm Kulturschalen mit einer m.o.i. von 5 infiziert und ca. 4 Stunden später metabolisch markiert. Bei Infektion mit zwei oder drei verschiedenen Vaccinia-Viren gleichzeitig wurde eine m.o.i. von 2 oder 3 für jedes Virus gewählt. Stabil transfizierte Zellen wurden verwendet, wenn ca. 80 % der Kulturschale bedeckt waren. Für die metabolische Markierung wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal in Labelmedium (RPMI ohne Cystein und Methionin) gewaschen und in 1 ml Labelmedium bei 37°C, 7 % CO<sub>2</sub> für 45 min. inkubiert. Anschließend wurde das Labelmedium abgenommen und 1 ml Labelmedium mit 100-200 µCi [<sup>35</sup>S]Cys/Met zugegeben. Der Einbau des radioaktiv markierten Cysteins und Methionins erfolgte bei 37°C, 7 % CO<sub>2</sub> für 30 bis 60 min. (Pulse). Sollten die zu untersuchenden Moleküle an die Zelloberfläche gelangen können, so wurden die Zellen nach der Markierung in DMEM-Vollmedium gewaschen und in 2 ml Vollmedium für 2 bis 4 Stunden inkubiert (Chase). Nach Beendigung der metabolischen Markierung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 1 ml Lysepuffer auf Eis für 10 min. inkubiert. Das Zellysate wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4°C und 12000 x g für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 50 µl Protein A-Sepharose für 45 min. in einem Rotor bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen zu adsorbieren. Das Zellysate wurde von der Protein A-Sepharose nach 30 sek. Zentrifugation abgenommen und mit primärem Antikörper (200 µl Hybridomüberstand, 3-10 µl Ascites, 10-15 µl affinitätschromatographisch aufgereinigtes Serum, 1-2 µg gereinigter Antikörper) bei 4°C für 1 Stunde im Rotor inkubiert. Die Immunkomplexe wurden für 45 min. mit 50 µl Protein A-Sepharose bei 4°C im Rotor präzipitiert und anschließend dreimal mit Puffer B, zweimal mit Puffer C und einmal mit Puffer D gewaschen. Es wurden 25 µl 1x SB zugegeben und die präzipitierten Proteine 5 min. bei 95°C von der Protein A-Sepharose gelöst. Nach Abkühlen wurden 5 µl Iodoacetamid (42,5 mg in 500 µl Aqua bidest) zugegeben und die Proteine im SDS-PAGE aufgetrennt.

Lysepuffer :                    1% Detergens (Igepal (v/v) oder Digitonin (w/v))  
                                      140 mM NaCl  
                                      5 mM MgCl<sub>2</sub>  
                                      20 mM Tris/HCl pH 7,6  
                                      1 mM PMSF

Puffer B : 0,2% Detergens (Igepal (v/v) oder Digitonin (w/v))  
 1 mM Tris/HCl pH 7,6  
 0,15 M NaCl  
 2 mM EDTA

Puffer C : 0,2% Detergens (Igepal (v/v) oder Digitonin (w/v))  
 1 mM Tris/HCl pH 7,6  
 0,5 M NaCl  
 2 mM EDTA

Puffer D : 10 mM Tris pH 8,0

1x SB (Sample Buffer) : 200 mM Tris/HCl pH8,8  
 1 M Saccharose  
 5 mM EDTA  
 0,01% (w/v) Bromphenolblau

Für das Aufkochen der Proben wurde angesetzt :  
 500 µl 1x SB, 25 µl DTT (154 mg/500 µl in Aqua bidest), 200 µl 20 % (w/v) SDS

## 2.6 Endoglykosidase H (Endo H) – Verdau

Wurden Glykoproteine mit dem Enzym Endoglykosidase H (Endo H) verdaut, so wurde das Immunpräzipitat in 30 µl 0,1 M β-Mercaptoethanol/ 1 % (w/v) SDS aufgenommen und für 5 min. bei 95 °C gekocht. 12 µl des Proteins wurden zu 12 µl Endo H-Puffer gegeben, der 10 mU Endo H enthält. 12 µl des Proteins wurden zu Endo H-Puffer ohne Enzym gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Durch Zugabe von 24 µl 2x SB wurde der Verdau gestoppt. Die Proben wurden bei 95 °C für 5 min. gekocht und nach Abkühlen und Zugabe von 10 µl Iodoacetamid (42,5 mg in 500 µl Aqua bidest) mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Endo H-Puffer : 0,1 M Natrium-Citrat pH 5,5  
 0,5% (w/v) PMSF

2x SB (Sample Buffer): 200 mM Tris/HCl pH 8,8  
 1 M Saccharose  
 5 mM EDTA  
 0,02% (w/v) Bromophenolblau

Für den Gelauftrag wurde angesetzt :  
 500 µl 2x SB, 50 µl DTT (154mg/500µl), 400 µl SDS (20%, w/v)

## 2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine wurden aus einer gebrauchsfertigen, gasstabilisierten, wässrigen 30% Acrylamid-/ 0,8% Bisacrylamidstammlösung ein 11,5-13,5%iges

denaturierendes Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) als Gradient gegossen. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag bei 95 °C für 5 min. aufgekocht (siehe 1.5 und 1.6). Der Gellauf erfolgte bei 15-25 mA in 1x Laufpuffer mit 0,1 % (w/v) SDS über Nacht. Nach dem Lauf wurden die Gele in 10 % Essigsäure und 30 % Methanol für 30 min. fixiert und anschließend bei 80 °C für 2 Stunden getrocknet (Biorad-Geltrockner). Es wurde ein Film exponiert und nach 1 bis 3 Tagen entwickelt (Optimax Entwicklermaschine).

Die Quantifizierung von <sup>35</sup>S-markierten Proteinbanden wurde durchgeführt, indem das getrocknete Polyacrylamidgel auf einem „Phosphor Screen“ (Molecular Dynamics) für 3-7 Tage exponiert wurde. Der „Phosphor Screen“ wurde auf einem Storm-860 (Molecular Dynamics) eingescannt und die Proteinbanden mit Hilfe des Programms ImageQuaNT (Molecular Dynamics) quantifiziert.

<u>Trenngel :</u>	<u>11,5% Lösung</u>	<u>13,5% Lösung</u>
Acrylamid/Bisacrylamid	15,3 ml	18 ml
2 M Tris/HCl pH 8,8	8,4 ml	8,4 ml
20 % (w/v) SDS	200 µl	200 µl
60 % (w/v) Saccharose	-	10 ml
Aqua bidest	16,08 ml	3,38 ml
TEMED	20 µl	20 µl
10 % (w/v) APS	120 µl	120 µl

<u>Sammelgel :</u>	
Acrylamid/Bisacrylamid	5 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	4 ml
20 % (w/v) SDS	150 µl
60 % (w/v) Saccharose	7 ml
Aqua bidest	14 ml
TEMED	15 µl
10 % (w/v) APS	150 µl

5x Laufpuffer :           2 M Glycin  
                                  0,25 M Tris

## 2.8 Fluoreszenzzytometrie

Zellen wurden mit Trypsin oder 5 mM EDTA/PBS (bei trypsinempfindlichen Oberflächenmolekülen) von der Kulturschale gelöst und in FACS-Puffer aufgenommen. Ca.  $5 \times 10^5$  Zellen pro Färbung wurden in ein FACS-Röhrchen (Polystyren von Becton Dickinson) pipettiert und einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden bei 4°C und 400 x g für 5 min. zentrifugiert. Sollte ein intrazelluläres Antigen nachgewiesen werden, so enthielten der FACS-Puffer und die Antikörper-Lösung 0,1 % (w/v) Saponin (Calbiochem, Nr. 558255).

Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im Restvolumen resuspendiert. Es wurden 100 µl des primären Antikörpers zugegeben, die Zellen gemischt und bei 4°C für 45 min. inkubiert. Die negative Kontrolle enthielt keinen Antikörper. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit entsprechendem FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper gemischt. Die Zellen wurden bei 4°C für 45 min. im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen und in 0,5 ml FACS-Puffer aufgenommen um im FACS Calibur – Durchflusszytometer (Becton Dickinson) gemessen zu werden.

Für die Experimente mit den MCMV-Virusmutanten, wurde eine Schale mit 6 cm Durchmesser, die zu ca. 80 % mit Zellen bewachsen war, mit 0,3 m.o.i. (multiplicity of infection) der MCMV-Mutante infiziert. Parallel wurde je eine Schale nicht infiziert und mit wildtyp-MCMV (ATCC VR-194, Zytomegalievirus der Maus, Stamm Smith) infiziert. Nach Zugabe des Virusstocks wurde das Medium in den Schalen auf 6 ml aufgefüllt und die Schalen in einer Zentrifuge bei 900 x g für 30 min. zentrifugiert, um die Infektion zu verbessern (ca. Faktor 10). Im Anschluss wurde das Zellkulturmedium erneuert und die Zellen für die angegebene Zeit im Brutschrank bei 37°C, 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Virusstocks der Mutanten wurden freundlicherweise von Sabine Linke und Markus Wagner zur Verfügung gestellt. Für die Färbung von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche wurden folgende Antikörper verwendet : SF1.1.1 (anti H-2K<sup>d</sup>), 34-2-12s (anti H-2D<sup>d</sup>), 28-14-8s (anti H-2L<sup>d</sup> und -L<sup>q</sup>), Y-3 (anti H-2K<sup>b</sup>), B22.249 (anti H-2K<sup>d</sup>), anti H-2K<sup>k</sup> v. Pharmingen (anti H-2K<sup>k</sup>).

1 m.o.i. entspricht 1 Pfu (Plaque forming unit) pro Zelle

PBS :                    136 mM NaCl  
                             2,6 mM KCl  
                             8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                             1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                             pH 7,4

FACS-Puffer : 2% (v/v) FCS / 0,03% (w/v) Na-Azit in PBS

Primärer Antikörper : Hybridomüberstand unverdünnt. Ascites oder gereinigter Antikörper 1:50 oder 1:100 in FACS-Puffer verdünnt.

Sekundärer Antikörper : FITC-gekoppelte anti-Maus oder anti-Kaninchen Antikörper 1:75, bzw. 1:100 verdünnt in FACS-Puffer.

## 2.9 Konfokale Laserscannmikroskopie

Die intrazelluläre Lokalisation von H-2-Antigen und m152/gp40 wurde mit Hilfe einer Doppelimmunfluoreszenz-Färbung und anschließender Untersuchung am konfokalen Laserscannmikroskop nachgewiesen. Sie wurden auf runde Deckgläser (12 mm Durchmesser, Roth) ausplattiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und 20 min. in 3 % (w/v) Paraformaldehyd/PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und 10 min. in einer Ammoniumchlorid/Glycin-Lösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen zur Permeabilisierung in 0,2 % (v/v) Triton X-100/PBS für 8 min. inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen, 10 min. in 0,2 % (v/v) Gelatine/PBS stabilisiert und anschließend mit dem primären Antikörper für 1 Stunde inkubiert. Es wurden folgende Antikörper-Verdünnungen (in 0,2 % Gelatine/PBS) eingesetzt : R1.21.1 – unverdünnt; p11 Kaninchenserum - 1:5; PDI – unverdünnt; Calreticulin – 1:300; anti-p58 - 1:100; Rab6 – 1:50. Nach viermaligem Waschen wurden die Zellen in 0,2 % Gelatine für 10 min. stabilisiert und anschließend mit sekundärem Antikörper inkubiert. Der entsprechende sekundäre Antikörper war FITC- oder Rhodamin-gekoppelt und wurde 1:50 in 0,2 % Gelatine/PBS verdünnt und für 1 Stunde im Dunkeln inkubiert. Zur Anfärbung saurer, zellulärer Vesikel (Endosomen/Lysosomen) wurden die Zellen vor der Fixierung für 30 min. mit DAMP (1:1000) im Medium inkubiert und anschließend für 45 min. in gewöhnlichem Kulturmedium inkubiert (Orci et al., 1994). DAMP wurde durch einen Texas Red-X-konjugierten sekundären Antikörper gegen Dinitrophenyl-KLH nachgewiesen. Die Zellen wurden viermal mit PBS gewaschen und mit „*Histosafe*“ (Cammon) auf einem Objektträger eingebettet und am Laserscannmikroskop (Leika) untersucht.

PBS :	136 mM NaCl 2,6 mM KCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
Fixierung :	3% (w/v) Paraformaldehyd in PBS
Quench-Lösung :	50 mM NH <sub>4</sub> Cl 20 mM Glycin in PBS
Permeabilisierung :	0,2% (v/v) Triton X-100 in PBS
Stabilisierung :	0,2% (v/v) Teleostier-Gelatine (Sigma) in PBS

### 3 ERGEBNISSE

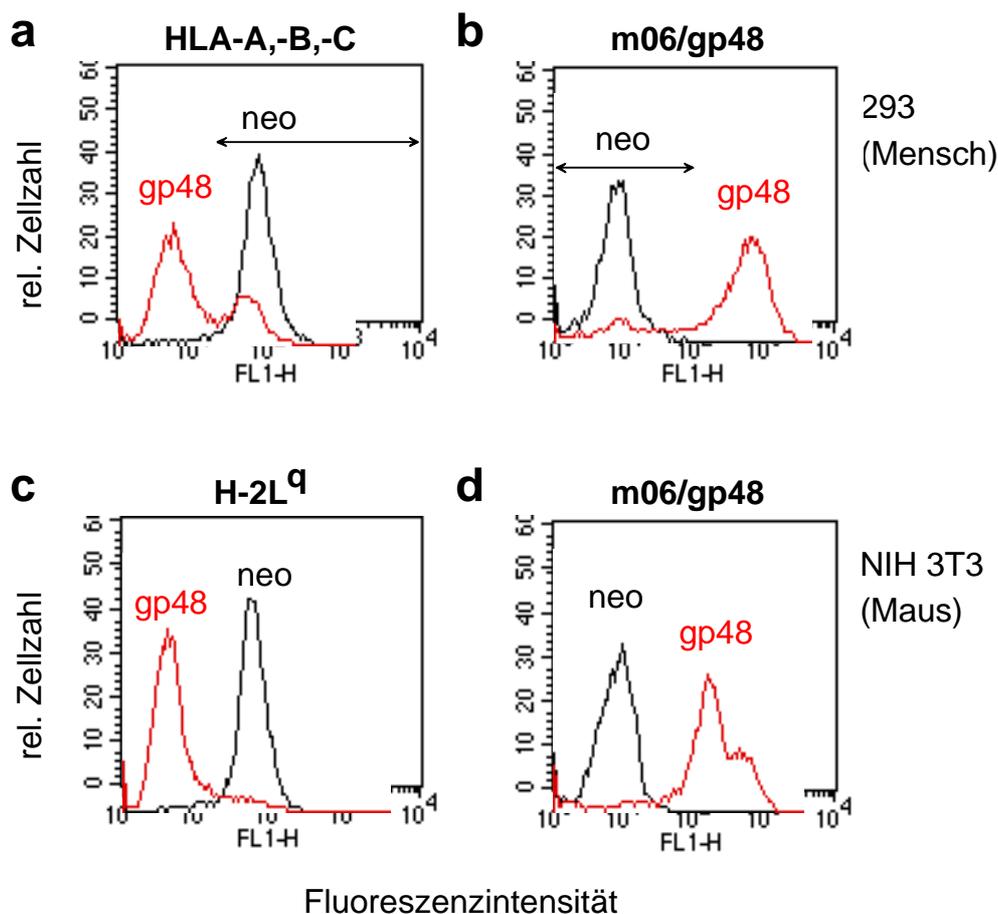
#### 3.1 Transportinhibition von MHC-Klasse-I-Molekülen von Mensch und Maus durch m06/gp48 und m152/gp40

Das Wirtsspektrum der Zytomegalieviren ist auf eine Spezies begrenzt und das Virus hat sich im Laufe der Koevolution an seinen Wirtsorganismus angepasst. Die immunsubversiven Mechanismen, welche MHC-Klasse-I-Moleküle betreffen, sind aber bei HCMV und MCMV teilweise ähnlich und die viralen Proteine erkennen auch MHC-Klasse-I-Moleküle der jeweils anderen Spezies. Die von HCMV kodierten Proteine US2 und US11 zum Beispiel inhibieren auch MHC-Klasse-I-Moleküle der Maus im Transport (Machold et al., 1997). Im Gegensatz dazu unterscheidet das von MCMV kodierte Protein m152/gp40 zwischen MHC-Klasse-I-Molekülen der Maus und des Menschen und inhibiert den Transport von HLA-Antigenen nicht (Ziegler et al., 1997). Für das MCMV-Genprodukt von m06/gp48 weiß man bisher nicht, ob es auch humane MHC-Klasse-I-Moleküle erkennt. Zunächst wurde die speziesspezifische Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m06/gp48 untersucht. Die bereits gezeigte speziesspezifische Transportinhibition von H-2-Antigenen der Maus durch m152/gp40 wurde anschließend in verschiedenen Zelllinien überprüft.

##### 3.1.1 *Das MCMV-Protein m06/gp48 inhibiert MHC-Klasse-I-Moleküle von Mensch und Maus im Transport*

Um zu prüfen, ob das Protein m06/gp48 von MCMV auch humane MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen und deren Oberflächenexpression reduzieren kann, wurden humane 293-Zellen, die das Protein m06/gp48 stabil exprimieren (z. Verfügung gestellt von U. Reusch) untersucht. 293gp48-Zellen wurden mit einem Antikörper gegen HLA-Antigene gefärbt und im Durchflusszytometer auf eine Änderung der Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen untersucht. Parallel wurden Mauszellen (NIH 3T3), die m06/gp48 stabil exprimieren (Reusch et al., 1999), untersucht. Eine intrazelluläre Färbung mit einem Antikörper gegen das virale Protein m06/gp48 bestätigte die Expression des viralen Proteins in den stabilen Transfektanten (Abb. 4 b und d). Es ist erkennbar, dass sowohl MHC-Klasse-I-Moleküle des Menschen (Abb. 4 a, rot) als auch der Maus (Abb. 4 c, rot) in reduzierter Menge an der Zelloberfläche exprimiert werden, wenn das virale Protein m06/gp48 exprimiert wurde. Die 293gp48-Transfektante zeigt zwei Populationen von Zellen mit

unterschiedlich starker HLA-Oberflächenexpression (Abb. 4 a). Die Population von Zellen, die noch viel HLA-Antigen auf der Zelloberfläche exprimiert (Abb. 4 a, schwarzer Pfeil), entspricht ungefähr der Population, die weniger m06/gp48 als die größte Population exprimiert (Abb. 4 b, schwarzer Pfeil). Dies erklärt die fehlende Reduktion von MHC-Klasse-I-Molekülen bei der Population in Abb. 4 a. Also kann das virale Protein m06/gp48 sowohl MHC-Klasse-I-Moleküle der Maus als auch des Menschen erkennen und deren Oberflächenexpression reduzieren.



**Abb. 4 M06/gp48 reduziert die Oberflächenexpression von humanen MHC-Klasse-I-Molekülen.**

293gp48 und NIH3T3gp48-Transfektanten, sowie Kontrolltransfektanten (neo) wurden auf die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen im Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist die Fluoreszenzintensität des spezifischen Antikörpers für gp48-Transfektanten (rot) im Vergleich zu Kontrolltransfektanten (schwarz). Die humanen Allele HLA-A,-B und -C wurden mit dem mAK W6/32 nachgewiesen (a), das Allel H-2L<sup>q</sup> der Maus mit dem mAK 28-14-8s (c). Eine Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in gp48-Transfektanten (rot) ist sowohl für die humanen (a) als auch für die MHC-Moleküle der Maus (b) zu erkennen. Die m06/gp48-Expression wurde mit dem mAK Croma 231 in einer intrazellulären Färbung überprüft (b und d). Die Zellpopulation mit hoher MHC-Klasse-I-Expression in 293-Transfektanten (a, schwarzer Pfeil) entspricht ungefähr der Population von Transfektanten, die weniger m06/gp48 exprimiert als die größte Population (b, schwarzer Pfeil).

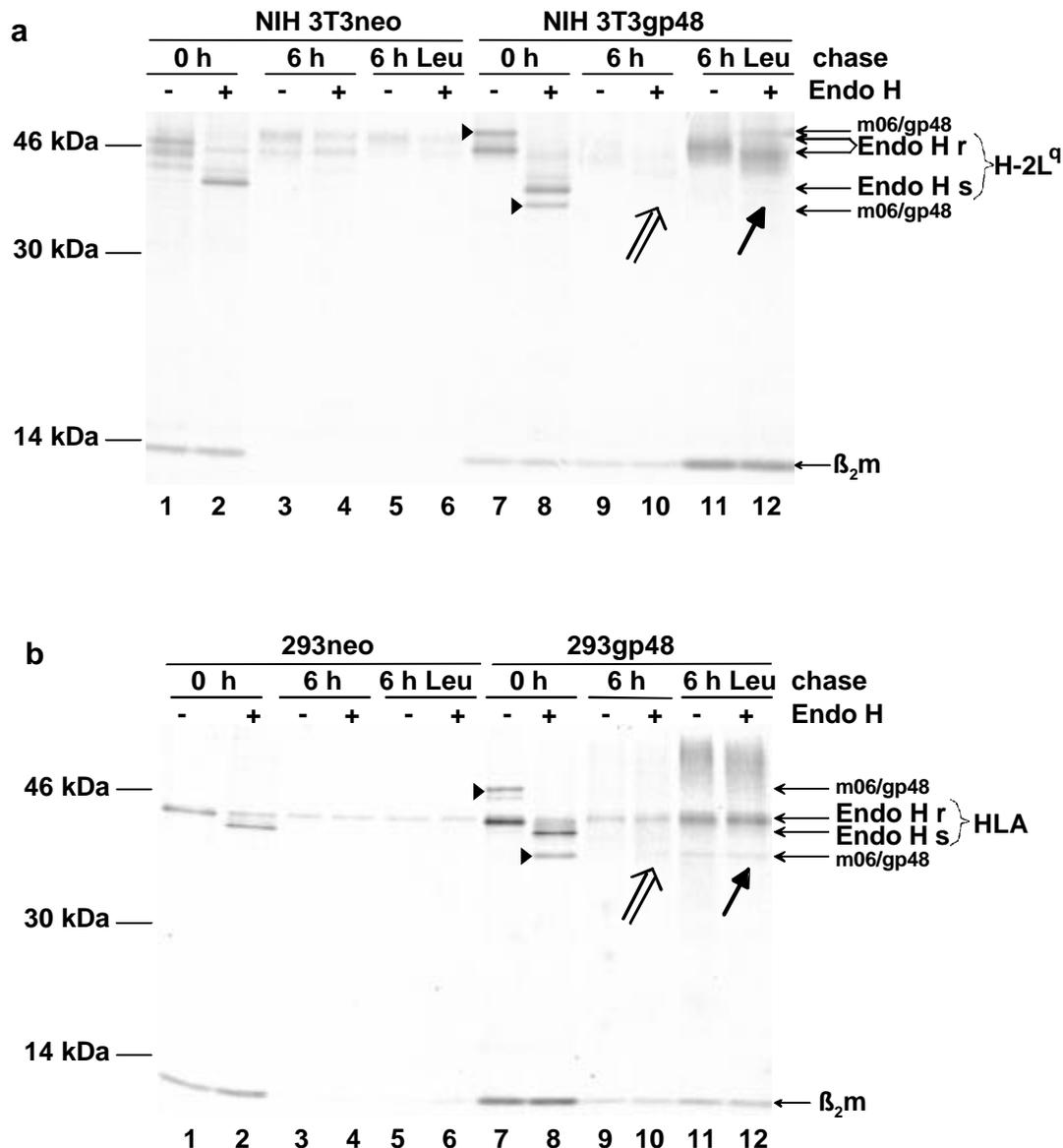
Der Mechanismus der Reduktion von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m06/gp48 wurde bereits identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass m06/gp48 an MHC-Klasse-I-Moleküle bindet und mit diesen in ein endosomal/lysosomales Kompartiment gelangt, wo beide Moleküle abgebaut werden (Reusch et al., 1999). Dies wurde in der Immunpräzipitation dargestellt und hier mit den gleichen Transfektanten wiederholt. Zu diesem Zweck wurde der Verlust von radioaktiv markiertem H-2L<sup>q</sup> in NIH 3T3-Zellen untersucht, welches in Gegenwart von m06/gp48 nach einer Reifungsdauer von 6 Stunden abgebaut ist (Abb. 5 a, weißer Pfeil). Wurde Leupeptin, ein Proteaseinhibitor, zu dem Ansatz gegeben, so wurde der Abbau der MHC-Klasse-I-Moleküle verhindert (Abb. 5 a, schwarzer Pfeil). Wurde kein m06/g48 in den Zellen exprimiert (NIH 3T3neo), so sind sowohl mit, als auch ohne Leupeptin ähnliche Mengen H-2L<sup>q</sup> nachweisbar (Abb. 5 a). In den NIH 3T3gp48-Transfektanten kopräzipitiert m06/gp48 mit den MHC-Klasse-I-Molekülen (Abb. 5 a, schwarze Dreiecke).

Wurden humane 293gp48-Transfektanten in der Immunpräzipitation untersucht, so sieht man ebenfalls einen Verlust der MHC-Klasse-I-Moleküle (Abb. 5 b, weißer Pfeil), die durch Zugabe von Leupeptin verhindert wurde (Abb. 5 b, schwarzer Pfeil). Der Vergleich mit 293neo-Zellen zeigt, dass die MHC-Klasse-I-Moleküle in diesen Zellen nicht abgebaut wurden (Abb. 5 b). Auch die Kopräzipitation von m06/gp48 (schwarze Dreiecke) mit MHC-Klasse-I-Molekülen konnte gezeigt werden.

In der 293neo-Transfektante, die kein m06/gp48 exprimiert, ist nach 6 Stunden Reifung kein  $\beta_2$ -Mikroglobulin nachweisbar (Abb. 5 a u. b, Spuren 3-6). Dies kann so erklärt werden, dass die MHC-Klasse-I-Moleküle die Zelloberfläche erreicht haben und dort ein Austausch von radioaktiv markiertem  $\beta_2$ m aus der Zelle gegen nicht radioaktiv markiertes  $\beta_2$ m aus dem Kulturmedium stattgefunden hat.

Der Verdau mit dem Enzym Endoglykosidase H (Endo H) zeigt, ob die MHC-Klasse-I-Moleküle im Golgi prozessiert wurden. Endo H kann nur N-Glykane des „*high-mannose*“ Typs, wie sie im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und *cis*-Golgi vorkommen, hydrolysieren (Kornfeld und Kornfeld, 1985; Tarentino und Plummer-TH, 1994). Dies ist erkennbar durch eine Änderung des Laufverhaltens von Glykoproteinen nach Behandlung mit Endo H (Abb. 5 a und b, Spur 1 und 2). Zuckerreste von Glykoproteinen, die durch ein bestimmtes Enzym im *medialen* Golgi modifiziert wurden, können durch das Enzym Endo H nicht gespalten werden. In Abb. 5 a und b (Spur 3-6) sind die MHC-Klasse-I-Moleküle nach 6 Stunden Reifung Endo H-resistent und folglich im Golgi prozessiert worden.

Es kann zusammengefasst werden, dass das virale Protein m06/gp48 sowohl MHC-Klasse-I-Moleküle der Maus als auch des Menschen erkennt und deren Abbau vermittelt, was zu einer reduzierten Oberflächenexpression der MHC-Klasse-I-Moleküle führt.



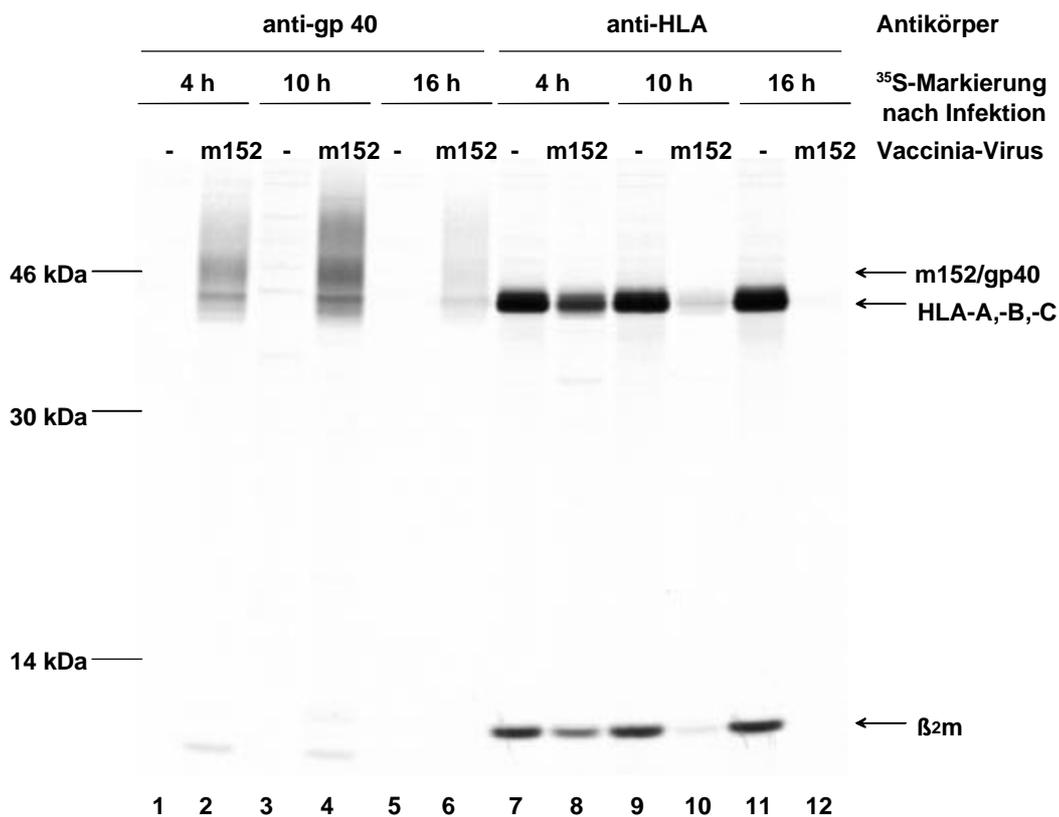
**Abb. 5 M06/ gp48 bewirkt den Abbau von humanen sowie Maus-MHC-Klasse-I-Molekülen.**

NIH 3T3gp48- (a) und 293gp48-Transfektanten (b) wurden 30 min. mit [<sup>35</sup>S]Cys/Met metabolisch markiert. Ein Ansatz wurde mit 1% Digitonin-Lysepuffer direkt nach der Markierung (0 h) lysiert, um nicht prozessierte Moleküle zu erkennen. Zwei weitere Ansätze wurden nach 6 Stunden Inkubation mit nicht radioaktivem Medium lysiert, um die Reifung der Moleküle zu untersuchen. Die Reifung wurde nach Zugabe von 200 μm Leupeptin (6 h Leu) und ohne Leupeptin (6 h), ein Proteaseinhibitor, untersucht. H-2L<sup>q</sup> wurde mit dem mAK 28-14-8s (a), HLA-A,-B,-C mit dem mAK W6/32 (b) präzipitiert. Das Präzipitat wurde geteilt und entweder mit Endo H (+) oder ohne das Enzym (-) behandelt. Die Proteine wurden auf einem 11-13% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Der Abbau der MHC-Klasse-I-Moleküle durch m06/gp48 ohne Leupeptin (a u. b, Spuren 9+10, weißer Pfeil) kann in NIH 3T3- (a) und in 293-Zellen (b) beobachtet werden. Durch Zugabe von Leupeptin (a u. b, Spuren 11+12, schwarzer Pfeil) ist der Abbau der MHC-Klasse-I-Moleküle inhibiert. Wird kein m06/gp48 exprimiert, so werden die MHC-Klasse-I-Moleküle nicht abgebaut (a u. b, Spuren 3-6). M06/gp48 kann mit MHC-Klasse-I kopräzipitiert werden (a u. b, schwarzes Dreieck, Spuren 7+8). r : Endo H resistent ; s : Endo H sensitiv.

### 3.1.2 Humane MHC-Klasse-I-Moleküle werden durch m152/gp40 nicht im Transport gehemmt

Die speziesspezifische Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m152/gp40 wurde bereits in humanen Zellen untersucht. In LC5-K<sup>d</sup>-Transfektanten wurden die H-2K<sup>d</sup> Moleküle durch m152/gp40 im Transport gehemmt (Ziegler et al., 1997). Ob dies auch auf andere MHC-Klasse-I-Moleküle in verschiedenen Zelllinien zutrifft wurde im Folgenden untersucht. Es wurden die Allele HLA-B7, HLA-A2 und H-2K<sup>b</sup> für die Untersuchung dieser Frage gewählt.

Die zu untersuchenden MHC-Klasse-I-Moleküle wurden in den verschiedenen Zelllinien entweder stabil oder mittels Infektion mit einem rekombinanten Vaccinia-Virus exprimiert. Das virale Protein m152/gp40 wurde mit Hilfe eines rekombinanten Vaccinia-Virus exprimiert (Ziegler et al., 1997). Vaccinia-Viren bewirken während ihres Replikationszyklus eine Blockade der Synthese zellulärer Proteine („*host cell shutoff*“). Daher wurde zunächst der optimale Zeitpunkt ermittelt, zu dem sowohl m152/gp40 als auch MHC-Klasse-I-Moleküle effizient synthetisiert werden. HeLa-Zellen wurden mit Vaccinia-Virus infiziert, das m152/gp40 exprimiert, und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion radioaktiv markiert. Die Ansätze wurden nach der Markierung für 4 Stunden in nicht radioaktivem Medium inkubiert um eine Reifung der Moleküle zu erlauben. Es wurden m152/gp40 und MHC-Klasse-I-Moleküle aus den Lysaten infizierter und nicht infizierter Zellen präzipitiert und die Menge der präzipitierten Moleküle miteinander verglichen. Die m152/gp40 Expression ist nach 10 Stunden Infektion optimal (Abb. 6, Spur 4). Dagegen ist die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen nach 4 Stunden Infektion optimal (Abb. 6, Spur 8) und nimmt 10 Stunden nach Infektion deutlich ab (Abb. 6, Spur 10). In der Spur links daneben wurden jeweils Zellen untersucht, die nicht infiziert waren und deutlich mehr MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren. Um nach Vaccinia-Virusinfektion noch genug MHC-Klasse-I-Moleküle nachweisen zu können, wurde eine Infektionsdauer von 4 Stunden bis zur radioaktiven Markierung für die folgenden Versuche gewählt. Zu diesem Zeitpunkt sind sowohl m152/gp40 als auch MHC-Klasse-I-Moleküle gut nachweisbar.



**Abb. 6** Der Nachweis von MHC-Klasse-I-Molekülen und m152/gp40 ist nach 4 Stunden Vaccinia-Virusinfektion in HeLa-Zellen optimal.

HeLa-Zellen wurden für die angegebene Zeitdauer mit m152/gp40-exprimierendem Vaccinia-Virus infiziert (m152), bzw. nicht infiziert (-). Die Zellen wurden 20 min. mit [<sup>35</sup>S]Cys/Met metabolisch markiert, anschließend in nicht radioaktivem Medium inkubiert und in Igepal-Lysepuffer lysiert. HLA-Moleküle wurden mit dem mAK W6/32 und m152/gp40 mit dem Serum p11 präzipitiert. Die Proteine wurden auf einem 11-13% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Die m152/gp40-Expression ist 10 Stunden nach Infektion optimal (Spur 4), wohingegen MHC-Klasse-I-Moleküle nach 10 Stunden Infektion (Spur 10) nur noch in geringen Mengen synthetisiert werden, aber nach 4 Stunden Infektion (Spur 8) noch gut detektierbar ist.

Es wurde untersucht, ob H-2K<sup>b</sup>-Moleküle der Maus und HLA-B7-Moleküle des Menschen in HeLa-Zellen von m152/gp40 in gleicher Weise zurückgehalten werden wie in LC5-Zellen. HeLa-Zellen wurden stabil mit H-2K<sup>b</sup> und HLA-B7 transfiziert. Das genomische Konstrukt von H-2K<sup>b</sup> (pBSV 328 2/Eco) wurde mit einem Plasmid kotransfiziert, das für eine Neomycin-Resistenz kodiert (pGCneo635). Das genomische Konstrukt von HLA-B7 (pTM-B7, siehe 1.2.5) enthält ein Neomycin-Resistenzgen. Nach der Selektion von Klonen mit Geneticin wurden die stabilen Transfektanten durch Färbung mit einem spezifischen Antikörper (H-2K<sup>b</sup>: B8-24-3s, HLA-B7: ME1) auf Oberflächenexpression des Moleküls im Durchflusszytometer getestet. Die erhaltenen Transfektanten HeLa-K<sup>b</sup> und HeLa-B7 wurden

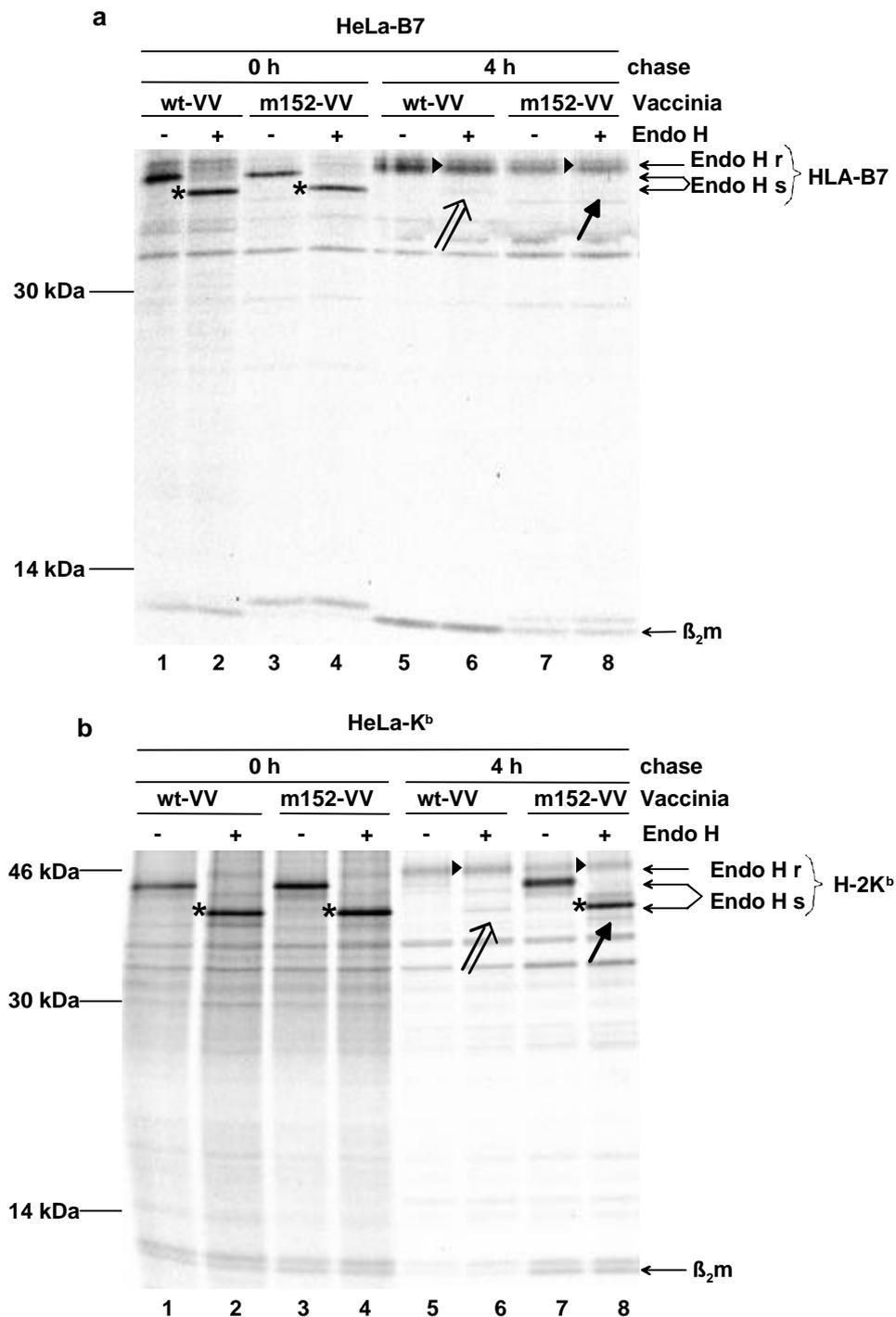
mit rekombinantem Vaccinia-Virus infiziert, das m152/gp40 exprimiert. Die Zellen wurden radioaktiv markiert und die Reifung der Moleküle über einen Zeitraum von 4 Stunden (chase) mittels Endo H-Verdau untersucht. Parallel wurden MHC-Klasse-I-Moleküle in Zellen untersucht, die mit Wildtyp-Vaccinia-Virus infiziert wurden. HLA-B7 Moleküle sind nach 4 Stunden Reifungszeit dem Enzym Endo H gegenüber resistent und auf dem Gel ist keine Größenänderung der Bande zu sehen (Abb. 7 a, weißer Pfeil). Endo H-sensitive HLA-B7-Moleküle sind in Spur 2 und 4 durch ein Sternchen gekennzeichnet. Wurde in den Zellen m152/gp40 exprimiert, so wird HLA-B7 trotzdem Endo H-resistent (Abb. 7 a, schwarzer Pfeil), also nicht durch m152/gp40 zurückgehalten. Die H-2K<sup>b</sup>-Moleküle dagegen werden von m152/gp40 zurückgehalten und zeigen ein geändertes Laufverhalten im SDS-PAGE nach Endo H-Verdau (Abb. 7 b, schwarzer Pfeil), das dem Laufverhalten der Endo H-sensitiven Moleküle in Spur 2 und 4 entspricht (Sternchen). Wird kein m152/gp40 in den Zellen exprimiert, so reifen die H-2K<sup>b</sup>-Moleküle und werden Endo H-resistent (Abb. 7 b, weißer Pfeil).

Die Endo H-resistente Bande von H-2K<sup>b</sup> ist schwächer als die von zurückgehaltenen Molekülen (Abb. 4 b, Spuren 6 u. 8). Da die Anzahl radioaktiv markierter Moleküle im Zellysat zuvor angeglichen wurde, ist die Ursache dafür nicht ein Unterschied in der Menge an aufgetragenen Molekülen. Möglicherweise erkennt der Antikörper die veränderte Glykosylierung der MHC-Klasse-I-Moleküle nach der Prozessierung im Golgi und kann die reifen Moleküle nicht so gut präzipitieren.

Kurz über der Bande des  $\beta_2$ -Mikroglobulin läuft eine zweite Bande, deren Ursprung unbekannt ist (Abb. 7 a u. b). Diese Bande tritt nur in HeLa-Transfektanten auf. Sie steht aber nicht in Zusammenhang mit der Infektion einer bestimmten Vaccinia-Rekombinanten, da die Bande sowohl nach Wildtyp- als auch nach m152-Vaccinia-Virusinfektion auftritt. Es scheint sich um ein Protein zu handeln, das nur in HeLa-Zellen vorkommt und mit MHC-Klasse-I-Molekülen kopräzipitiert.

Die Hemmung des Transports von H-2K<sup>b</sup> der Maus durch m152/gp40 konnte in HeLa-Zellen bestätigt werden, wohingegen HLA-B7 des Menschen in HeLa-Zellen nicht von m152/gp40 zurückgehalten wird.

Eine weitere humane Zelllinie wurde darauf untersucht, ob MHC-Klasse-I-Moleküle der Maus und des Menschen von m152/gp40 unterschiedlich erkannt werden: humane Lungenfibroblasten LC5. LC5-Zellen exprimieren homozygot die Allele HLA-A\*6802, -B\*1503 und -C\*1203, so dass das Allel HLA-A2 in diesen Zellen mit einem spezifischen



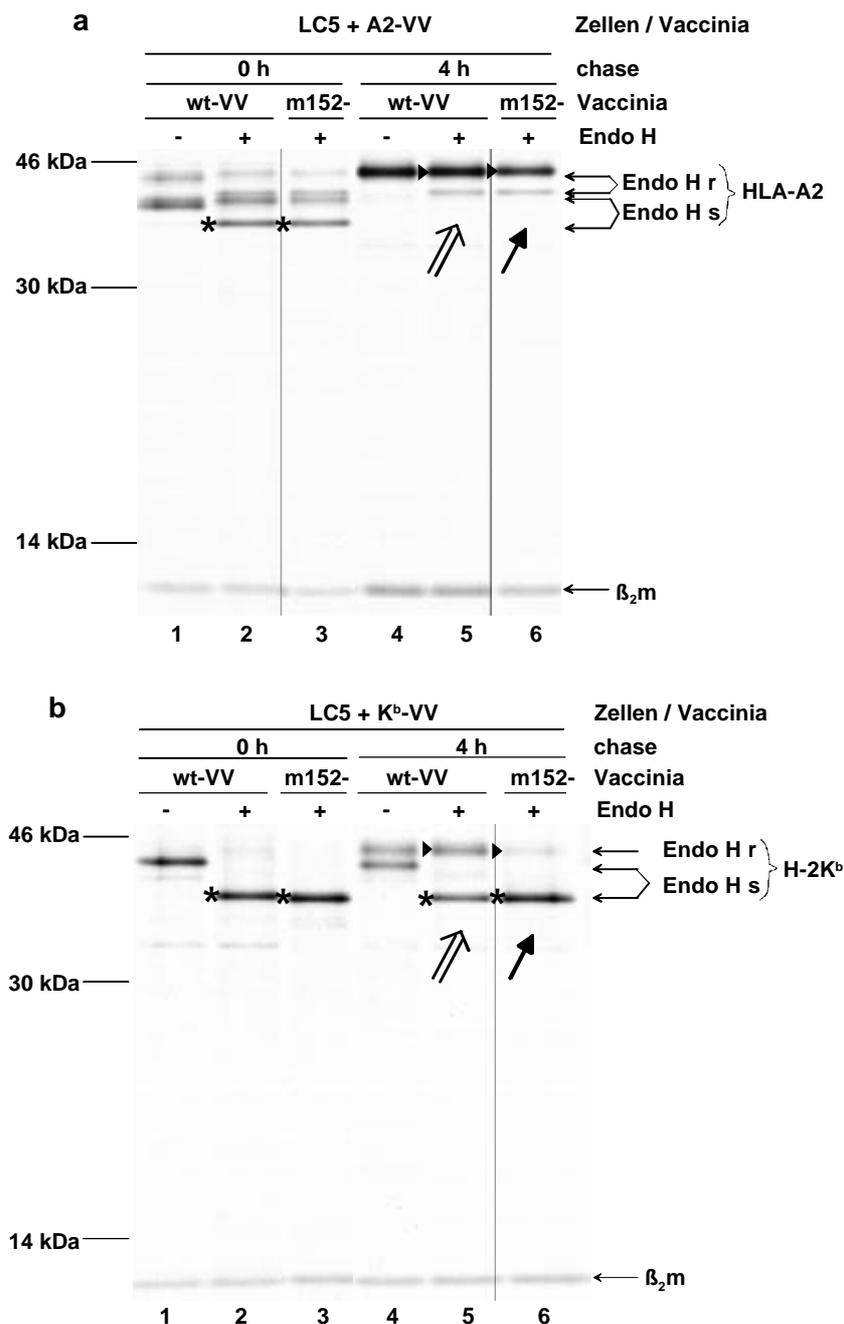
**Abb. 7 In HeLa-Zellen wird H-2K<sup>b</sup>, nicht aber HLA-B7 durch m152/gp40 zurückgehalten.**

HeLa-Transfektanten, die HLA-B7 (a) oder H-2K<sup>b</sup> (b) exprimieren, wurden mit Wildtyp-Vaccinia (wt-VV) oder einem m152/gp40 exprimierenden Vaccinia-Virus infiziert (m152-VV). Die Zellen wurden 30 min. mit [<sup>35</sup>S]Cys/Met metabolisch markiert und im Anschluss (0 h) oder nach 4 h Reifungszeit (4 h) in Igepal-Lysepuffer lysiert. HLA-B7 wurde mit dem mAK ME1 und H-2K<sup>b</sup> mit dem mAK B8-24-3s präzipitiert. Das Präzipitat wurde geteilt und mit Endo H(+) oder ohne das Enzym (-) behandelt. Die Proteine wurden auf einem 11-13% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Endo H-sensitive Moleküle sind durch ein Sternchen markiert, Endo H-resistente durch ein schwarzes Dreieck. Nach 4 Stunden Reifungsdauer sind die MHC-Moleküle nach Wildtyp-Vaccinia-Infektion Endo H-resistent (a u, b, Spur 6). Wird m152/gp40 in den Zellen exprimiert, so können HLA-B7-Moleküle reifen (a, Spur 8), H-2K<sup>b</sup>-Moleküle bleiben aber Endo H-sensitiv (b, Spur 8). r, Endo H resistent ; s, Endo H sensitiv.

Antikörper erkannt werden kann. Die Typisierung des Haplotyps von LC5-Zellen wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Albert (Labor f. Immungenetik, Kinderpoliklinik, München) durchgeführt. Die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle in den LC5-Zellen fand mittels rekombinanter Vaccinia-Viren statt. M152/gp40 wurde ebenfalls durch ein rekombinantes Vaccinia-Virus exprimiert. Die Reifung von HLA-A2 ist nach Wildtyp-Vaccinia-Infektion und nach m152-Vaccinia-Virusinfektion nicht behindert (Abb. 8 a, weißer Pfeil, bzw. schwarzer Pfeil). H-2K<sup>b</sup>-Moleküle werden nach 4 Stunden Reifungszeit während der Wildtyp-Vaccinia-Virusinfektion nicht alle reif (Abb. 8 b, weißer Pfeil) und ein großer Teil von H-2K<sup>b</sup> bleibt Endo H-sensitiv. Wird in den Zellen m152/gp40 exprimiert, so ist ein deutlich größerer Anteil von H-2K<sup>b</sup>-Molekülen Endo H-resistent (Abb. 8 b, schwarzer Pfeil). Die Mehrheit der Moleküle wurde durch m152/gp40 am Transport durch den Golgi gehindert. Es werden in der humanen Zelllinie LC5 HLA-A2-Moleküle des Menschen nicht durch m152/gp40 im Transport gehemmt, jedoch die Majorität der H-2K<sup>b</sup>-Moleküle der Maus.

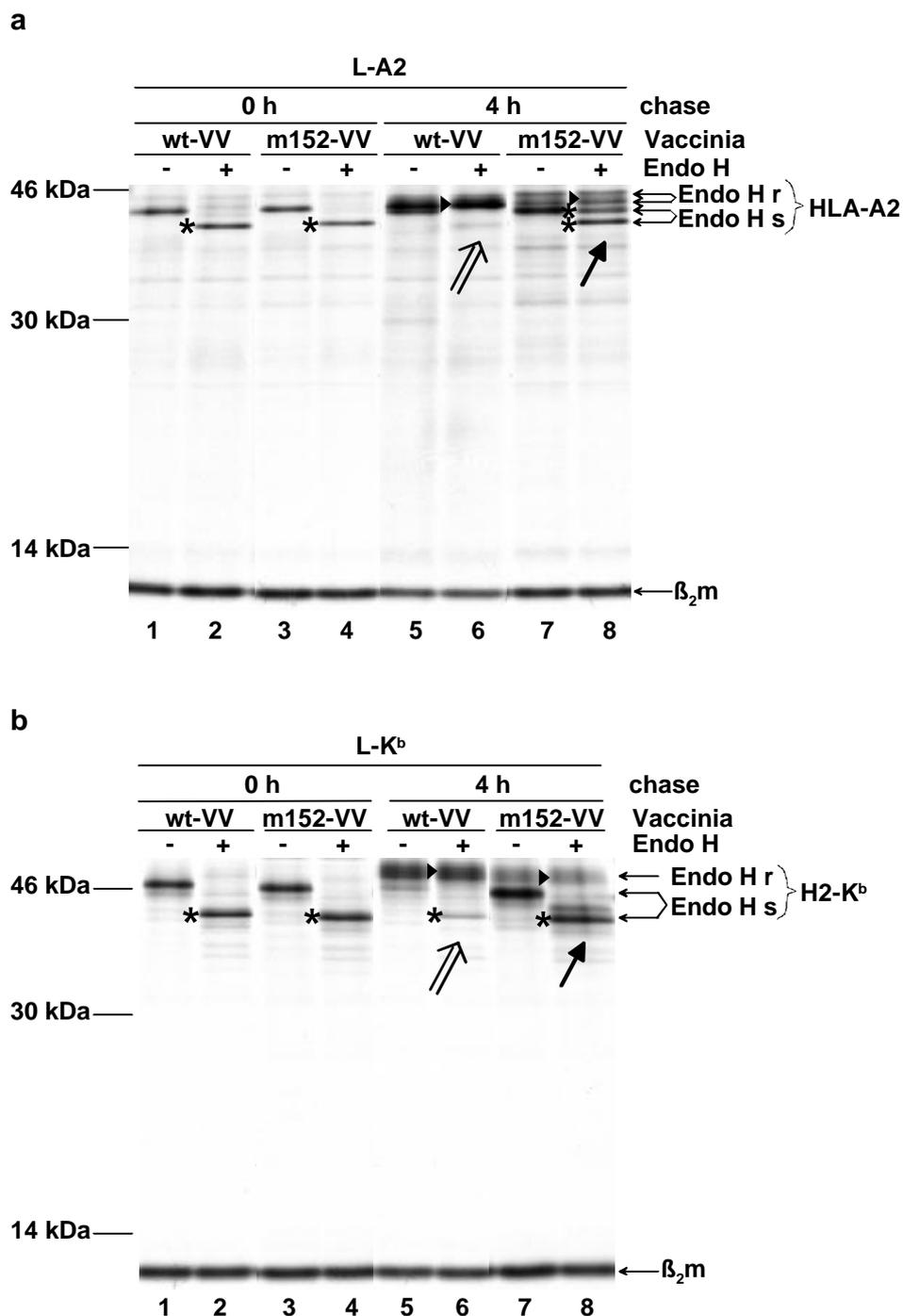
Nachdem das Verhalten von MHC-Klasse-I-Molekülen in humanen Zellen untersucht worden ist und sich bestätigt hat, dass H-2K<sup>b</sup> von m152/gp40 zurückgehalten wird, HLA-A2 und-B7 aber nicht, wurde im Folgenden eine Maus-Zelllinie untersucht. Bisher waren in Mauszellen die MHC-Klasse-I-Moleküle H-2K<sup>d</sup> (B12-Zellen) und H-2L<sup>d</sup> (L-Zellen), sowie HLA-B27 (Th-1-Zellen) untersucht worden (Ziegler et al., 1997; Ziegler et al, 2000). Die in Th-1-Zellen exprimierten HLA-B27-Moleküle wurden von m152/gp40 nicht zurückgehalten. Im folgenden Versuch wurde die Maus-Zelllinie Ltk<sup>-</sup> verwendet, um den Effekt von m152/gp40 auf H-2K<sup>b</sup> und HLA-A2 zu untersuchen. Stabile Transfektanten, die H-2K<sup>b</sup>, bzw. HLA-A2 exprimieren (Samberg et al., 1989), wurden mit rekombinantem Vaccinia-Virus infiziert, das m152/gp40 exprimiert, und die Reifung der MHC-Klasse-I-Moleküle untersucht. Wird in den L-A2-Transfektanten m152/gp40 exprimiert, so wird ein großer Teil von HLA-A2 im Transport gehemmt und bleibt Endo H-sensitiv (Abb. 9 a, schwarzer Pfeil, mit Sternchen markierte Banden). In Abbildung 9 b wurden L-K<sup>b</sup>-Transfektanten untersucht, in denen die H-2K<sup>b</sup>-Moleküle der Maus nach 4 Stunden Reifungszeit von m152/gp40 akkumulieren (Abb. 9 b, schwarzer Pfeil und Sternchen).

In der Maus-Zelllinie Ltk<sup>-</sup> werden also HLA-A2-Moleküle durch m152/gp40 zurückgehalten. Dies unterscheidet sich von dem Befund in humanen Zellen, in denen HLA-Moleküle durch m152/gp40 nicht im Transport gehemmt werden.



**Abb. 8** HLA-A2 wird, anders als H-2K<sup>b</sup>, in LC5-Zellen nicht durch m152/gp40 zurückgehalten.

LC5-Zellen wurden mit Vaccinia-Virus infiziert, das HLA-A2 (a, A2-VV) oder H-2 K<sup>b</sup> (b, K<sup>b</sup>-VV) exprimiert. Zusätzlich wurde mit Wildtyp-Vaccinia (wt-VV) oder m152-Vaccinia (m152-VV) infiziert. Die Zellen wurden 30 min. mit [<sup>35</sup>S]Cys/Met metabolisch markiert und im Anschluss (0 h) oder nach 4 h Reifungszeit (4 h) in Igepal-Lysepuffer lysiert. HLA-A2 wurde mit dem mAK MA2.1 und H-2K<sup>b</sup> mit dem mAK B8-24-3s präzipitiert. Das Präzipitat wurde geteilt und mit Endo H (+) oder ohne das Enzym (-) behandelt. Die Proteine wurden auf einem 11-13% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Endo H-sensitive Moleküle sind durch ein Sternchen markiert, Endo H-resistente durch ein schwarzes Dreieck. HLA-A2 ist nach 4 Stunden Reifung sowohl nach wt-Vaccinia-Virusinfektion (a, weißer Pfeil) als auch nach m152-Vaccinia-Virusinfektion (b, schwarzer Pfeil) Endo H-resistent. H-2K<sup>b</sup> ist nach 4 Stunden Reifung und Wildtyp-Vaccinia-Virusinfektion nicht vollständig Endo H-resistent (b, weißer Pfeil). Die Menge an Endo H-resistenten Molekülen nach m152-Vaccinia-Virusinfektion (b, schwarzer Pfeil) ist stark reduziert und deutet auf eine Transportinhibition von H-2K<sup>b</sup> durch m152/gp40 hin. r, Endo H resistent ; s, Endo H sensitiv.



**Abb. 9** In Ltk<sup>-</sup>-Zellen der Maus wird HLA-A2 durch m152/gp40 zurückgehalten.

Ltk<sup>-</sup>-Transfektanten, die HLA-A2 (a, L-A2), bzw. H-2K<sup>b</sup> (b, L-K<sup>b</sup>) exprimieren, wurden mit Wildtyp-Vaccinia (wt-VV) oder einem m152 exprimierenden Vaccinia-Virus (m152-VV) infiziert. Die Zellen wurden 30 min. mit [<sup>35</sup>S]Cys/Met metabolisch markiert und im Anschluss (0 h) oder nach 4 h Reifungszeit (4 h) in Igepal-Lysepuffer lysiert. HLA-A2 wurde mit dem mAK B9.12.1 und H-2K<sup>b</sup> mit dem mAK B8-24-3s präzipitiert. Das Präzipitat wurde geteilt und mit Endo H (+) oder ohne das Enzym (-) behandelt. Die Proteine wurden auf einem 11-13% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Endo H-sensitive MHC-Klasse-I-Moleküle sind durch ein Sternchen markiert, Endo H-resistente durch ein schwarzes Dreieck. Sowohl HLA-A2 als auch H-2K<sup>b</sup> wird in Ltk<sup>-</sup>-Zellen von m152/gp40 zurückgehalten und bleiben Endo H-sensitiv (a und b, schwarzer Pfeil). Wird kein m152/gp40 in den Zellen exprimiert, so reifen die Moleküle im Golgi und werden Endo H-resistent (a und b, weißer Pfeil). r, Endo H resistent ; s, Endo H sensitiv.

Eine Zusammenfassung der untersuchten MHC-Klasse-I-Moleküle und Zelllinien ist in Tabelle 1 gegeben. Der Transport von H-2K<sup>b</sup>-Molekülen der Maus wird in allen untersuchten Zelllinien durch m152/gp40 gehemmt, während HLA-A2 und -B7 des Menschen auf die Zelloberfläche transportiert werden. Eine Ausnahme ist die Zelllinie Ltk<sup>-</sup>, in der HLA-A2 durch den m152/gp40-Effekt betroffen ist.

**Tab. 1 Inhibition des Transports von MHC-Klasse-I-Molekülen in verschiedenen Zelllinien durch m152/gp40.**

Gezeigt sind die getesteten Zelllinien (schwarz : Zelllinien des Menschen; braun : Zelllinie der Maus) und die untersuchten MHC-Klasse-I-Moleküle. Es ist angegeben, ob die MHC-Klasse-I-Moleküle durch m152/gp40 in der Zelle zurückgehalten werden. Bis auf die Ltk<sup>-</sup>-Zellen werden generell H-2K<sup>b</sup>-Moleküle durch m152/gp40 zurückgehalten, HLA-A2 oder -B7 aber nicht.

	MHC-Klasse-I	Retention	
HeLa	K <sup>b</sup>	+	H-2
LC5	K <sup>b</sup>	+	
Ltk <sup>-</sup>	K <sup>b</sup>	+	
HeLa	B7	-	HLA
LC5	A2	-	
Ltk <sup>-</sup>	A2	+	

### 3.2 Mögliche Ursachen für die speziesspezifische Hemmung des Transports von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m152/gp40

MHC-Klasse-I-Moleküle der Maus werden sowohl in humanen als auch in Maus-Zelllinien durch m152/gp40 im Transport gehemmt. Humane MHC-Klasse-I-Moleküle werden, mit einer Ausnahme in Ltk<sup>-</sup>-Zellen, nicht von m152/gp40 zurückgehalten. Vermutlich erkennt m152/gp40 die Eigenschaften der humanen MHC-Klasse-I-Moleküle nicht. Es wurde im Folgenden untersucht, welche Eigenschaft der humanen MHC-Klasse-I-Moleküle Ursache für die Speziespezifität von m152/gp40 sein kann. Es wurde die Spezies des gebundenen  $\beta_2$ -Mikroglobulin als mögliche Ursache untersucht, sowie das Glykosylierungsmuster von

---

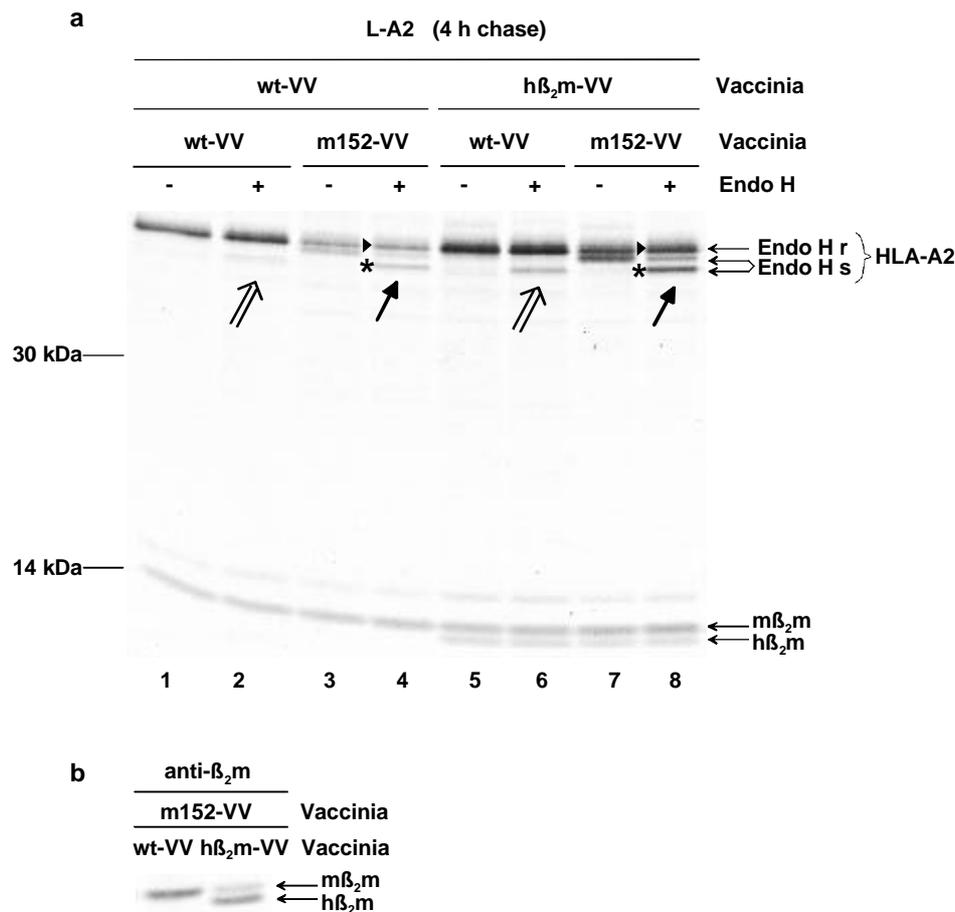
humanen MHC-Klasse-I-Molekülen, welches sich vom Glykosylierungsmuster der Maus unterscheidet.

### *3.2.1 Die $\beta_2m$ -Spezies spielt keine Rolle bei der speziesspezifischen Inhibition des Transports durch m152/gp40*

Die Inhibition des Transports von HLA-A2 in Ltk<sup>-</sup>-Zellen ist in Abb. 9 gezeigt und könnte darauf beruhen, dass das gebundene  $\beta_2$ -Mikroglobulin von der Maus stammt. Um den Einfluss der  $\beta_2$ -Mikroglobulin-Spezies auf den gehemmten Transport von HLA-A2 zu untersuchen, wurde in Ltk<sup>-</sup>-Zellen humanes  $\beta_2$ -Mikroglobulin zusätzlich mittels eines rekombinanten Vaccinia-Virus exprimiert. Die HLA-A2-Moleküle wurden nach 4 Stunden Reifung präzipitiert und mit Endo H verdaut. In Abb. 10 a, Spur 8 (schwarzer Pfeil), ist gezeigt, dass HLA-A2 auch in Gegenwart von humanem  $\beta_2$ -Mikroglobulin von m152/gp40 zurückgehalten wird, erkennbar an der deutlich stärkeren Bande Endo H-sensitiver Moleküle als in Zellen, die kein m152/gp40 exprimieren (Abb. 10 a, Spur 6, weißer Pfeil). Die Expression und Bindung von humanem  $\beta_2$ -Mikroglobulin ist durch die ca. 12 kDa große zusätzliche Bande gezeigt (Abb. 10 a, Spuren 5-8 und 10 b), die unter der Bande von  $\beta_2$ -Mikroglobulin der Maus läuft. Ob das  $\beta_2$ -Mikroglobulin der Maus oder des Menschen stärker an die schwere Kette bindet, kann nicht festgestellt werden, da nach 4 Stunden Reifung die Moleküle an der Zelloberfläche das markierte  $\beta_2$ -Mikroglobulin gegen nicht markiertes im Kulturmedium ausgetauscht haben könnten. Insgesamt kann geschlossen werden, dass die Spezies des  $\beta_2$ -Mikroglobulins für die Transportinhibition von HLA-A2 in Ltk<sup>-</sup>-Zellen nicht verantwortlich ist.

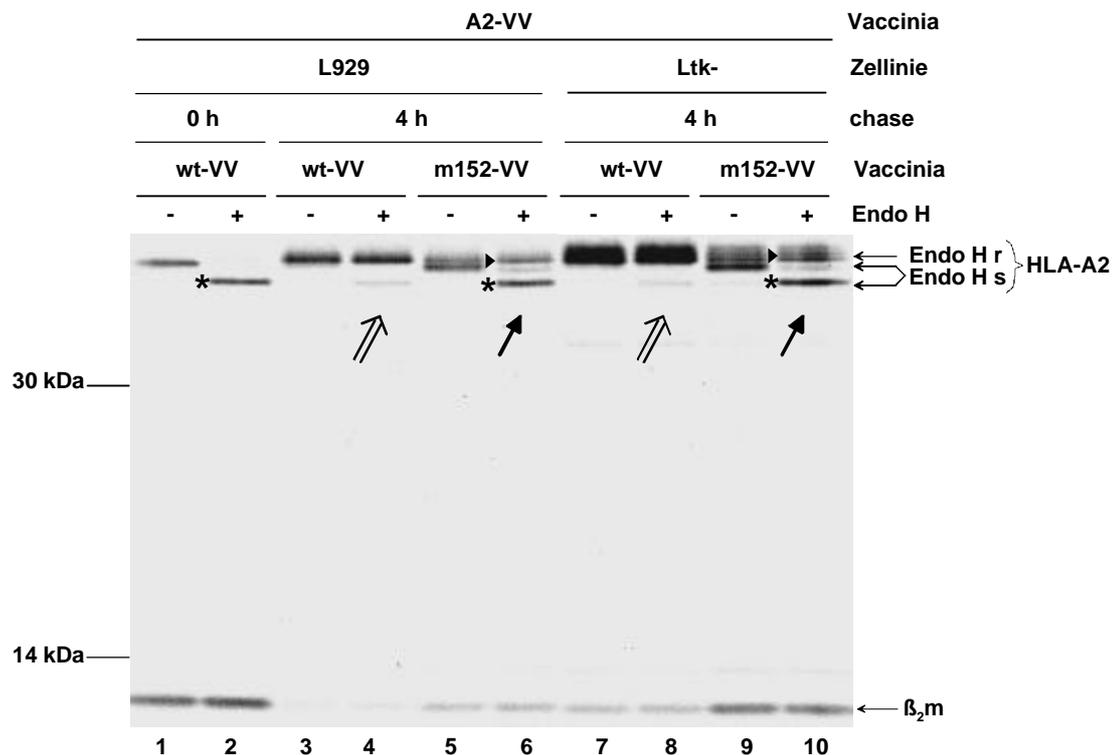
Die Spezies des an die schwere Kette gebundenen  $\beta_2$ -Mikroglobulins ist nicht entscheidend für die Akkumulation von HLA-A2 in Ltk<sup>-</sup>-Zellen. Wahrscheinlich ist eine spezielle Eigenschaft der Ltk<sup>-</sup>-Zellen Grund dafür. In Ltk<sup>-</sup>-Zellen wurde die Region für das Thymidinkinase-Gen deletiert (Kit et al., 1963). Möglicherweise wurde mit dieser Deletion ein weiteres Gen entfernt, das eine Rolle spielt bei der Transportinhibition von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m152/gp40. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde die ursprüngliche Zelllinie L929 untersucht. L929-Zellen wurden mit einem rekombinanten Vaccinia-Virus infiziert, das HLA-A2 exprimiert und gleichzeitig mit einem Vaccinia-Virus, das m152/gp40 exprimiert. In Abb. 11 sind in Spur 5 und 6 die HLA-A2-Moleküle dargestellt, die nach 4 Stunden Reifung mit Endo H verdaut wurden. Ein großer Teil der HLA-A2-Moleküle ist bei

Expression von m152/gp40 Endo H-sensitiv, also zurückgehalten worden (Abb. 8, Spur 6). Das Glykosylierungsmuster der Endo H-resistenten HLA-A2-Moleküle ist in Ltk<sup>-</sup>-Zellen verschieden von dem in L929-Zellen (vergleiche Spur 10 u. 6 in Abb. 11). Die Deletion der Thymidinkinase in den Ltk<sup>-</sup>-Zellen ist folglich nicht der Grund für die Hemmung des Transports von HLA-A2 durch m152/gp40. Möglicherweise ist ein unbekannter Faktor, der in dieser Zelllinie exprimiert oder nicht exprimiert wird, an der Transportinhibition beteiligt.



**Abb. 10** HLA-A2 wird in Ltk<sup>-</sup>-Zellen auch in Gegenwart von humanem β<sub>2</sub>m zurückgehalten.

Ltk<sup>-</sup>-Transfektanten, die HLA-A2 exprimieren (L-A2) wurden mit Wildtyp-Vaccinia (wt-VV) oder mit rekombinanten Vaccinia-Virus, das humanes β<sub>2</sub>m exprimiert (hβ<sub>2</sub>m-VV), infiziert. Zur gleichen Zeit wurden die Zellen mit wt-VV oder m152-VV infiziert. Die Zellen wurden 30 min. mit [<sup>35</sup>S]Cys/Met metabolisch markiert und nach 4 h Reifungszeit (4 h chase) in Igepal-Lysepuffer lysiert. HLA-A2 wurde mit einem Gemisch der mAK W6/32 (HLA-A, -B, -C) und MA2.1 (HLA-A2) präzipitiert (a). β<sub>2</sub>-Mikroglobulin wurde mit einem anti human-β<sub>2</sub>m-Antikörper präzipitiert (b). Das Präzipitat wurde geteilt und mit Endo H (+) oder ohne das Enzym (-) behandelt. Die Proteine wurden auf einem 11-13% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Endo H-sensitive MHC-Klasse-I-Moleküle sind durch ein Sternchen markiert, Endo H-resistente durch ein schwarzes Dreieck. (a) In den Spuren 1-4 ist das endogene β<sub>2</sub>m der Maus exprimiert, während in Spuren 5-8 zusätzlich humanes β<sub>2</sub>m. In Gegenwart von m152/gp40 (schwarze Pfeile) wird HLA-A2 auch in Gegenwart von humanem β<sub>2</sub>m (Spur 8) zurückgehalten. Ist kein m152/gp40 in den Zellen exprimiert (weiße Pfeile), so reifen die HLA-A2-Moleküle und werden Endo H-resistent. (b) Expression des humanen β<sub>2</sub>m, das ein geringeres Molekulargewicht hat als das Maus-β<sub>2</sub>m. Der Antikörper kreuzreagiert mit dem Maus-β<sub>2</sub>m. r, Endo H resistent ; s, Endo H sensitiv.



**Abb. 11** HLA-A2 wird auch in L929-Zellen, die keine Deletion der Thymidinkinase enthalten, von m152/gp40 im Transport gehemmt.

L929- und Ltk<sup>-</sup>-Zellen wurden mit einem HLA-A2-exprimierendem Vaccinia-Virus (A2-VV) und gleichzeitig mit Wildtyp-Vaccinia (wt-VV) oder mit m152-Vaccinia-Virus (m152-VV) infiziert. Die Zellen wurden 30 min. mit [<sup>35</sup>S]Cys/Met metabolisch markiert und nach der Markierung (0 h) oder nach 4 h Reifungszeit (4 h) in Igepal-Lysepuffer lysiert. HLA-A2 wurde mit einem Gemisch der mAK W6/32 (HLA-A, -B, -C) und MA2.1 (HLA-A2) präzipitiert. Das Präzipitat wurde geteilt und mit Endo H (+) oder ohne das Enzym (-) behandelt. Die Proteine wurden auf einem 11-13% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Endo H-sensitive MHC-Klasse-I-Moleküle sind durch ein Sternchen markiert, Endo H-resistente durch ein schwarzes Dreieck. In Spur 3 und 4 ist die Reifung von HLA-A2 nach Infektion Wildtyp-Vaccinia in L929-Zellen gezeigt (weißer Pfeil). Wird m152/gp40 exprimiert, so wird ein großer Teil der Moleküle retentiert und bleibt Endo H-sensitiv (Spur 6, schwarzer Pfeil). In Spur 7-10 ist zur Kontrolle die Reifung von HLA-A2 in Ltk<sup>-</sup>-Zellen gezeigt. HLA-A2 wird durch m152/gp40 retentiert (Spur 10, schwarzer Pfeil), während es ohne m152/gp40-Expression Endo H-resistent wird (Spur 8, weißer Pfeil). In Ltk<sup>-</sup>-Zellen gibt es Endo H-resistente HLA-A2-Moleküle mit verschiedenen Glykosylierungsmustern (Spur 10), die in L929-Zellen nicht entstehen (Spur 6). r, Endo H resistent ; s, Endo H sensitiv.

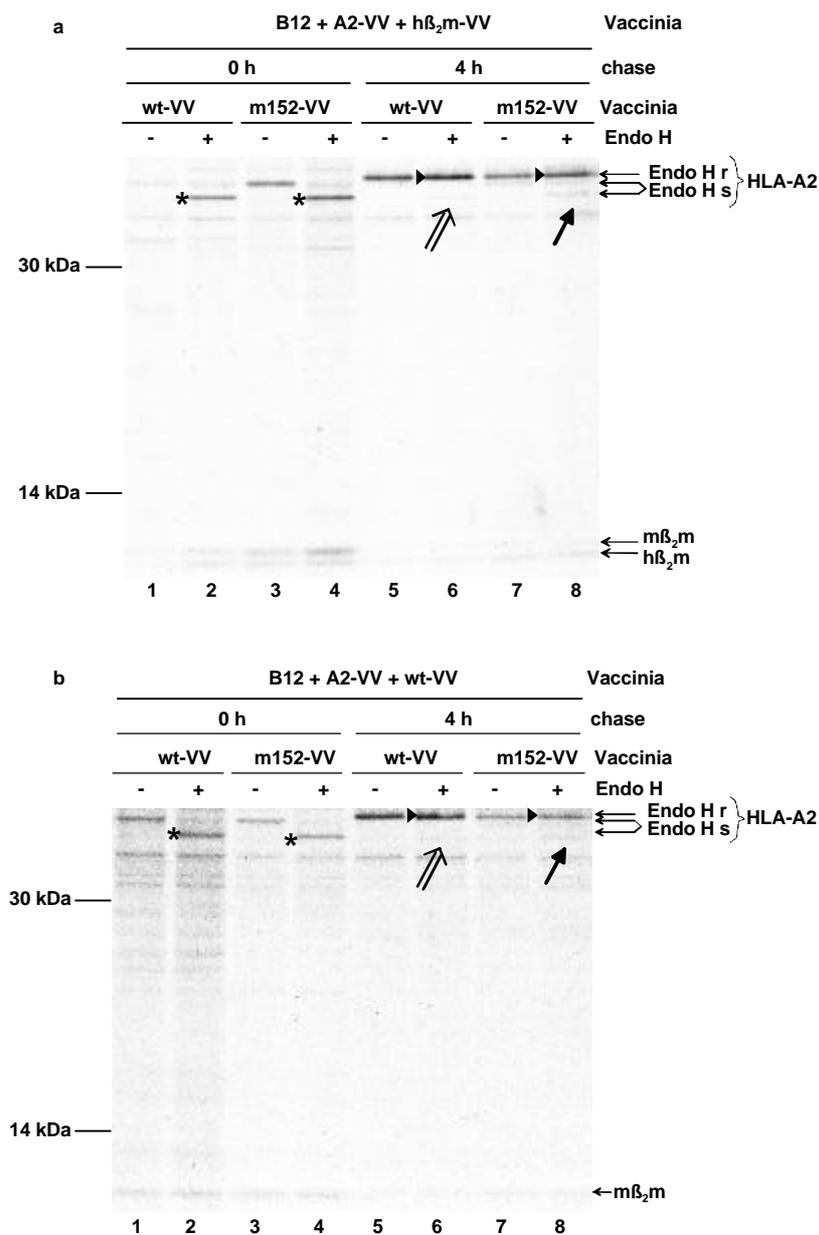
Zur Klärung der Frage, ob generell humane MHC-Klasse-I-Moleküle durch m152/gp40 im Transport behindert werden, wenn sie in Maus-Zellen exprimiert werden, wurde eine weitere Maus-Zelllinie untersucht. In B12-Zellen aus der Maus wurden die Moleküle HLA-A2 und H-2K<sup>b</sup> mittels rekombinanter Vaccinia-Viren exprimiert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit m152/gp40-Vaccinia infiziert. Die Moleküle wurden nach 4 Stunden Reifungszeit präzipitiert. Wird in B12-Zellen humanes β<sub>2</sub>-Mikroglobulin exprimiert, so wird HLA-A2 in Gegenwart von m152/gp40 nicht zurückgehalten und ist Endo H-resistent (Abb. 12 a, schwarzer Pfeil).

Die Expression des humanen  $\beta_2$ -Mikroglobulin ist durch die zusätzliche Bande bei ca. 12 kDa bestätigt, die kurz unter der Bande des Maus- $\beta_2$ -Mikroglobulin läuft. Aber auch in Gegenwart von endogenem Maus- $\beta_2$ -Mikroglobulin wird HLA-A2 nach Expression von m152/gp40 ebenso Endo H-resistent (Abb. 12 b, schwarzer Pfeil).

Daraus lässt sich schließen, dass HLA-A2 in B12-Zellen nicht durch m152/gp40 betroffen ist. Die Inhibition des Transports von HLA-A2 in Ltk<sup>-</sup>-Zellen ist eine Ausnahme und beruht wahrscheinlich auf speziellen Eigenschaften der Zelllinie.

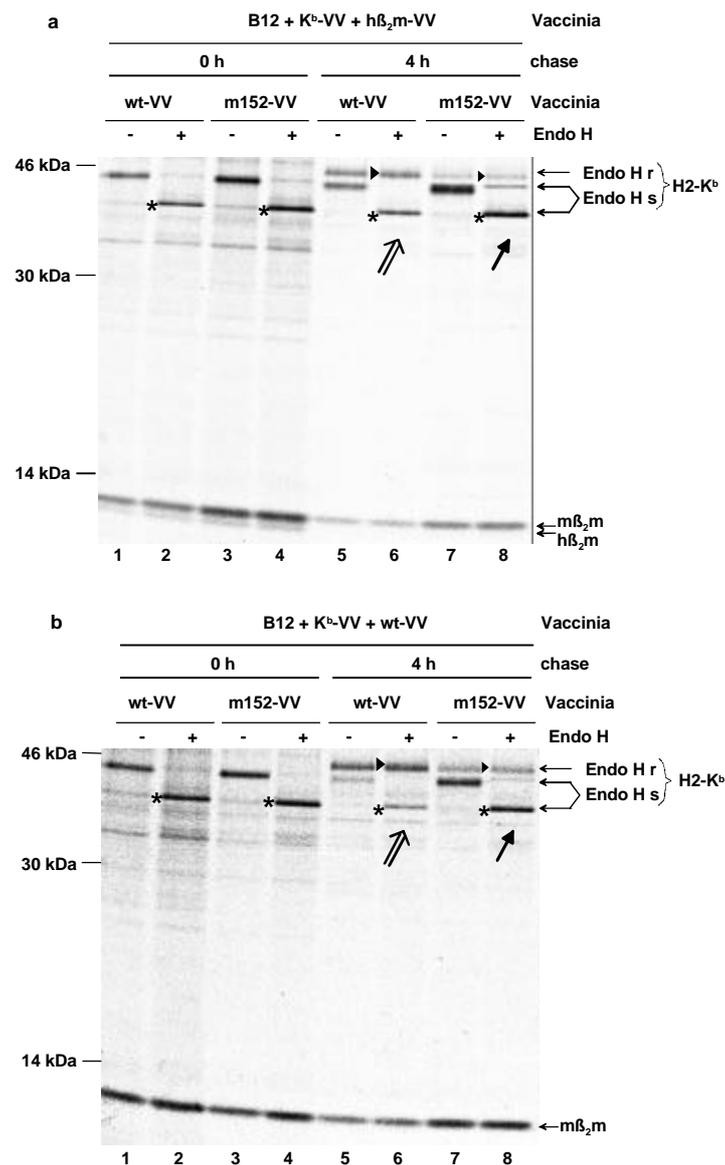
H-2K<sup>b</sup> wurde in B12-Zellen exprimiert und die Inhibition des Transports durch m152/gp40 nach Expression von humanem  $\beta_2$ -Mikroglobulin beobachtet. Sowohl nach Expression von humanem  $\beta_2$ -Mikroglobulin in B12-Zellen, als auch in Gegenwart von endogenem Maus- $\beta_2$ -Mikroglobulin akkumuliert H-2K<sup>b</sup> in der Gegenwart von m152/gp40 in der Zelle (vergleiche Abb. 13 a u. b, schwarzer Pfeil). In Gegenwart von humanem  $\beta_2$ -Mikroglobulin reift weniger H-2K<sup>b</sup> (Abb. 13 a, Spur 5 u. 6) als nach Expression von endogenem Maus- $\beta_2$ -Mikroglobulin (Abb. 13 b, Spur 5 u. 6). Das humane  $\beta_2$ -Mikroglobulin ist in den Spuren 5-8 (Abb. 13 a) nicht mehr zu erkennen, es wurde vermutlich an der Zelloberfläche gegen  $\beta_2$ -Mikroglobulin aus dem Kulturmedium ausgetauscht. Dass die schwere Kette von H-2K<sup>b</sup> an humanes  $\beta_2$ -Mikroglobulin bindet ist in den Spuren 1-4 der Abb. 13 a gezeigt. Wahrscheinlich ist die Konformation dieser Moleküle verändert und H-2K<sup>b</sup> kann schlechter an die Zelloberfläche transportiert werden. Gelangt es an die Zelloberfläche wird das humane  $\beta_2$ -Mikroglobulin relativ schnell gegen  $\beta_2$ -Mikroglobulin aus dem Kulturmedium ausgetauscht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass MHC-Klasse-I-Moleküle der Maus in allen getesteten Zelllinien von m152/gp40 zurückgehalten werden. Im Gegensatz dazu werden MHC-Klasse-I-Moleküle des Menschen in diesen Zellen nicht zurückgehalten. Ltk<sup>-</sup>-Zellen sind eine Ausnahme, da in diesem Zelltyp auch HLA-A2 durch m152/gp40 im Transport inhibiert wird. Die Spezies des an die schwere Kette gebundenen  $\beta_2$ -Mikroglobulins spielt keine Rolle, da auch in Gegenwart von humanem  $\beta_2$ -Mikroglobulin HLA-A2 durch m152/gp40 zurückgehalten wird (Tab. 2).



**Abb. 12** Humanes  $\beta_2$ -Mikroglobulin beeinflusst nicht den Effekt von m152/gp40 auf HLA-A2 in B12-Zellen.

B12-Zellen wurden mit einem HLA-A2-exprimierenden rekombinanten Vaccinia-Virus (A2-VV) und einem Vaccinia-Virus, das humanes  $\beta_2$ -Mikroglobulin exprimiert (a, h $\beta_2$ m-VV) oder Wildtyp-Vaccinia-Virus (b, wt-VV) infiziert. Zur gleichen Zeit wurden die Zellen mit m152-Vaccinia-Virus (m152-VV) oder Wildtyp-Vaccinia-Virus (wt-VV) infiziert. Die Zellen wurden 30 min. mit [<sup>35</sup>S]Cys/Met metabolisch markiert und sofort (0 h) oder nach 4 h Reifungszeit (4 h) in Igepal-Lysepuffer lysiert. HLA-A2 wurde mit einem Gemisch der MAK W6/32 (HLA-A, -B, -C) und MA2.1 (HLA-A2) präzipitiert. Das Präzipitat wurde geteilt und mit Endo H (+) oder ohne das Enzym (-) behandelt. Die Proteine wurden auf einem 11-13% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Endo H-sensitive Moleküle sind durch ein Sternchen markiert, Endo H-resistente durch ein schwarzes Dreieck. (a) HLA-A2 ist nach 4 Stunden Reifung in Gegenwart von humanem  $\beta_2$ -Mikroglobulin Endo H-resistent (weißer Pfeil) und wird auch nach Expression von m152/gp40 nicht retentiert (schwarzer Pfeil). (b) Ist in den Zellen nur das endogene Maus- $\beta_2$ -Mikroglobulin exprimiert, so wird HLA-A2 ebenfalls Endo H-resistent (schwarzer, weißer Pfeil). Das humane  $\beta_2$ -Mikroglobulin beeinflusst den Effekt von m152/gp40 auf HLA-A2 nicht. r, Endo H resistent ; s, Endo H sensitiv.



**Abb. 13** H-2K<sup>b</sup> wird in B12 Zellen von m152/gp40 retentiert.

B12-Zellen wurden mit einem H-2K<sup>b</sup>-exprimierenden rekombinanten Vaccinia-Virus (K<sup>b</sup>-VV) und einem Vaccinia-Virus, das humanes β<sub>2</sub>-Mikroglobulin exprimiert (a, hβ<sub>2</sub>m-VV) oder Wildtyp-Vaccinia-Virus (b, wt-VV) infiziert. Zur gleichen Zeit wurden die Zellen mit m152-Vaccinia-Virus (m152-VV) oder Wildtyp-Vaccinia-Virus (wt-VV) infiziert. Die Zellen wurden 30 min. mit [<sup>35</sup>S]Cys/Met metabolisch markiert und sofort (0 h) oder nach 4 h Reifungszeit (4 h) in Igepal-Lysepuffer lysiert. H-2K<sup>b</sup> wurde mit dem mAK B8-24-3s präzipitiert. Das Präzipitat wurde geteilt und mit Endo H (+) oder ohne das Enzym (-) behandelt. Die Proteine wurden auf einem 11-13% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Endo H-sensitive Moleküle sind durch ein Sternchen markiert, Endo H-resistente durch ein schwarzes Dreieck. (a) Wird in den Zellen humanes β<sub>2</sub>-Mikroglobulin exprimiert, so ist H-2K<sup>b</sup> nach 4 Stunden Reifungszeit zu ca. 50 % Endo H-resistent (weißer Pfeil). Nach Expression von m152/gp40 wird H-2K<sup>b</sup> zurückgehalten (schwarzer Pfeil). (b) H-2K<sup>b</sup> ist nach 4 Stunden Reifung in Gegenwart von endogenem Maus-β<sub>2</sub>-Mikroglobulin besser gereift als bei Koexpression von humanem β<sub>2</sub>m (weißer Pfeil) und wird in Gegenwart von m152/gp40 retentiert (schwarzer Pfeil). Das humane β<sub>2</sub>-Mikroglobulin beeinflusst den Effekt von m152/gp40 auf H-2K<sup>b</sup> nicht. r, Endo H resistant; s, Endo H sensitiv.

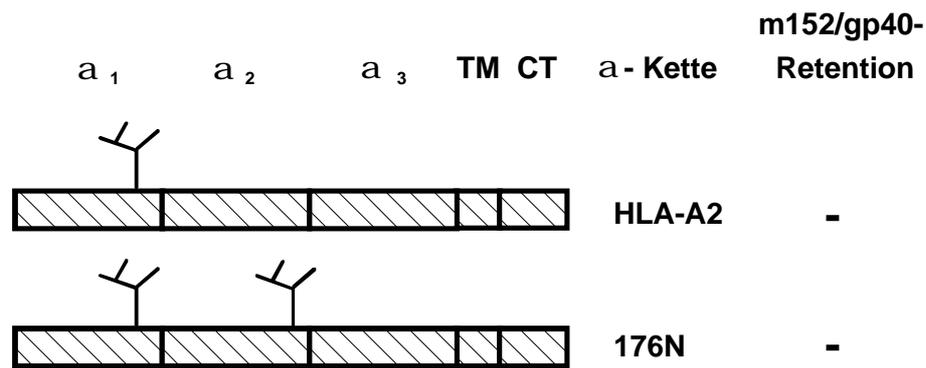
**Tab. 2 Inhibition des Transports von MHC-Klasse-I-Molekülen in verschiedenen Zelllinien durch m152/gp40.**

Gezeigt sind die getesteten Zelllinien (schwarz: Zelllinien des Menschen; braun : Zelllinien der Maus) und die untersuchten MHC-Klasse-I-Moleküle. Es ist angegeben, ob die MHC-Klasse-I-Moleküle durch m152/gp40 retentiert werden. Bis auf die Ltk<sup>-</sup>- und L929-Zellen werden generell H-2K<sup>b</sup>-Moleküle durch m152/gp40 retentiert, HLA-A2 oder -B7 aber nicht. Die Expression von humanem  $\beta_2m$  ermöglicht nicht die Transportinhibition von HLA-A2 in Ltk<sup>-</sup>- oder L929-Zellen.

	MHC-Klasse-I	Retention	
HeLa	K <sup>b</sup>	+	H-2
LC5	K <sup>b</sup>	+	
Ltk <sup>-</sup>	K <sup>b</sup>	+	
B12	K <sup>b</sup>	+	
HeLa	B7	-	HLA
LC5	A2	-	
Ltk <sup>-</sup>	A2 +/- h $\beta_2m$	+	
L929	A2 +/- h $\beta_2m$	+	
B12	A2	-	

### 3.2.2 Die zusätzliche Glykosylierung in MHC-Klasse-I-Molekülen der Maus ist nicht Grund für die Inhibition des Transports durch m152/gp40

MHC-Klasse-I-Moleküle des Menschen und der Maus unterscheiden sich in der Zahl der Glykosylierungsstellen der schweren Kette. Während HLA-Antigene lediglich eine Glykosylierung in der  $\alpha_1$ -Domäne aufweisen, sind H-2-Antigene der Maus in der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne, manche auch in der  $\alpha_3$ -Domäne, glykosyliert (Maloy, 1987). Möglicherweise ist die Anzahl der Glykosylierungen der schweren Kette entscheidend für die Inhibition des Transports von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m152/gp40. Eine Mutante von HLA-A2, die eine zweite Glykosylierung aufweist, wurde zu diesem Zweck untersucht. Der Name der Mutante (176N) leitet sich von der Position der zweiten Glykosylierung in der Aminosäuresequenz ab. Die Position der zweiten Glykosylierung entspricht der in Maus-Molekülen (Zhang und Salter, 1998). Die Konstrukte sind schematisch in Abb. 14 dargestellt.



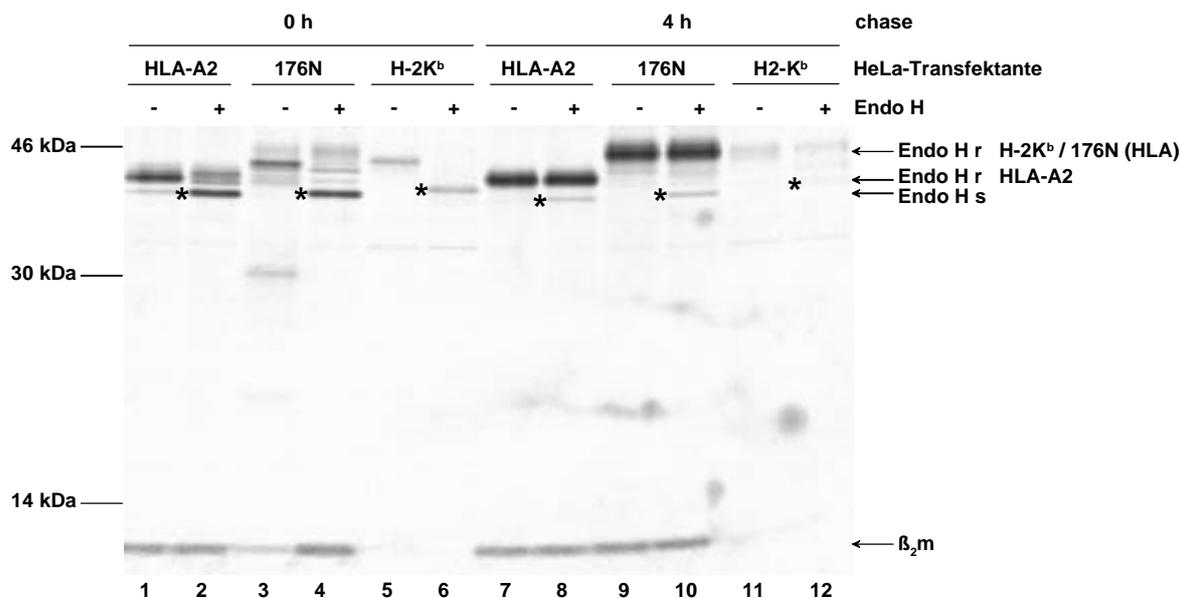
**Abb. 14** Schematische Darstellung von HLA-A2 und der Glykosylierungsmutante 176N.

Schematische Darstellung der schweren Kette von Wildtyp HLA-A2 und der Glykosylierungsmutante 176N. Die potentiellen Glykosylierungsstellen sind dargestellt durch ein verzweigtes Symbol und entsprechen für 176N den Positionen der Zuckerreste an der schweren Kette der Maus.  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ : Domänen des luminalen Bereichs; TM : Transmembranregion; CT : zytoplasmatische Domäne. Es ist angegeben, ob die Moleküle durch m152/gp40 retentiert werden.

Die Glykosylierungsmutante 176N (pRep10-176N) und das entsprechende Wildtyp-Konstrukt von HLA-A2 (pRep10-A2, siehe 2.2.5) wurden stabil in HeLa-Zellen transfiziert und mit dem Antibiotikum Hygromycin Zellklone selektiert, die im Durchflusszytometer getestet wurden. Die Expression von HLA-A2 und 176N wurde durch die Oberflächenfärbung mit dem Antikörper MA2.1 ermittelt. Zunächst wurde überprüft, ob die zusätzliche Glykosylierung in der mutierten, schweren Kette von 176N tatsächlich genutzt wird und sich das Laufverhalten im Polyacrylamidgel ändert. Transfektanten, die HLA-A2, 176N oder H-2K<sup>b</sup> (3.1.2) exprimieren, wurden radioaktiv markiert, die MHC-Klasse-I-Moleküle präzipitiert und mit Endo H verdaut. Ein Vergleich der Banden mit und ohne Endo H-Verdau von HLA-A2 (Abb. 15, Spur 1 und 2) und 176N (Abb. 15, Spur 3 und 4) zeigt, dass sich das Molekulargewicht der Mutante 176N geändert hat und dem von H-2K<sup>b</sup> entspricht (Abb. 15, Spur 5 und 6). In den Spuren 7 - 12 von Abb. 15 sind die Moleküle nach 4 Stunden Reifung gezeigt. Die Mutante 176N wird in gleichem Maße wie HLA-A2 durch den Golgi transportiert und Endo H-resistent, kann also auf den m152/gp40-Effekt untersucht werden.

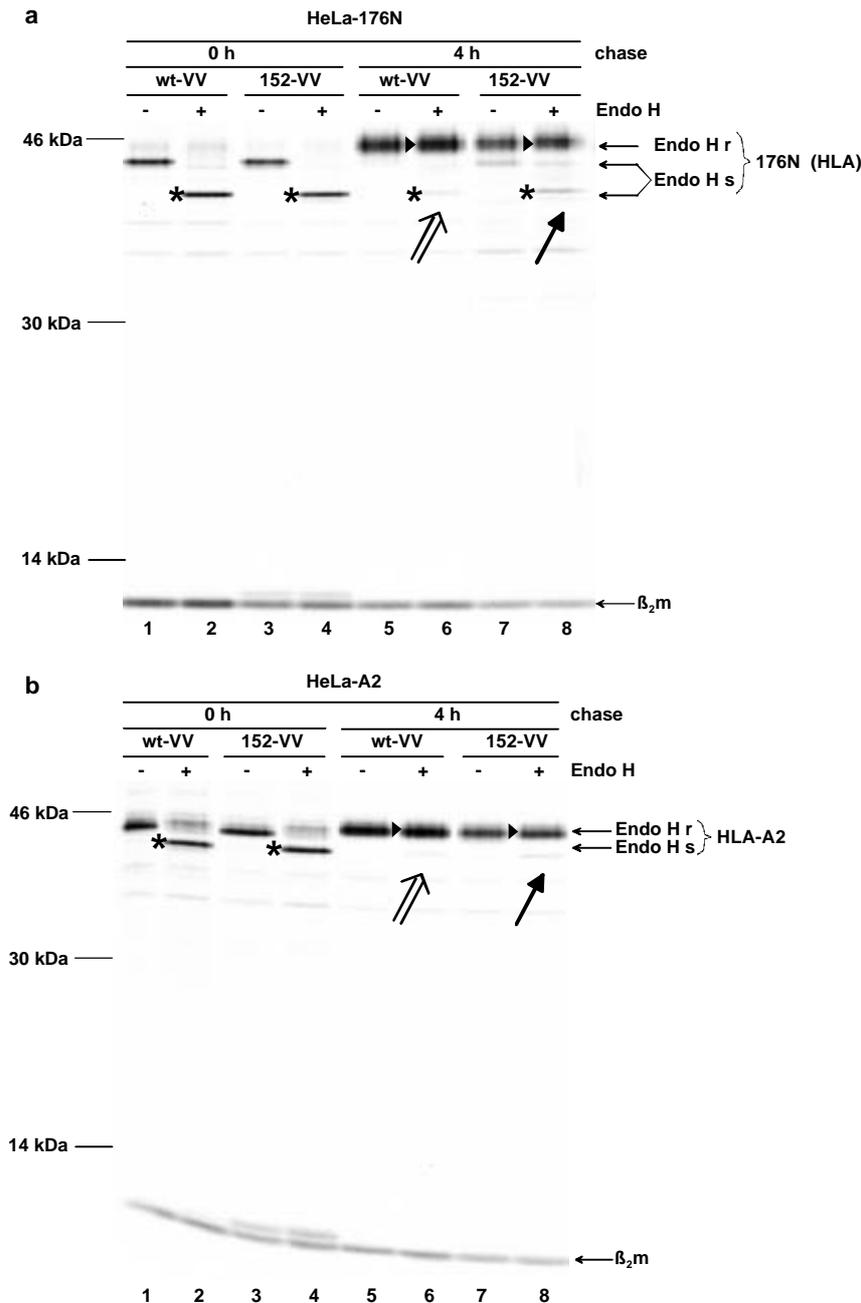
Der m152/gp40-Effekt wurde nach Infektion der Transfektanten mit m152-Vaccinia-Virus überprüft. Werden die MHC-Klasse-I-Moleküle mit der zusätzlichen Glykosylierung aus HeLa-176N-Transfektanten präzipitiert, so ist nach m152/gp40-Expression die Majorität der Moleküle gereift (Abb. 16 a, schwarzer Pfeil), wie auch in Zellen, die kein m152/gp40

exprimieren (Abb. 16 a, weißer Pfeil). Es kann geschlossen werden, dass die Mutante 176N mit einer zweiten Glykosylierung nicht durch m152/gp40 zurückgehalten wird. Der m152/gp40-Effekt beruht also nicht auf einer Erkennung des Glykosylierungsmusters der MHC-Klasse-I-Moleküle.



**Abb. 15 Die Glykosylierungsmutante 176N zeigt ein Laufverhalten wie H-2K<sup>b</sup> im Polyacrylamidgel.**

HeLa-Transfektanten, die HLA-A2, die Mutante 176N oder H-2K<sup>b</sup> exprimieren, wurden 30 min. mit [<sup>35</sup>S]Cys/Met metabolisch markiert und sofort (0 h) oder nach 4 h Reifungszeit (4 h) in Igepal-Lysepuffer lysiert. HLA-A2 und 176N wurden mit dem mAK MA2.1 und H-2K<sup>b</sup> mit dem mAK B8-24-3s präzipitiert. Das Präzipitat wurde geteilt und mit Endo H (+) oder ohne das Enzym (-) behandelt. Die Proteine wurden auf einem 11-13% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Endo H-sensitive Moleküle sind durch ein Sternchen markiert. Das Bandenmuster der Endo H-sensitiven 176N-Moleküle (Spur 3 und 4) unterscheidet sich von dem der HLA-A2-Moleküle (Spur 1 und 2) und gleicht den Banden von H-2K<sup>b</sup> (Spur 5 und 6). Es ist also ein zweiter Zuckerrest an die 176N-Moleküle synthetisiert worden. In den Spuren 7 bis 12 sind die Moleküle nach 4 Stunden Reifung gezeigt. Der größte Teil der Moleküle wird Endo H-resistent (Spuren 8, 10 und 12). r, Endo H resistent ; s, Endo H sensitiv.

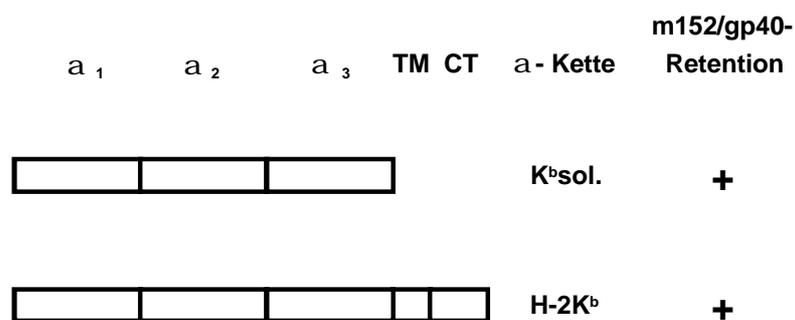


**Abb. 16 Die zusätzliche Glykosylierung der Mutante 176N vermittelt nicht die Retention durch m152/gp40.**

HeLa-Transfektanten, welche die Mutante 176N (a) oder HLA-A2 (b) exprimieren, wurden mit Wildtyp-Vaccinia (wt-VV) oder einem m152/gp40 exprimierenden Vaccinia-Virus (m152-VV) infiziert. Die Zellen wurden 30 min. mit [<sup>35</sup>S]Cys/Met metabolisch markiert und sofort (0 h) oder nach 4 h Reifungszeit (4 h) in Igepal-Lysepuffer lysiert. HLA-A2 und 176N wurde mit dem mAK MA2.1 präzipitiert. Das Präzipitat wurde geteilt und mit Endo H (+) oder ohne das Enzym (-) behandelt. Die Proteine wurden auf einem 11-13% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Endo H-sensitive Moleküle sind durch ein Sternchen gekennzeichnet, Endo H-resistente durch ein schwarzes Dreieck. (a) Die schwere Kette mit einer zusätzlichen Glykosylierung (176N) wird von m152/gp40 nicht in signifikanten Mengen retentiert (schwarzer Pfeil), da die Menge der Endo H-sensitiven Moleküle (Sternchen) kaum größer ist als in Zellen, die kein m152/gp40 exprimieren (weißer Pfeil). (b) Zur Kontrolle wurde HLA-A2 in Gegenwart von m152/gp40 untersucht. HLA-A2 wird nicht retentiert durch m152/gp40 (schwarzer Pfeil). r, Endo H resistent ; s, Endo H sensitiv.

### 3.3 Welcher Bereich der schweren Kette von MHC-Klasse-I-Molekülen wird von m152/gp40 erkannt ?

Die Domänen der MHC-Klasse-I-Moleküle, die eine Inhibition des Transports durch m152/gp40 vermitteln, wurden ermittelt. MHC-Klasse-I-Moleküle gliedern sich in einen luminalen Bereich, die Transmembran-Domäne und einen zytoplasmatischen Bereich (Abb. 17). Zunächst wurde untersucht, ob die luminal Domäne von H-2K<sup>b</sup> noch von m152/gp40 retentiert werden kann (Abb. 17 a). Anschließend wurde die luminal Domäne, die sich in die  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - und  $\alpha_3$ -Domänen gliedert auf wichtige Bereiche für den m152/gp40-Effekt untersucht. Hierzu dienten chimäre Moleküle der schweren Kette von Mensch und Maus. Mit Hilfe entsprechender Kombinationen der drei  $\alpha$ -Domänen sollte der Bereich identifizierbar sein, der für die Transportinhibition durch m152/gp40 wichtig ist (Abb. 21).



**Abb. 17** Schematische Darstellung der verkürzten H-2K<sup>b</sup> schwere Kette.

Schematische Darstellung der schweren Kette von H-2K<sup>b</sup> und der Mutante von H-2K<sup>b</sup>, deren zytoplasmatische- und Transmembran-Domäne deletiert wurden (K<sup>b</sup> sol.).  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  : Domänen des luminalen Bereichs; TM : Transmembran-Domäne; CT : zytoplasmatische Domäne. Es ist angegeben, ob die Moleküle durch m152/gp40 retentiert werden.

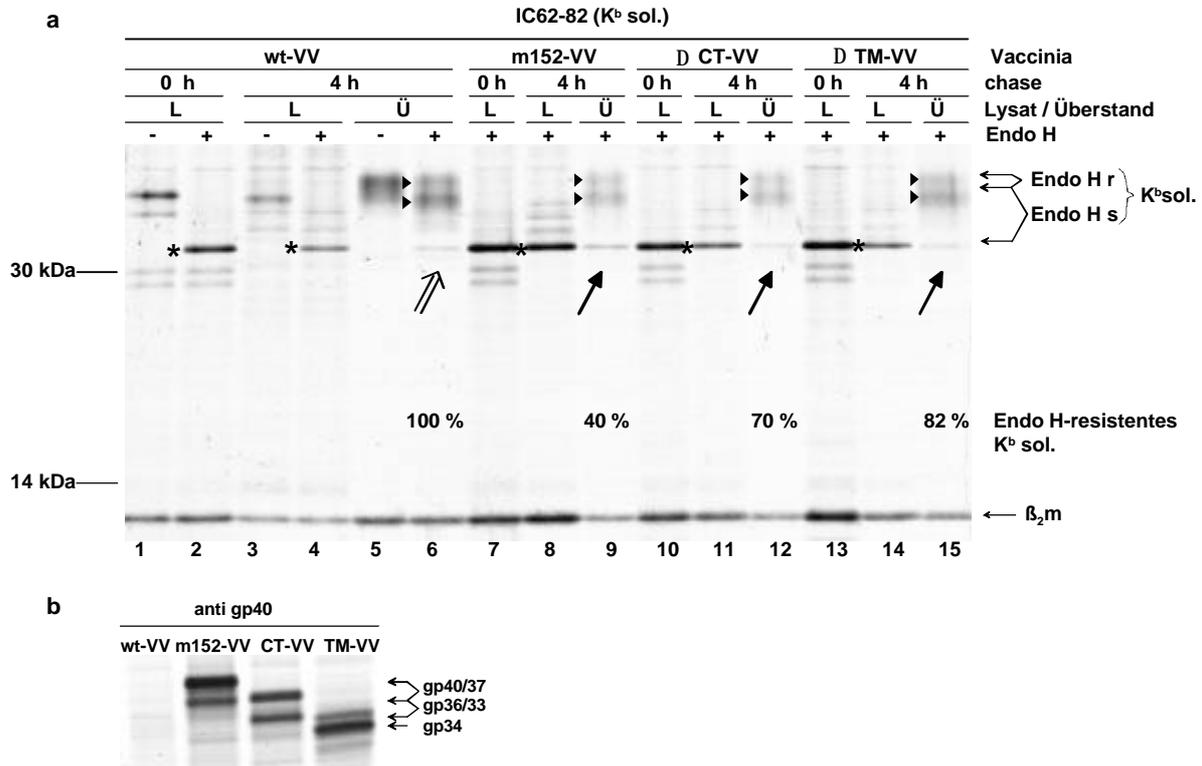
#### 3.3.1 Die luminal Domäne von MHC-Klasse-I-Molekülen wird von m152/gp40 zurückgehalten

Es wurde untersucht, ob der luminal Bereich von H-2K<sup>b</sup> durch m152/gp40 zurückgehalten werden kann. Das virale Protein m152/gp40 erkennt mit seiner luminalen Domäne die MHC-Klasse-I-Moleküle (Ziegler et al., 2000). Daher ist wahrscheinlich, dass das MHC-Klasse-I-Molekül auch in einem Bereich der luminalen Domäne erkannt wird. Eine Mutante von H-2K<sup>b</sup> (K<sup>b</sup> sol.), deren zytoplasmatische und Transmembran-Domäne deletiert waren, wurde stabil in 1T-Zellen exprimiert (IC62-82, Prof. Arnold, Heidelberg). IC62-82-Zellen wurden

mit Wildtyp-Vaccinia-Virus infiziert und die K<sup>b</sup> sol.-Moleküle sowohl aus dem Kulturüberstand als auch aus dem Zellysatz präzipitiert. Das K<sup>b</sup> sol., welches in diesen Zellen exprimiert wird, reift nach 4 Stunden Inkubation nicht vollständig (Abb. 18 a, Spur 4). Die Moleküle, die nach einer Quantifizierung nach 4 Stunden Reifungszeit Endo H-resistent sind, wurden als 100 % definiert (Abb. 18 a, Spur 6). Sie stellen die MHC-Klasse-I-Moleküle dar, die im Golgi prozessiert wurden und potentiell von m152/gp40 zurückgehalten werden können. In den Spuren 7 - 9 (Abb. 18 a) wurde m152/gp40 mittels eines rekombinanten Vaccinia-Virus exprimiert und die K<sup>b</sup> sol.-Moleküle präzipitiert. Nach 4 Stunden Reifungszeit sind nur noch 40 % der K<sup>b</sup> sol.-Moleküle im Kulturüberstand, wie eine Quantifizierung der Banden ergibt (Abb. 18 a, Spur 9), während 60 % der Moleküle durch m152/gp40 im Zellysatz zurückgehalten wurden (Spur 8). Oberhalb der starken Bande Endo H-sensitiver Moleküle in Spur 8, Abb. 18 a, sind andere Glykosylierungsformen Endo H-sensitiver Moleküle zu sehen. Die dünne Bande Endo H-sensitiver K<sup>b</sup> sol.-Moleküle in Spur 9 ist so zu erklären, dass das Kulturmedium der radioaktiv markierten Zellen für die Präzipitation verwendet wurde, ohne zuvor Zellen zu sedimentieren. So gelangten Zellen in den Überstand und die darin enthaltenen, in der Zelle akkumulierten K<sup>b</sup> sol.-Moleküle wurden ebenfalls präzipitiert. Es kann zusammenfassend gefolgert werden, dass auch die verkürzte Form von H-2K<sup>b</sup> von m152/gp40 zurückgehalten werden kann. Es wird mehr als die Hälfte aller K<sup>b</sup> sol.-Moleküle in der Zelle zurückgehalten.

Verkürzungsmutanten von m152/gp40, denen die zytoplasmatische Domäne ( $\Delta$ CT) oder die Transmembran- und zytoplasmatische Domäne ( $\Delta$ TM) fehlen, üben noch einen Effekt auf MHC-Klasse-I-Moleküle aus (Ziegler et al., 2000). Es war von Interesse zu untersuchen, ob diese m152/gp40-Mutanten auch das K<sup>b</sup> sol. im Transport hemmen können. Die m152/gp40-Mutanten wurden mittels eines rekombinanten Vaccinia-Virus exprimiert und IC62-82-Zellen (K<sup>b</sup> sol.) infiziert. Das K<sup>b</sup> sol. wurde aus dem Kulturüberstand und dem Lysat der Zellen präzipitiert und mit Endo H behandelt. In den Spuren 12 und 15 (Abb. 18 a) sind die Endo H-resistenten K<sup>b</sup> sol.-Moleküle gezeigt, die einer Transportblockade durch die Mutanten  $\Delta$ CT und  $\Delta$ TM entkommen sind. Eine Quantifizierung der Banden ergibt, dass 70 % aller Moleküle nach Infektion mit  $\Delta$ CT-m152 in den Kulturüberstand gelangt sind und 82 % der Moleküle nach Infektion mit  $\Delta$ TM-m152. Die prozentualen Werte sind auf die Moleküle in Spur 6 (Abb. 18 a) bezogen, die nach Infektion mit Wildtyp-Vaccinia-Virus präzipitiert wurden. Es wird deutlich, dass der Effekt von m152/gp40 mit der Deletion der Transmembran-Domäne stark abnimmt und annähernd so viel K<sup>b</sup> sol. in den Kulturüberstand gelangt wie nach

Infektion mit Wildtyp-Vaccinia-Virus. Es können die Mutanten von m152/gp40 auf das  $K^b$  sol. noch einen Effekt ausüben, aber deutlich schwächer als das Wildtyp-m152/gp40. Eine Verankerung des luminalen Bereichs von m152/gp40 durch einen entsprechenden Bereich eines fremden Moleküls, z.B. CD4, konnte in früheren Versuchen die Effizienz des m152/gp40-Effekts steigern (Ziegler et al., 2000).



**Abb. 18 Die luminal Domäne von H-2K<sup>b</sup> wird durch m152/gp40 und Deletionsmutanten von m152/gp40 zurückgehalten.**

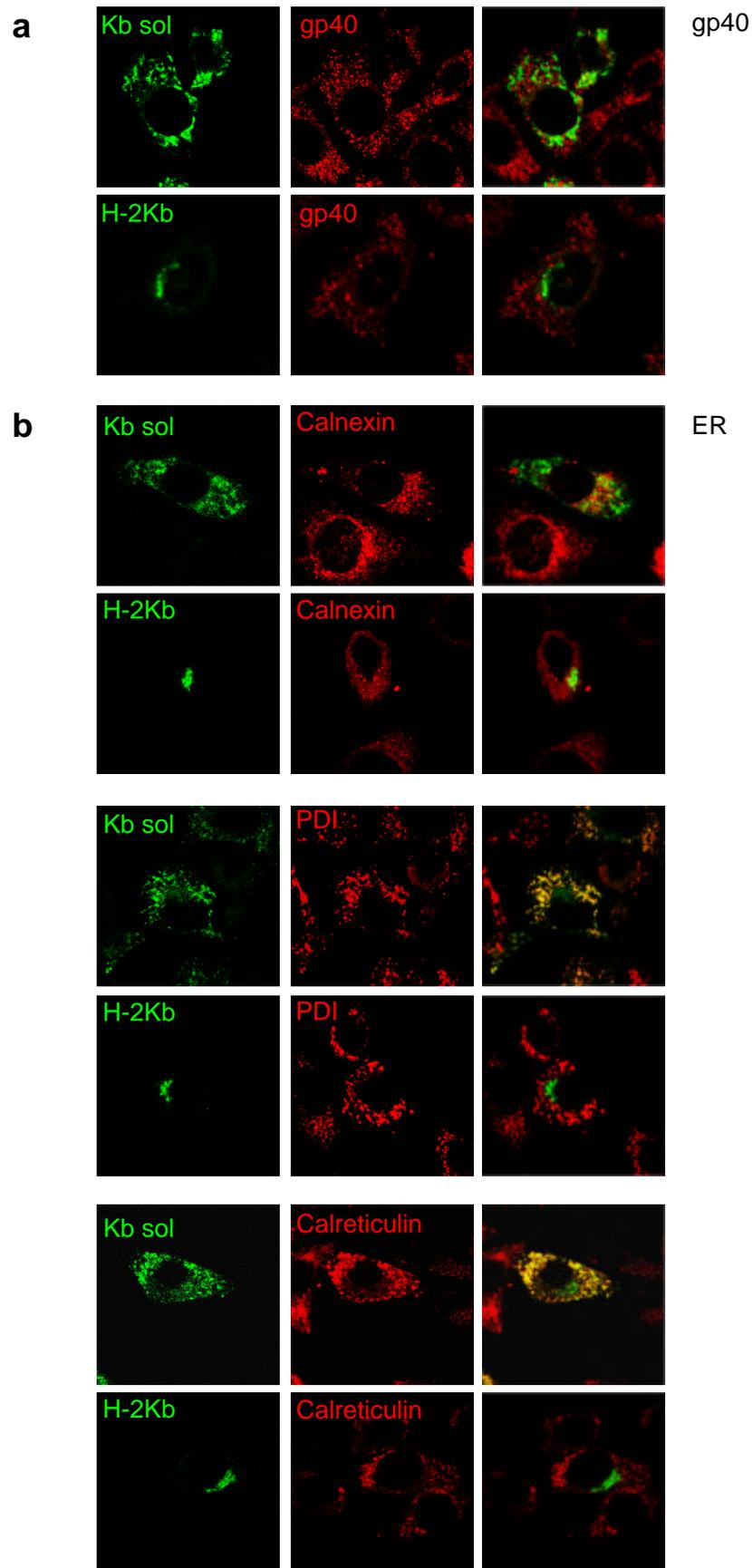
Stabile 1T-Transfektanten, die das verkürzte H-2K<sup>b</sup> ( $K^b$  sol.) exprimieren (a, IC62-82), wurden mit Wildtyp-Vaccinia-Virus (wt-VV), m152-Vaccinia-Virus (m152-VV) oder den m152/gp40-Mutanten  $\Delta$ CT- und  $\Delta$ TM-Vaccinia-Virus infiziert ( $\Delta$ CT-VV und  $\Delta$ TM-VV). Die Zellen wurden 30 min. mit [<sup>35</sup>S]Cys/Met metabolisch markiert und sofort (0 h) oder nach 4 h Reifungszeit (4 h) in Igepal-Lysepuffer lysiert (L). Der Zellüberstand (Ü) wurde nach den 4 Stunden Reifungszeit abgenommen und Detergens und Proteaseinhibitoren in den Lysaten entsprechender Konzentration zugegeben.  $K^b$  sol. wurde mit dem mAK B8-24-3s präzipitiert. Das Präzipitat wurde geteilt und mit Endo H (+) oder ohne das Enzym (-) behandelt. Die Proteine wurden auf einem 11-13% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Endo H-sensitive Moleküle sind durch ein Sternchen, Endo H-resistente Moleküle durch ein Dreieck gekennzeichnet. (a) Die nach Wildtyp-Vaccinia-Virusinfektion gereiften Moleküle im Kulturüberstand werden als 100 % definiert (Spur 6) und sind Endo H-resistent. Die schwache Bande Endo H-sensitiver Moleküle in Spur 6 ist darauf zurückzuführen, dass mit dem Kulturüberstand auch Zellen abgenommen und lysiert wurden, so dass Endo H-sensitives  $K^b$  sol. aus dem Überstand präzipitiert werden konnte. Wurden die Zellen mit m152-Vaccinia infiziert (Spur 7-9), so gelangten nur noch 40 % der  $K^b$  sol.-Moleküle in den Überstand (Spur 9). Die m152/gp40-Mutanten  $\Delta$ CT und  $\Delta$ TM konnten  $K^b$  sol. nicht so gut wie Wildtyp-m152/gp40 retentieren. Es gelangten jeweils 70 % (Spur 12,  $\Delta$ CT) und 82 % (Spur 15,  $\Delta$ TM) der Moleküle in den Kulturüberstand. Das  $K^b$  sol. kann folglich von m152/gp40 retentiert werden. Wird das virale Protein m152/gp40 aber auch verkürzt, so nimmt der Effekt auf  $K^b$  sol. stark ab. r, Endo H resistent ; s, Endo H sensitiv.

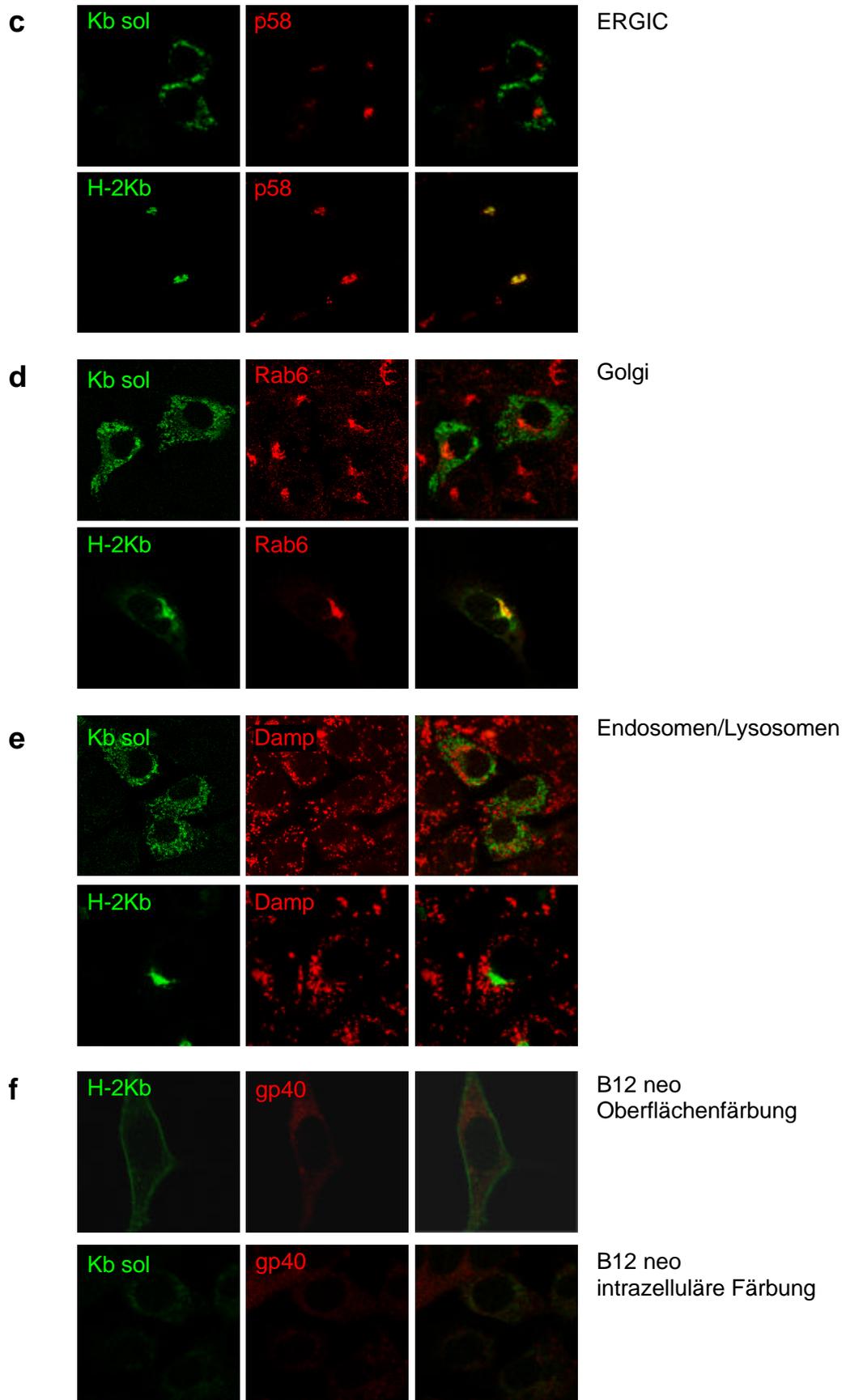
(b) Präzipitation von m152/gp40 und Mutanten nach Vaccinia-Virusinfektion mit dem Serum p11. Die Größe der Banden der m152/gp40-Mutanten entspricht der Größe der Deletion in m152/gp40.



Im Vergleich mit den Ergebnissen aus Abb. 18 kann man folgern, dass Wildtyp-H-2K<sup>b</sup> deutlich wirksamer als K<sup>b</sup> sol. durch m152/gp40 zurückgehalten wird. Die sekretorischen Mutanten von m152/gp40 dagegen hemmen das Wildtyp-H-2K<sup>b</sup> und das K<sup>b</sup> sol. ähnlich schwach im Transport. Der zytoplasmatische Bereich und die Transmembran-Region der MHC-Klasse-I-Moleküle ist also für den m152/gp40-Effekt nicht erforderlich.

In der Immunpräzipitation wurde gezeigt, dass das verkürzte K<sup>b</sup> sol. durch m152/gp40 zurückgehalten werden kann (Abb. 18). Ob die Lokalisation von akkumulierten K<sup>b</sup> sol. die gleiche ist wie die von Wildtyp-H-2K<sup>b</sup>, wurde anschließend in der Immunfluoreszenz untersucht. B12-Transfektanten, die m152/gp40 exprimieren (Ziegler et al., 1997), wurden mit den Konstrukten pCR3-K<sup>b</sup> und pCR3-K<sup>b</sup>sol. transient transfiziert (2.2.5). Zirka 24 Stunden nach der Transfektion wurde zu den Zellen Leupeptin (50 µg/ml) gegeben, um den lysosomalen Abbau von m152/gp40 zu verhindern. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen MHC-Klasse-I-Moleküle gefärbt. Parallel wurden die Zellen mit Antikörpern gegen Proteine gefärbt, welche für bestimmte Zellkompartimente charakteristisch sind. Die Färbung für das MHC-Klasse-I-Molekül und das charakteristische Protein eines Zellkompartiments wurden am Computer übereinandergelegt, um eine eventuelle Kolo-kalisation der Moleküle zu erkennen. Das virale Protein m152/gp40 kolokalisiert nicht mit den MHC-Klasse-I-Molekülen (Abb. 20 a), da es vermutlich nur transient oder über ein drittes Protein mit MHC-Klasse-I-Molekülen interagiert. Wird das ER durch die Färbung spezifischer Proteine dargestellt (Abb. 20 b, K<sup>b</sup> sol.), so kolokalisiert K<sup>b</sup> sol. mit den Proteinen PDI (Huovila et al., 1992) und Calretikulin (Nauseef et al., 1995). Eine Kolo-kalisation mit Calnexin (Wada et al., 1991) findet nur teilweise statt. Das akkumulierte H-2K<sup>b</sup> dagegen zeigt ein anderes Muster nach der Färbung (Abb. 20 b, H-2K<sup>b</sup>) und kolokalisiert mit dem Protein p58, das hauptsächlich im „ER-Golgi intermediate compartment“ (ERGIC) zu finden ist (Saraste und Svensson, 1991), sowie mit Rab6 - ein Protein, das im Golgi zu finden ist (Goud et al., 1990; Abb. 20 c und d). Die Färbung der Endosomen und Lysosomen zeigt keine Übereinstimmung mit der von MHC-Klasse-I-Molekülen (Abb. 20 e). Zur Kontrolle wurden B12-Zellen, die kein m152/gp40 exprimieren gefärbt. H-2K<sup>b</sup> kann auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden, wenn die Zellen zuvor nicht permeabilisiert wurden. Dagegen kann K<sup>b</sup> sol. nicht nachgewiesen werden, da die Anzahl der Moleküle im Export-Weg aus der Zelle zu gering ist. Dort gelangt K<sup>b</sup> sol. in den Kulturüberstand und ist nicht mehr nachweisbar.





**Abb. 20 Zurückgehaltenes K<sup>b</sup> sol. akkumuliert in einem anderen Kompartiment als H-2K<sup>b</sup>.**

B12-Transfektanten, die m152/gp40 exprimieren (a-e) wurden transient transfiziert mit einem Konstrukt, das H-2K<sup>b</sup>, bzw. K<sup>b</sup> sol. exprimiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen MHC-Klasse-I-Moleküle (R1.21.2) und einem Antikörper gegen ein Protein eines speziellen intrazellulären Kompartiments gefärbt. (a) Färbung von MHC-Klasse-I-Molekülen (R1.21.2) und m152/gp40 mit dem Serum p11 (b) Drei Proteine, die typisch für das ER sind, wurden gefärbt mit anti-Calnexin, anti-Proteindisulfidomerase und anti-Calretikulin. (c) Das für das „ER-Golgi intermediate compartment“ (ERGIC) und cis-Golgi charakteristische Protein p58 wurde mit einem anti-p58-Kaninchenserum gefärbt. (d) Die Bereiche des Golgi wurden mit einem Kaninchenserum gegen das Protein Rab6 gefärbt. (e) Endosomen und Lysosomen wurden mit dem Farbstoff DAMP gefärbt. Dargestellt ist in der linken Spalte die Färbung des MHC-Klasse-I-Moleküls. In der Mitte ist jeweils ein Protein, das ein bestimmtes Kompartiment charakterisiert, gezeigt. In der rechten Spalte sind die beiden Färbungen übereinandergelegt. Die Farbe gelb signalisiert eine Kolo-kalisation der beiden gefärbten Proteine im gleichen Kompartiment. H-2K<sup>b</sup> und K<sup>b</sup> sol. kolo-kalisieren nicht mit m152/gp40. H-2K<sup>b</sup> wird nach der Akkumulation im ERGIC/cis-Golgi (c), sowie im Golgi (d) nachgewiesen. Im Unterschied dazu akkumuliert K<sup>b</sup> sol. im ER, wobei die Kolo-kalisation mit Calnexin nicht stark ausgeprägt ist (b). Weder H-2K<sup>b</sup> noch K<sup>b</sup> sol. können in den Endosomen und Lysosomen nachgewiesen werden (e). (f) B12-Zellen, die kein m152/gp40 exprimieren wurden zur Kontrolle gefärbt. Für die Färbung von H-2K<sup>b</sup> wurden die Zellen nicht permeabilisiert, um die Moleküle auf der Zelloberfläche darstellen zu können. K<sup>b</sup> sol. ist nicht nachweisbar, da es in den Kulturüberstand gelangt, wenn es nicht von m152/gp40 zurückgehalten wird. Die Moleküle, die gerade zur Zelloberfläche transportiert werden, sind wahrscheinlich in zu geringer Menge vorhanden, um sie nachzuweisen.

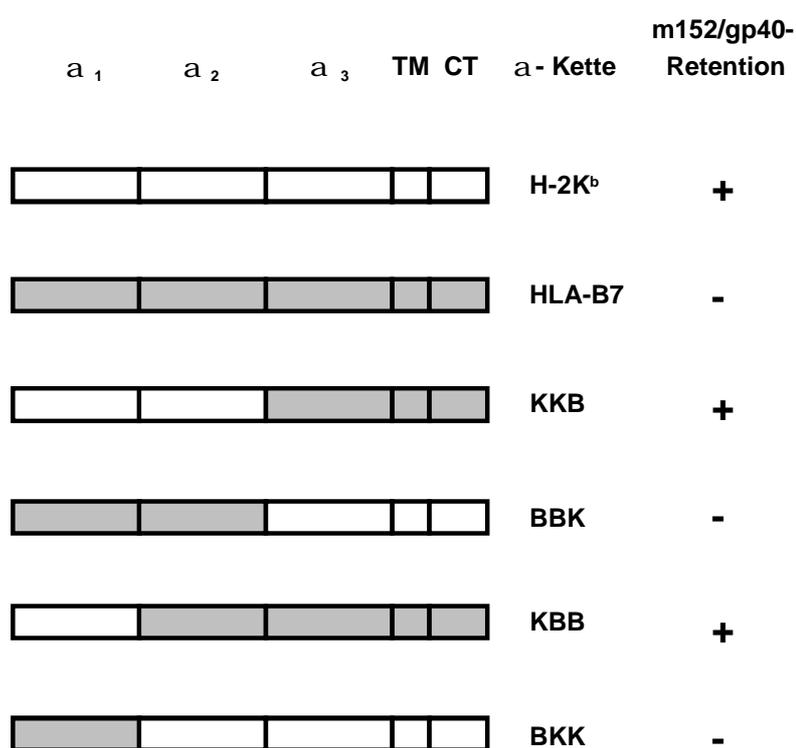
In Gegenwart von m152/gp40 akkumuliert K<sup>b</sup> sol. bereits im ER, wohingegen H-2K<sup>b</sup> in einem Kompartiment zwischen ER und Golgi („ER-Golgi intermediate compartment“) und im frühen Golgi akkumuliert (Ziegler et al, 1997).

**3.3.2 Die  $\alpha_1$ -Domäne der schweren Kette ist wichtig für den m152/gp40-Effekt**

Das Genprodukt m152/gp40 von MCMV wirkt nur auf murine, nicht aber auf humane MHC-Klasse-I-Moleküle (3.1.2). Der Austausch einzelner Domänen der schweren Kette humaner Moleküle durch entsprechende Domänen der schweren Kette der Maus bietet eine Möglichkeit, Domänen der schweren Kette zu definieren, die von m152/gp40 erkannt werden. In Abb. 21 ist schematisch dargestellt, welche Chimären nach Austausch der drei Domänen des luminalen Bereichs von HLA-B7 und H-2K<sup>b</sup> verwendet wurden. Diese Chimären wurden untersucht, ob sie in HeLa-Zellen von m152/gp40 zurückgehalten werden können.

Die  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ -Domäne von H-2K<sup>b</sup> wurde gegen die entsprechenden Bereiche aus HLA-B7 ausgetauscht und die chimären Konstrukte KKB und BBK erhalten (Tanabe et al., 1989). Diese DNA-Konstrukte wurden mit einem Plasmid, das für eine Neomycin-Resistenz kodiert, in HeLa-Zellen kotransfiziert und stabile Klone nach Zugabe von Geneticin selektiert. Die Expression der chimären MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche wurde in der Fluoreszenzzytometrie nach einer Färbung mit den Antikörpern ME1 (anti HLA-B7) und B8-

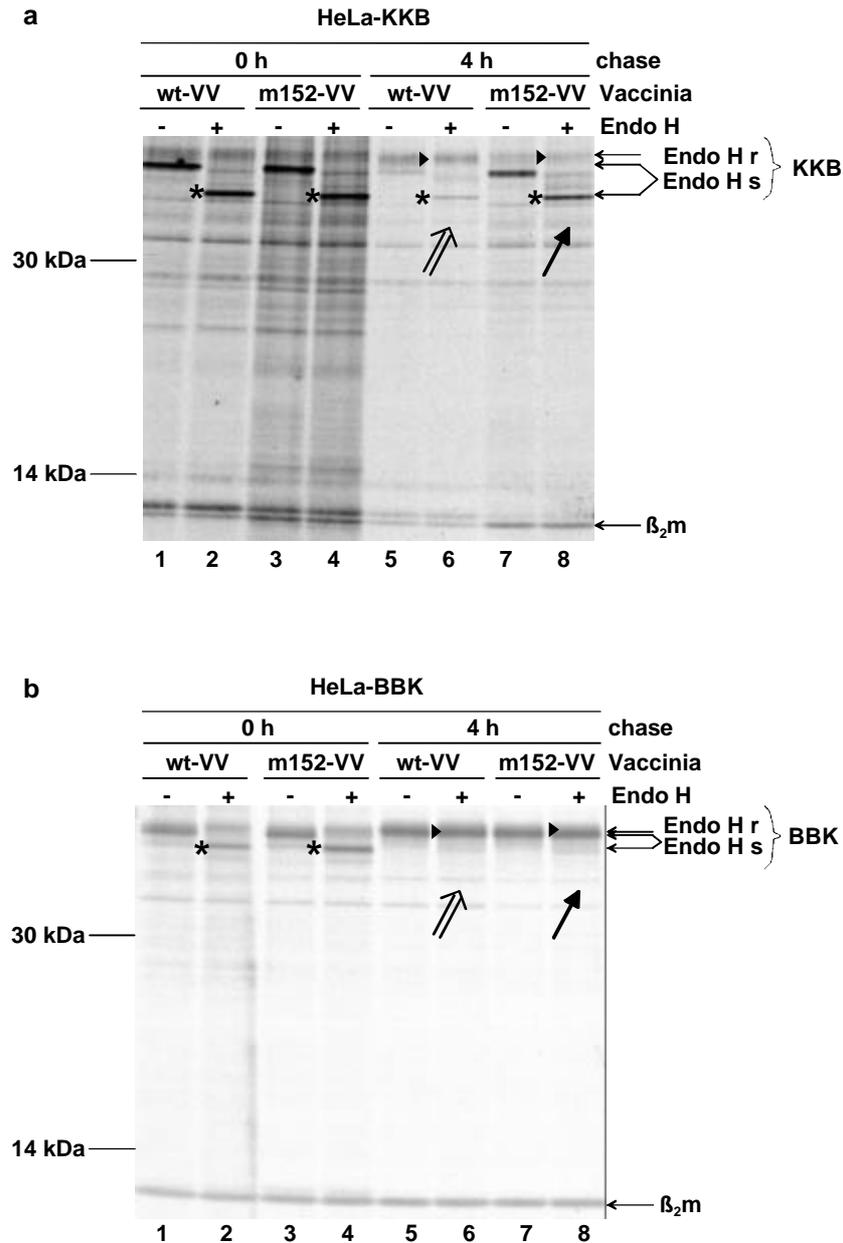
24-3s (anti H-2K<sup>b</sup>) getestet. Beide Antikörper erkennen die  $\alpha_1$ -Domäne der schweren Kette. Jeweils eine stabile Transfektante wurde nach Wildtyp-Vaccinia-Virusinfektion auf die Reifung der chimären Moleküle untersucht. Nach 4 Stunden Reifungszeit ist der größte Teil der KKB-Moleküle Endo H-resistent (Abb. 22 a, Spur 6, schwarzes Dreieck). Aufgrund der veränderten Struktur des chimären Moleküls scheinen KKB-Moleküle etwas langsamer zu reifen als H-2K<sup>b</sup> (Abb. 7 b). Die BBK chimären Moleküle sind nach 4 Stunden Reifungszeit



**Abb. 21 Schematische Darstellung der Chimären.**

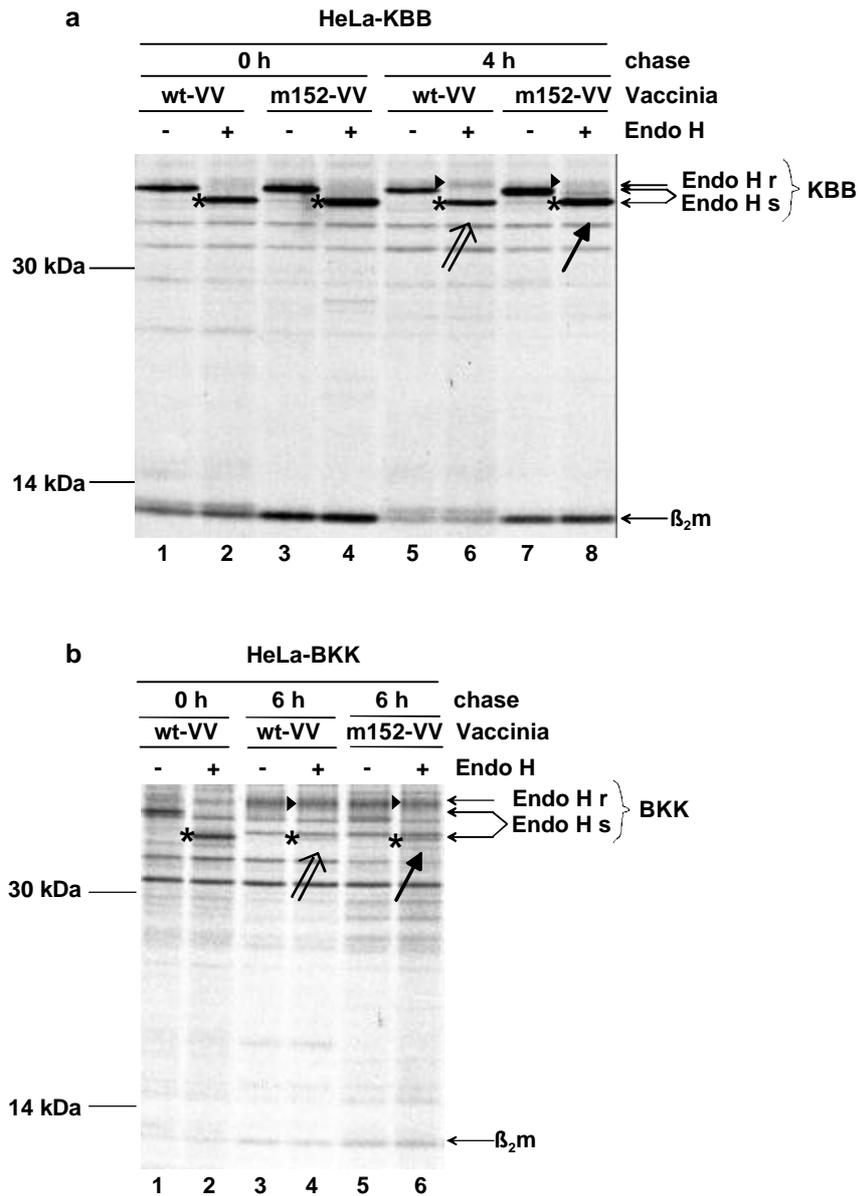
Schematische Darstellung der schweren Kette von HLA-B7 (grau) und H-2K<sup>b</sup> (weiß). Wildtyp und chimäre Moleküle der Allele HLA-B7 (grau) und H-2K<sup>b</sup> (weiß) mit Transmembran- und zytoplasmatischer Domäne.  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ : Domänen des luminalen Bereichs; TM: Transmembran-Domäne; CT: zytoplasmatische Domäne. Es ist angegeben, ob die Moleküle durch m152/gp40 zurückgehalten werden.

Endo H-resistent (Abb. 22 b, Spur 6, schwarzes Dreieck). Wird in den Transfektanten m152/gp40 exprimiert, so wird die Chimäre KKB zurückgehalten, wenn auch nicht vollständig (Abb. 22 a, Spur 8). Ein Vergleich mit H-2K<sup>b</sup> (Abb. 7 b) zeigt, dass diese Moleküle auch nicht vollständig von m152/gp40 zurückgehalten werden konnten. Die Chimäre BBK dagegen ist durch den m152/gp40-Effekt nicht betroffen (Abb. 22 b, Spur 8). Daraus kann gefolgert werden, dass die  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ -Domäne ausreichen, um den Transport der MHC-Klasse-I-Moleküle durch m152/gp40 zu verhindern.



**Abb. 22 Die  $a_1$ - und  $a_2$ -Domäne von H-2K<sup>b</sup> vermitteln die Transportinhibition durch m152/gp40.**

HeLa-Transfektanten, welche die chimären schweren Ketten KKB (a) oder BBK (b) exprimieren wurden mit Wildtyp-Vaccinia-Virus (wt-VV) oder einem m152/gp40 exprimierenden Vaccinia-Virus (m152-VV) infiziert. Die Zellen wurden 30 min. mit [<sup>35</sup>S]Cys/Met metabolisch markiert und im Anschluss (0 h) oder nach 4 h Reifungszeit (4 h) in Igepal-Lysepuffer lysiert. Die Chimäre KKB wurde mit dem mAK B8-24-3s (anti H-2K<sup>b</sup>) und die Chimäre BBK mit dem mAK ME1 (anti HLA-B7) präzipitiert. Das Präzipitat wurde geteilt und mit Endo H (+) oder ohne das Enzym (-) behandelt. Die Proteine wurden auf einem 11-13% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Endo H-sensitive Moleküle sind durch ein Sternchen, Endo H-resistente Moleküle durch ein Dreieck gekennzeichnet. (a) Die Mehrheit der KKB-Moleküle ist nach 4 Stunden Infektion mit Wildtyp-Vaccinia-Virus Endo H-resistent geworden (weißer Pfeil). In Gegenwart von m152/gp40 sind deutlich mehr Moleküle Endo H-sensitiv (schwarzer Pfeil). Die Endo H-resistenten KKB-Moleküle werden durch den Antikörper schlechter erkannt, als die retentierten, da die Radioaktivität der Zellysate gemessen und angeglichen wurde. (b) Die BBK-Moleküle wurden vollständig Endo H-resistent nach Wildtyp-Vaccinia-Virusinfektion (weißer Pfeil) und konnten auch nach Expression von m152/gp40 nicht am Transport zur Zelloberfläche gehindert werden (schwarzer Pfeil). r, Endo H resistent; s, Endo H sensitiv.



**Abb. 23** Die  $\alpha_1$ -Domäne von H-2K<sup>b</sup> wird von m152/ gp40 erkannt.

HeLa-Transfektanten, welche die chimären, schweren Ketten KBB (a) oder BKK (b) exprimieren, wurden mit Wildtyp-Vaccinia-Virus (wt-VV) oder einem m152/gp40 exprimierenden Vaccinia-Virus (m152-VV) infiziert. Die Zellen wurden 30 min. mit [<sup>35</sup>S]Cys/Met metabolisch markiert und im Anschluss (0 h) oder nach 4 h, bzw. 6 h Reifungszeit (4 h / 6 h) in Igepal-Lysepuffer lysiert. Die Chimäre KBB wurde mit dem mAK B8-24-3s (anti H-2K<sup>b</sup>) und die Chimäre BKK mit dem mAK ME1 (anti HLA-B7) präzipitiert. Das Präzipitat wurde geteilt und mit Endo H (+) oder ohne das Enzym (-) behandelt. Die Proteine wurden auf einem 11-13% SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Endo H-sensitive Moleküle sind durch ein Sternchen, Endo H-resistente Moleküle durch ein Dreieck gekennzeichnet. (a) Die Mehrheit der KBB-Moleküle ist nach Infektion mit Wildtyp-Vaccinia-Virus und 4 h Reifung Endo H-sensitiv (weißer Pfeil, Sternchen). Aufgrund der Änderung der Struktur des chimären Moleküls scheinen die Moleküle von Chaperonen zurückgehalten zu werden. In Gegenwart von m152/gp40 ist die Bande Endo H-resistenter KBB-Moleküle schwächer (schwarzer Pfeil, schwarzes Dreieck). Die wenigen KBB-Moleküle, welche im Golgi prozessiert werden können sind von m152/gp40 retentiert worden. (b) Die BKK-Moleküle wurden fast vollständig Endo H-resistent nach 6 Stunden Reifung (weißer Pfeil, Schwarzes Dreieck). Nach Expression von m152/gp40 wurde nur ein geringer Teil der Moleküle zurückgehalten (schwarzer Pfeil, Sternchen). Die Mehrheit der BKK-Moleküle wurde im Golgi prozessiert und nicht von m152/gp40 zurückgehalten (schwarzer Pfeil, schwarzes Dreieck). r, Endo H resistent; s, Endo H sensitiv.

Um den Bereich der schweren Kette weiter einzugrenzen, der für die Inhibition des Transports durch m152/gp40 wichtig ist, wurden Chimären untersucht, deren  $\alpha_1$ -Domäne ausgetauscht war. Die Konstrukte KBB und BKK (Tanabe et al., 1989) wurden mit einem Plasmid, das für eine Neomycin-Resistenz kodiert, in HeLa-Zellen stabil transfiziert. Jeweils eine Transfektante wurde infiziert mit Wildtyp-Vaccinia-Virus, um die Reifung der chimären MHC-Klasse-I-Moleküle zu untersuchen. Nur wenige Moleküle der Chimäre KBB sind nach 4 Stunden Reifungszeit im Golgi prozessiert und Endo H-resistent geworden (Abb. 23 a, Spur 6, schwarzes Dreieck). Auch nach einer längeren Reifungszeit von 8 Stunden wurden nicht mehr Moleküle zur Zelloberfläche transportiert (Daten nicht gezeigt). Es scheint der Austausch der  $\alpha_1$ -Domäne die MHC-Klasse-I-Moleküle so zu verändern, dass sie kaum zur Zelloberfläche transportiert werden, da sie möglicherweise von Chaperonen zurückgehalten werden. Diese schwache Bande Endo H-resistenter KBB-Moleküle ist nach Expression von m152/gp40 aber nicht mehr zu sehen (Abb. 23 a, Spur 8, schwarzes Dreieck). Zudem zeigt die stärkere Intensität der  $\beta_2$ -Mikroglobulin-Bande in den Spuren 6 und 8, dass weniger Moleküle nach m152-Vaccinia-Virusinfektion die Zelloberfläche erreichen konnten, da kein radioaktiv markiertes  $\beta_2$ -Mikroglobulin an der Zelloberfläche ausgetauscht werden konnte. Die chimären BKK-Moleküle dagegen werden gut an die Zelloberfläche transportiert (Abb. 23 b, Spur 4). Nach Expression von m152/gp40 wird ein geringer Teil der BKK-Moleküle von m152/gp40 zurückgehalten (Abb. 23, Spur 6). Daraus kann man folgern, dass die  $\alpha_2$ -Domäne eine geringe Rolle spielt bei der Inhibition des Transports von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m152/gp40. Wichtiger scheint die  $\alpha_1$ -Domäne zu sein, denn der größte Teil der BKK-Chimären ist durch den m152/gp40-Effekt nicht betroffen.

### **3.4 Untersuchung der immunmodulierenden Genprodukte m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 während der Virusinfektion**

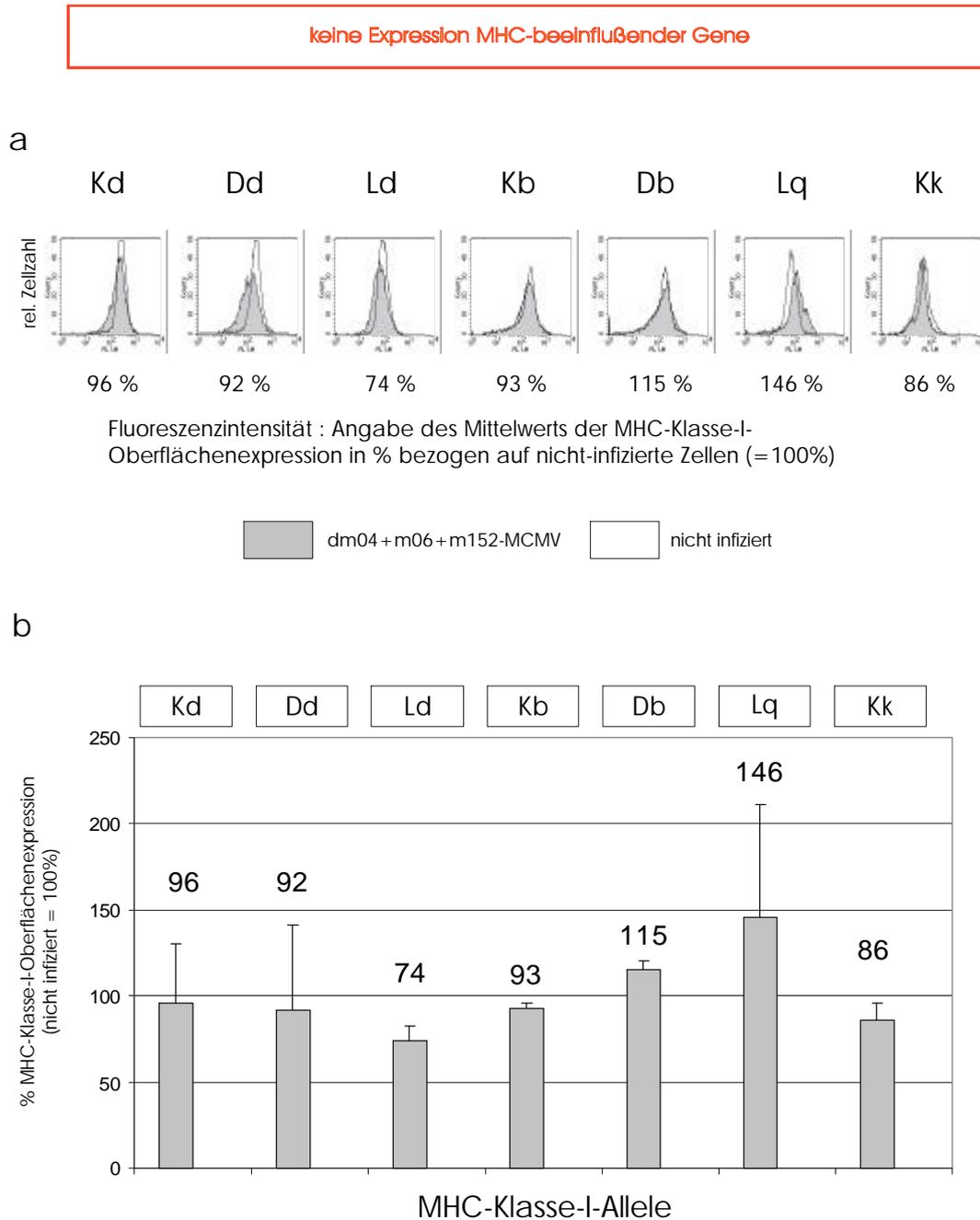
Die Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle wird während der Zytomegalievirusinfektion von den drei viralen Genprodukten m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 beeinflusst. M04/gp34 bindet an MHC-Klasse-I-Moleküle (Kleijnen et al., 1997) und verhindert an der Zelloberfläche eine Erkennung dieser durch CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Kavanagh et al., 2001). Die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen scheint nicht durch m04/gp34 reduziert zu werden, da die Exportrate von H-2K<sup>b</sup> sich nicht verändert. Hingegen bewirken die Genprodukte m06/gp48 und m152/gp40 eine Reduktion der Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen. Es konnte für m06/gp48 eine direkte

Interaktion mit MHC-Klasse-I-Molekülen gezeigt werden, während man für m152/gp40 einen transienten Interaktionsmechanismus vermutet (Reusch et al., 1999; Ziegler et al., 1997; Ziegler et al., 2000). Alle diese Erkenntnisse beruhen auf der Expression der Gene in Zellen. Daher war es von Interesse den gegenseitigen Einfluss der immunmodulierenden Genprodukte m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 aufeinander während der Virusinfektion zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Gene *m04*, *m06* und *m152* einzeln und in verschiedenen Kombinationen aus dem MCMV-Genom deletiert (Wagner, 2000).

Im Folgenden wurden diese Virusmutanten in der Fluoreszenzzytometrie nach Infektion verschiedener Zelllinien auf die Fähigkeit getestet, die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche zu reduzieren. Unter Verwendung verschiedener Zelllinien konnte die Frage der Allelspezifität der viralen Genprodukte untersucht werden.

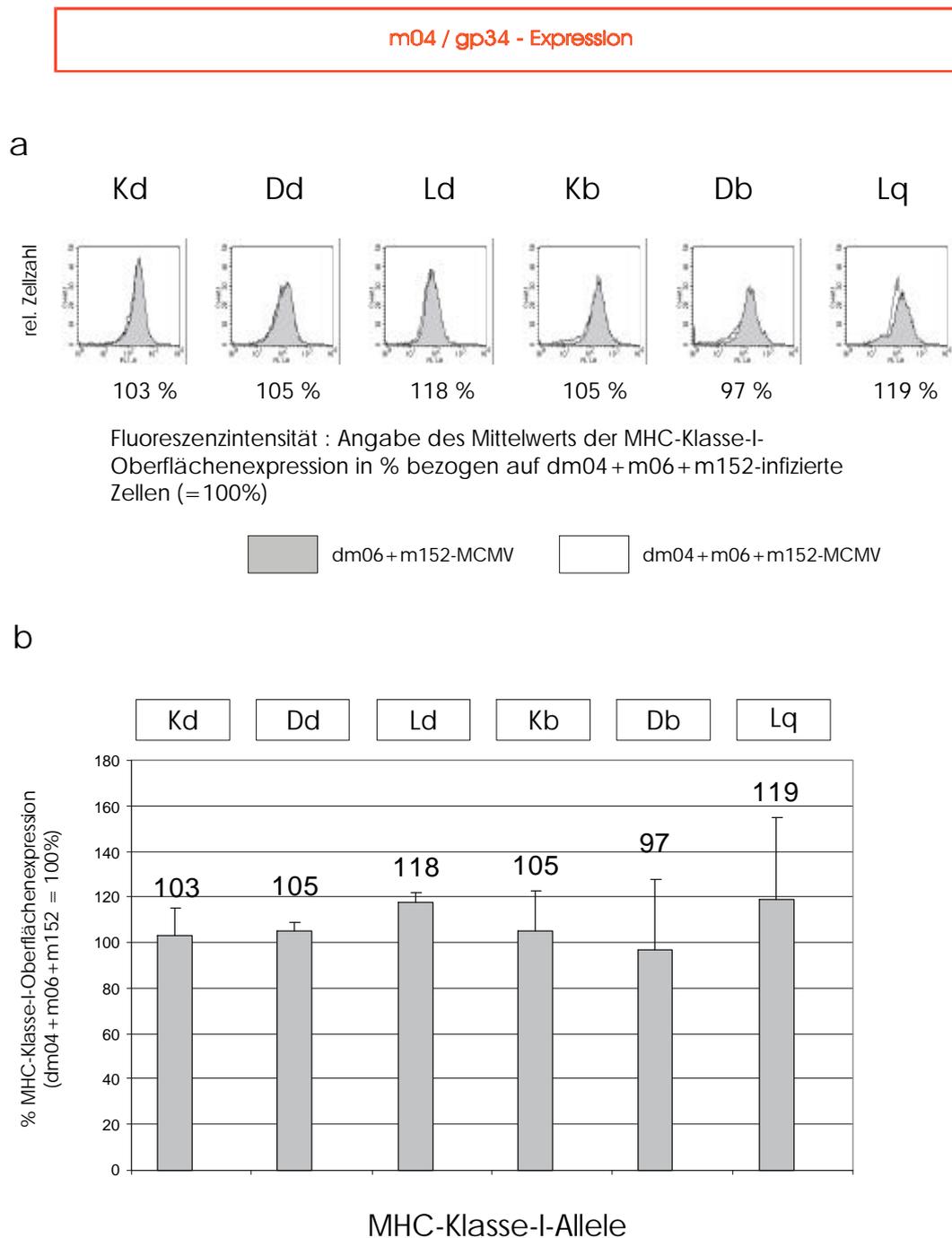
#### *3.4.1 Neben m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 kodiert MCMV für keine weiteren Gene mit Einfluss auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression*

Zunächst wurde untersucht, ob neben den drei MHC-Klasse-I-modulierenden Genen *m04*, *m06* und *m152* noch weitere Gene in MCMV für ein Produkt kodieren, das die Antigenpräsentation beeinflussen kann. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien B12 (Haplotyp H-2<sup>d</sup>), C57SV (Haplotyp H-2<sup>b</sup>), NIH 3T3 (H-2L<sup>q</sup>) und 1T-K<sup>k</sup> (H-2K<sup>k</sup> Transfektanten) mit Virusmutanten, Wildtyp-MCMV, oder nicht infiziert. 12 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit Hilfe spezifischer Antikörper in der Durchflusszytometrie untersucht. Es wurden die Allele H-2K<sup>d</sup>, H-2D<sup>d</sup>, H-2L<sup>d</sup>, H-2K<sup>b</sup>, H-2D<sup>b</sup> und H-2L<sup>q</sup> gemessen. Das Allel H-2K<sup>k</sup> wurde nur auf die Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression nach Infektion mit Wildtyp-MCMV untersucht. Parallel wurden die Zellen mit Saponin permeabilisiert und intrazellulär das virale Protein pp89 als Infektionskontrolle gefärbt. In einem Versuch wurde jeweils eine Zelllinie mit sämtlichen Virusmutanten parallel untersucht und zwei (H-2K<sup>b</sup>, -D<sup>b</sup>, -K<sup>k</sup>, -L<sup>d</sup>) oder drei Versuche (H-2K<sup>d</sup>, -D<sup>d</sup>, -L<sup>q</sup>) durchgeführt. Von diesen Ergebnissen wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensität der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression berechnet. Der Durchschnittswert der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression von nicht infizierten Zellen wurde als 100 % definiert. Der Vergleich der Werte von nicht infizierten Zellen mit Zellen, die mit der Triple-Deletionsmutante infiziert waren, zeigt dass MCMV keine weiteren MHC-Klasse-I-modulierenden Gene kodiert, da die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nur



**Abb. 24** Es gibt keine weiteren Genprodukte außer m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40, welche die Oberflächenexpression von H-2-Molekülen beeinflussen.

Dargestellt ist die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in verschiedenen Zelllinien 12 Stunden nach Infektion als FACS-Diagramm (a) und als Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten mehrerer Versuche im Balkendiagramm (b). Zellen wurden mit einer m.o.i. von 0,3 mit der MCMV-Mutante  $\Delta$ m04+m06+m152 (grau) oder nicht infiziert (weiß). 12 Stunden nach Infektion wurden mit spezifischen Antikörpern verschiedene MHC-Klasse-I-Allele gefärbt und in der Durchflusszytometrie miteinander verglichen. Für (b) wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten aller durchgeführten Versuche gebildet und die Werte der Mutante  $\Delta$ m04+m06+m152 auf die Werte der nicht infizierten Zellen (definiert als 100%) bezogen, um sie graphisch darzustellen. Es wurden für H-2K<sup>d</sup>, -D<sup>d</sup>, -L<sup>q</sup> drei Versuche durchgeführt. Für H-2L<sup>d</sup>, -K<sup>b</sup>, -D<sup>b</sup> und -K<sup>k</sup> wurden zwei Versuche durchgeführt. Es sind keine signifikanten Veränderungen der Oberflächenexpression der MHC-Klasse-I-Moleküle zu erkennen, die auf ein MCMV-Genprodukt hinweisen, das die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression beeinflussen kann.



**Abb. 25 M04/gp34 verändert die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen nicht.**

Dargestellt ist die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in verschiedenen Zelllinien 12 Stunden nach Infektion als FACS-Diagramm (a) und als Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten mehrerer Versuche im Balkendiagramm (b). Zellen wurden mit einer m.o.i. von 0,3 mit der MCMV-Mutante  $\Delta m06+m152$  (grau) oder  $\Delta m04+m06+m152$  (weiß) infiziert. 12 Stunden nach Infektion wurden mit spezifischen Antikörpern verschiedene MHC-Klasse-I-Moleküle gefärbt und in der Durchflusszytometrie miteinander verglichen. Für (b) wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten aller durchgeführten Versuche gebildet und die Werte der Mutante  $\Delta m06+m152$  auf die Werte der Mutante  $\Delta m04+m06+m152$  (definiert als 100%) bezogen, um sie graphisch darzustellen. Es wurden für H-2K<sup>d</sup>, -D<sup>d</sup>, -L<sup>q</sup> drei Versuche durchgeführt. Für H-2L<sup>d</sup>, -K<sup>b</sup>, -D<sup>b</sup> und -K<sup>k</sup> wurden zwei Versuche durchgeführt. Es ist keine signifikante Veränderung der Oberflächenexpression der MHC-Klasse-I-Allele zu erkennen.

---

geringfügig verändert (Abb. 24). Die Erhöhung der H-2L<sup>q</sup>-Expression in NIH 3T3-Zellen kann möglicherweise auf der Freisetzung von Zytokinen beruhen, welche die MHC-Klasse-I-Expression erhöhen und in diesem Zelltyp stärker ausgeprägt ist. Insgesamt aber findet keine signifikante Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nach Deletion der drei MHC-Klasse-I-modulierenden Gene statt. Folglich gibt es keine weiteren Gene im MCMV-Genom, deren Produkte die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression reduzieren.

In allen folgenden Experimenten wurden die Werte der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression jeweils verglichen mit den Werten nach Infektion mit der Triple-Deletionsmutante.

#### *3.4.2 M06/gp48 und m152/gp40 sind die einzigen MCMV-Genprodukte, welche die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen reduzieren*

Der Einfluss von m04/gp34 auf die Reifungsdauer und Halbwertszeit von H-2K<sup>b</sup> wurde bereits mittels Immunpräzipitation untersucht. Es konnte keine Veränderung nach Infektion mit einer  $\Delta$ m04-Mutante festgestellt werden und es wurde daher vermutet, dass m04/gp34 keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen hat (Kavanagh et al., 2001). Hier wurde untersucht, ob dies mittels Fluoreszenzzytometrie bestätigt werden kann und auch auf andere MHC-Klasse-I-Allele außer H-2K<sup>b</sup> zutrifft. Ein Vergleich der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nach Infektion mit der  $\Delta$ m06+m152-Mutante, welche lediglich *m04* exprimiert, und der Triple-Deletionsmutante zeigt, dass die Expression des Gens *m04* keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression der getesteten MHC-Klasse-I-Allele hat (Abb. 25). Daraus kann gefolgert werden, dass die Funktion von m04/gp34 eine andere ist als Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression.

#### *3.4.3 Die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression verschiedener Allele ist nach MCMV-Infektion unterschiedlich stark reduziert*

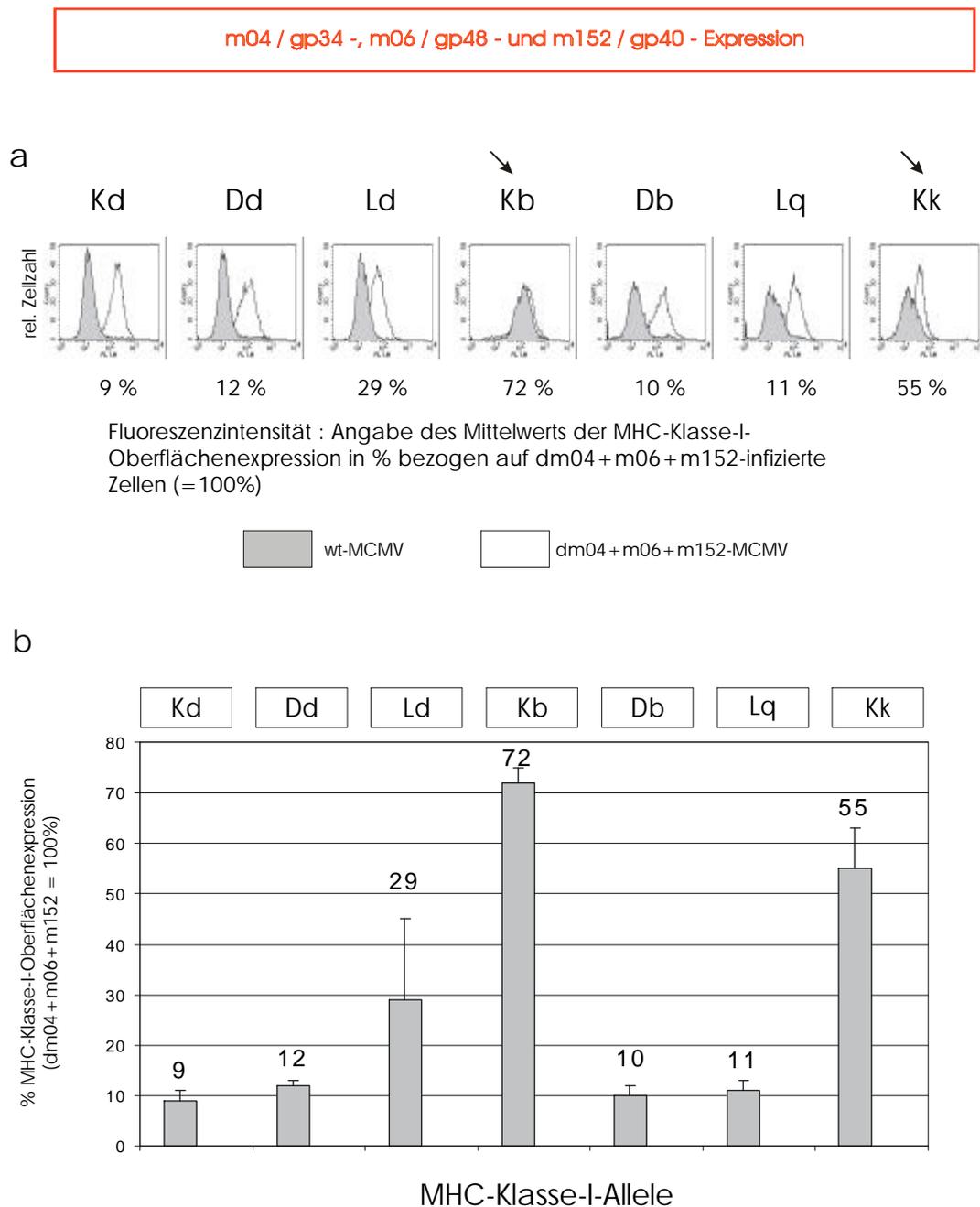
Eine Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression durch m06/gp48 und m152/gp40 wurde beschrieben (Reusch et al., 1999; Ziegler et al., 1997). Dabei sind allerdings nur einzelne Allele untersucht worden. Hier wurden verschiedene MHC-Klasse-I-Allele darauf getestet, in welchem Umfang eine Reduktion der MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche nach MCMV-Infektion stattfindet. Es wurde die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nach Wildtyp- und nach  $\Delta$ m04+m06+m152-Infektion verglichen. Es

fällt auf, dass das Allel H-2K<sup>b</sup> von MCMV nur sehr schwach zurückgehalten wird (Abb. 26 a, schwarzer Pfeil). Die Menge der MHC-Klasse-I-Moleküle nach MCMV-Infektion ist nur auf 72 % reduziert. H-2K<sup>k</sup> und H-2L<sup>d</sup> zeigen ebenfalls keine starke Reduktion der Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen. Die Oberflächenexpression ist reduziert auf 55 %, bzw. 29 % (Abb. 26 a, schwarze Pfeile). Die Signifikanz der wenig reduzierten H-2L<sup>d</sup>-Oberflächenexpression ist nach zwei Versuchen allerdings unsicher, da die Standardabweichung sehr groß ist. Es können also die MHC-Klasse-I-Allele H-2K<sup>b</sup> und H-2K<sup>k</sup> der Transportblockade durch m06/gp48 und m152/gp40 im Rahmen der MCMV-Infektion zum Teil entkommen. Deutlich beeinträchtigt ist dagegen die Oberflächenpräsentation der Allele H-2K<sup>d</sup>, -D<sup>d</sup>, -D<sup>b</sup> und -L<sup>q</sup>.

*3.4.4 Die Deletion von m06/gp48 verringert deutlich die Retention von MHC-Klasse-I-Molekülen, wohingegen die Deletion von m152/gp40 die Retention der MHC-Klasse-I-Moleküle nur minimal aufheben kann*

Es wurde geprüft, ob m06/gp48 oder m152/gp40 eine größere Rolle bei der Inhibition des Transports der MHC-Klasse-I-Moleküle spielt. Möglicherweise können auch beide Genprodukte in ähnlichem Maße MHC-Klasse-I-Moleküle zurückgehalten. Es wurden die Deletionsmutanten  $\Delta m06$  und  $\Delta m152$  zum Zeitpunkt 12 Stunden nach Infektion auf ihren Einfluss auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression untersucht und mit Wildtyp-MCMV infizierten Zellen verglichen. Die Deletion von *m06* oder *m152* führte in beiden Fällen zu einer höheren MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in infizierten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-MCMV infizierten Zellen (Abb. 27 b u. 28 c). Daraus kann gefolgert werden, dass keines der Gene allein MHC-Klasse-I-Moleküle so effektiv zurückgehalten kann, wie m06/gp48 und m152/gp40 in Kombination.

Die Deletion von m06 führt bei den Allelen H-2K<sup>d</sup>, -D<sup>d</sup>, -L<sup>d</sup> und -K<sup>b</sup> zu einer Wiederherstellung der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression, wenn diese mit  $\Delta m04+m06+m152$ -infizierten Zellen verglichen wird (Abb. 27 a und b). H-2L<sup>d</sup> wird sogar stärker an der Zelloberfläche nachgewiesen (167 % von  $\Delta m04+m06+m152$ ). Nur H-2D<sup>b</sup> und H-2L<sup>q</sup> ist in Abwesenheit von m06/gp48 im Transport gehemmt (auf jeweils 58 % und 45 %, Abb. 27 a u. b). Daraus kann geschlossen werden, dass m06/gp48 eine wichtige Rolle bei der Transportinhibition von MHC-Klasse-I-Molekülen 12 Stunden nach Virusinfektion spielt.

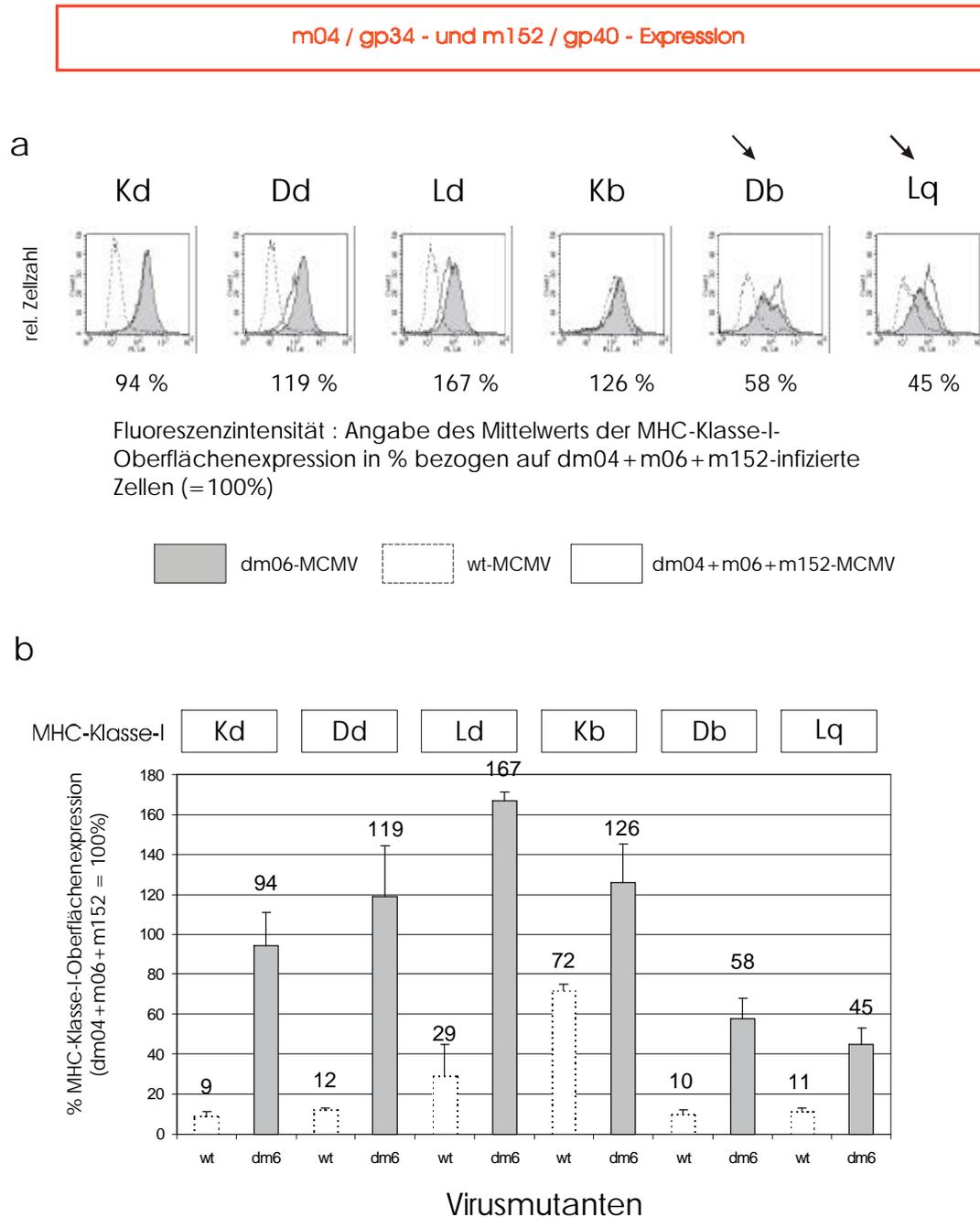


**Abb. 26 Eine Infektion mit Wildtyp-MCMV führt zu unterschiedlich starker Abnahme der Zelloberflächenexpression der getesteten MHC-Klasse-I-Allele.**

Dargestellt ist die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in verschiedenen Zelllinien 12 Stunden nach Infektion als FACS-Diagramm (a) und als Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten mehrerer Versuche im Balkendiagramm (b). Zellen wurden mit einer m.o.i. von 0,3 mit Wildtyp-MCMV (grau) oder der Mutante  $\Delta$ m04+m06+m152 (weiß) infiziert. 12 Stunden nach Infektion wurden mit spezifischen Antikörpern verschiedene MHC-Klasse-I-Moleküle gefärbt und in der Durchflusszytometrie miteinander verglichen. Für (b) wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten aller durchgeführten Versuche gebildet und die Werte von Wildtyp-MCMV auf die Werte der Mutante  $\Delta$ m04+m06+m152 (definiert als 100%) bezogen, um sie graphisch darzustellen. Es wurden für H-2K<sup>d</sup>, -D<sup>d</sup>, -L<sup>d</sup> drei Versuche durchgeführt. Für H-2L<sup>d</sup>, -K<sup>b</sup>, -D<sup>b</sup> und -K<sup>k</sup> wurden zwei Versuche durchgeführt. Die Oberflächenexpression der Allele H-2L<sup>d</sup>, H-2K<sup>b</sup> und H-2K<sup>k</sup> ist nach Infektion weniger stark reduziert als die der übrigen untersuchten Allele. Besonders H-2K<sup>b</sup> wird noch relativ stark auf der Zelloberfläche exprimiert. Die große Standardabweichung für H-2L<sup>d</sup> lässt keinen eindeutigen Schluss auf die Bedeutung der erhöhten MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression zu.

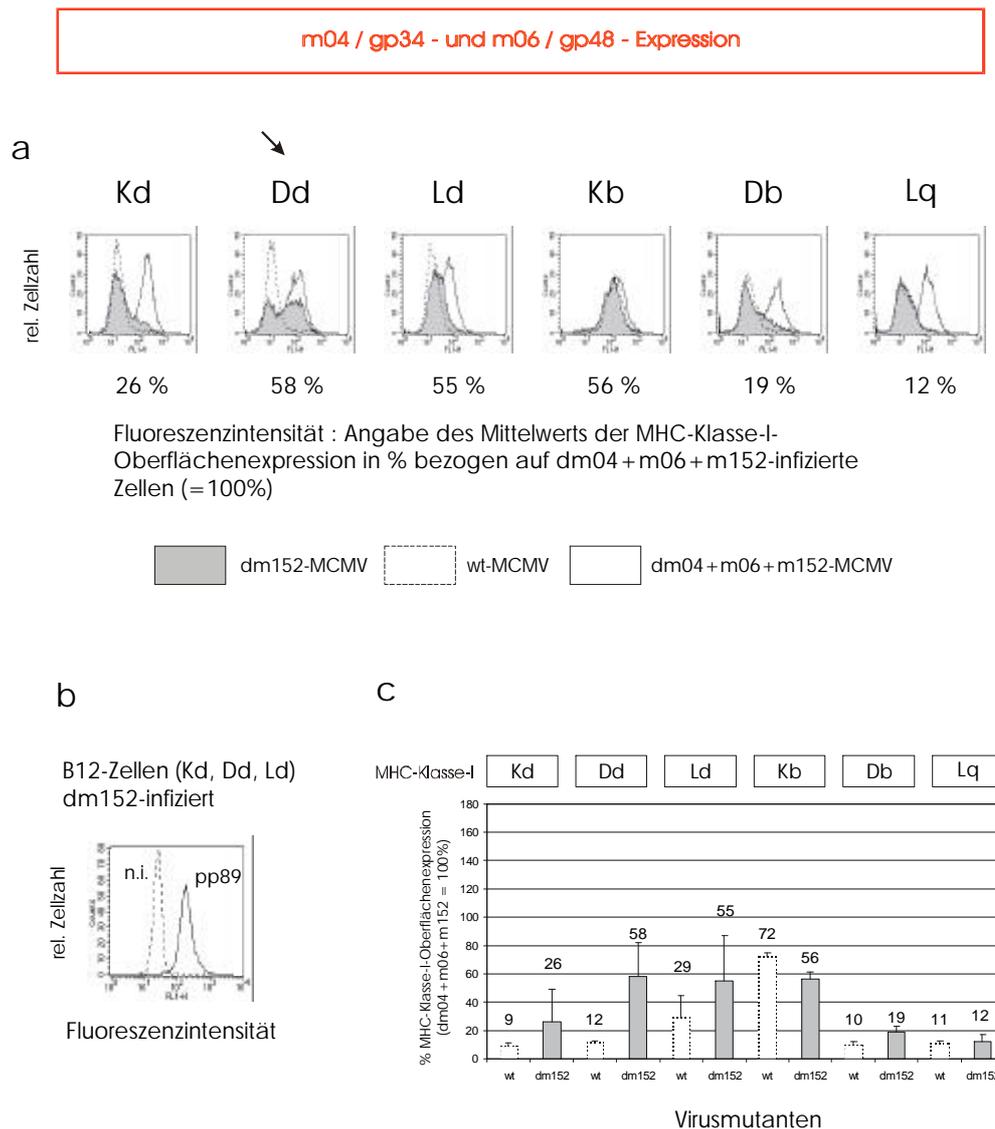
---

Eine weniger wichtige Rolle bei der Transportinhibition von MHC-Klasse-I-Molekülen spielt das Genprodukt *m152/gp40*. Das Fehlen dieses Genprodukts ( $\Delta m152$ ) während der Virusinfektion erhöht die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nur in geringen Mengen (Abb. 28 a und c). H-2D<sup>d</sup> ist eine Ausnahme, da in der FACS-Analyse zwei Zellpopulationen zu erkennen sind. Eine Population der infizierten Zellen zeigt eine geringe Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen, die andere nicht (Abb. 28 a, schwarzer Pfeil). Die Kontrolle der Virusinfektion zeigt, dass alle Zellen das virale Protein pp89 exprimieren (Abb. 28 b). Diese Beobachtung muss also mit einer Eigenschaft der Zellen zusammenhängen, die nur in einem Teil der Zellpopulation auftritt. Möglicherweise ist ein unbekannter Faktor in einem Teil der Zellen vorhanden, der die Transportblockade von MHC-Klasse-I-Molekülen durch *m06/gp48* entweder verhindert oder ermöglicht. Eine zweite Ausnahme ist H-2K<sup>b</sup>, das nach Deletion von *m152* etwas besser zurückgehalten wird als nach einer Wildtyp-Infektion (Abb. 28 c). Es ist fraglich, ob aus diesem geringen Unterschied gefolgert werden kann, dass *m152/gp40* die Akkumulation von H-2K<sup>b</sup> durch *m06/gp48* behindert. Die viralen Genprodukte *m06/gp48* und *m152/gp40* konkurrieren möglicherweise um die MHC-Klasse-I-Moleküle, die sie zurückhalten. Das Fehlen von *m152/gp40* könnte erklären, dass *m06/gp48* allein eine stärkere Wirkung auf die H-2K<sup>b</sup> Moleküle ausüben kann. Zusammenfassend kann ausgesagt werden, dass für die getesteten Allele die Deletion von *m06* die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression deutlicher erhöht als die Deletion von *m152* (Abb. 28 d). Daraus kann man ableiten, dass 12 Stunden nach Infektion das Genprodukt *m06/gp48* eine prominentere Rolle bei der Transportblockade von MHC-Klasse-I-Molekülen spielt, aber nur zusammen mit *m152/gp40* die bestmögliche Wirkung entfaltet.



**Abb. 27 M06/gp48 spielt eine wichtige Rolle bei der Inhibition des Transports von MHC-Klasse-I-Molekülen 12 Stunden nach Infektion.**

Dargestellt ist die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in verschiedenen Zelllinien 12 Stunden nach Infektion als FACS-Diagramm (a) und als Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten mehrerer Versuche im Balkendiagramm (b). Zellen wurden mit einer m.o.i. von 0,3 mit der MCMV-Mutante  $\Delta$ m06 (grau), mit Wildtyp-MCMV (gestrichelte Linie) oder  $\Delta$ m04+m06+m152 (weiß) infiziert. 12 Stunden nach Infektion wurden mit spezifischen Antikörpern verschiedene MHC-Klasse-I-Moleküle gefärbt und in der Durchflusszytometrie miteinander verglichen. Für (b) wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten aller durchgeführten Versuche gebildet und die Werte der Mutante  $\Delta$ m06 und von Wildtyp-MCMV auf die Werte der Mutante  $\Delta$ m04+m06+m152 (definiert als 100%) bezogen, um sie graphisch darzustellen. Es wurden für H-2K<sup>d</sup>, -D<sup>d</sup>, -L<sup>q</sup> drei Versuche durchgeführt. Für H-2L<sup>d</sup>, -K<sup>b</sup>, -D<sup>b</sup> und -K<sup>k</sup> wurden zwei Versuche durchgeführt. Ein Vergleich der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nach Wildtyp- (gestrichelt) und nach  $\Delta$ m06-Infektion (grau) zeigt, dass die Deletion von m06/gp48 zu einer starken Erhöhung der Oberflächenexpression führt.

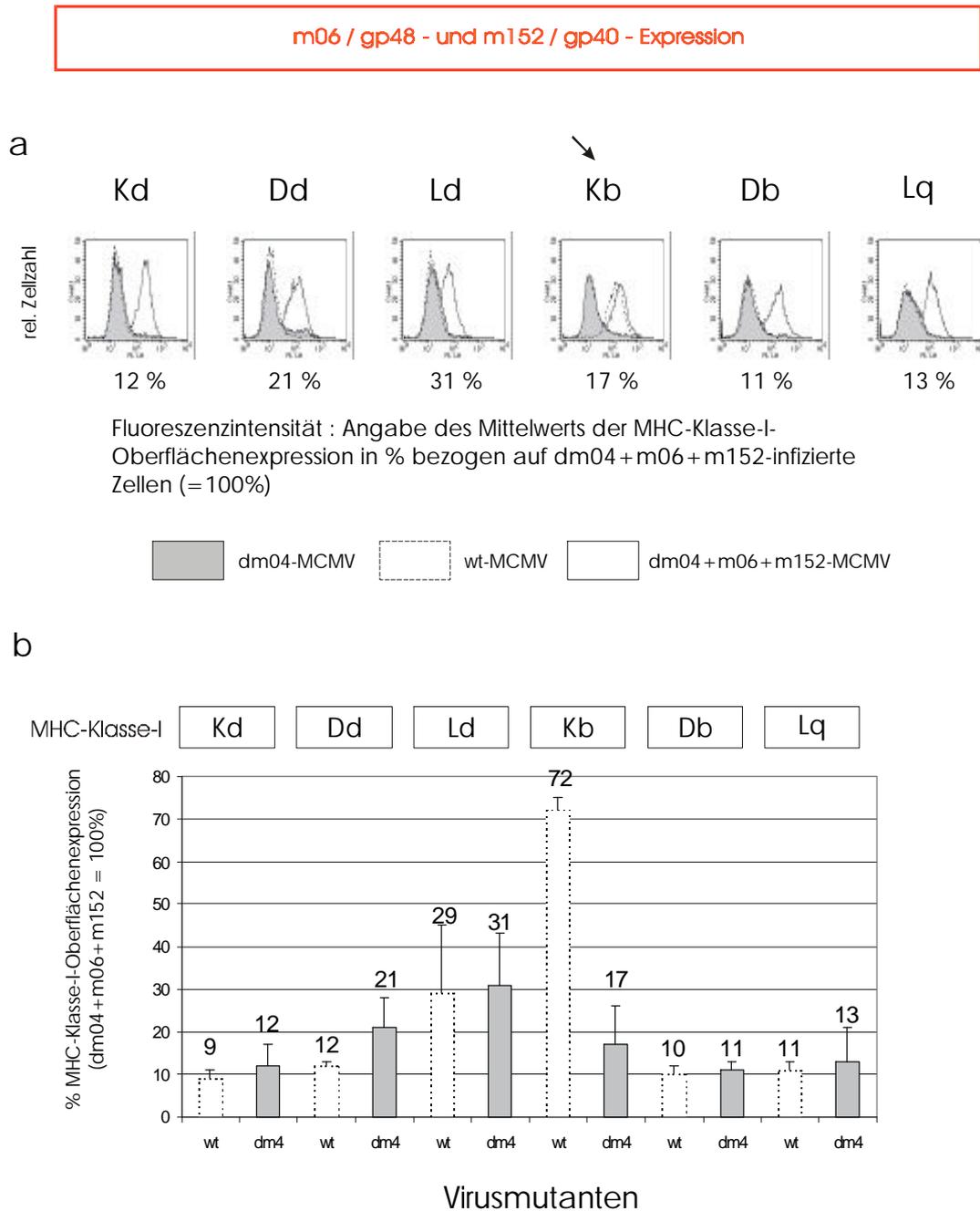


**Abb. 28 Die Deletion von m152/gp40 erhöht die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression 12 Stunden nach Infektion schwächer als die Deletion von m06/gp48.**

Dargestellt ist die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in verschiedenen Zelllinien 12 Stunden nach Infektion als FACS-Diagramm (a u. b) und als Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten mehrerer Versuche im Balkendiagramm (c u. d). Zellen wurden mit einer m.o.i. von 0,3 mit der MCMV-Mutante  $\Delta$ m152 (grau), mit Wildtyp-MCMV (gestrichelte Linie) oder  $\Delta$ m04+m06+m152 (weiß) infiziert. 12 Stunden nach Infektion wurden mit spezifischen Antikörpern verschiedene MHC-Klasse-I-Allele gefärbt und in der Durchflusszytometrie miteinander verglichen. Für (c) wurden Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten aller durchgeführten Versuche gebildet und die Werte der Mutante  $\Delta$ m152 und von Wildtyp-MCMV auf die Werte der Mutante  $\Delta$ m04+m06+m152 (definiert als 100%) bezogen, um sie graphisch darzustellen. Es wurden für H-2K<sup>d</sup>, -D<sup>d</sup>, -L<sup>d</sup> drei Versuche durchgeführt. Für H-2L<sup>d</sup>, -K<sup>b</sup>, -D<sup>b</sup> und -K<sup>k</sup> wurden zwei Versuche durchgeführt. Ein Vergleich der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nach Wildtyp- (gestrichelt, weiß) und nach  $\Delta$ m152-Infektion (grau) zeigt, dass die Deletion von m152/gp40 nur zu einer schwachen Erhöhung der Oberflächenexpression führt.

In (b) ist die Infektionskontrolle für B12-Zellen gezeigt. Die infizierten Zellen wurden mit Saponin permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen das virale Protein pp89 gefärbt. Die Kontrolle zeigt, dass die B12-Zellen das virale Protein exprimieren. Die zwei Populationen der B12-Zellen (a, schwarzer Pfeil), die unterschiedlich stark MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren, sind also nicht dadurch zu erklären, dass die Zellen nicht gut infiziert waren.

(d) Ein Vergleich der Werte der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nach Wildtyp- (gestrichelt),  $\Delta$ m152- (hellgrau) und  $\Delta$ m06- (dunkelgrau) Infektion zeigt, dass die Deletion von m06/gp48 einen größeren Effekt auf die Erhöhung der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression hat.



**Abb. 29** Das Genprodukt m04/gp34 beeinflusst die Transportblockade von H-2K<sup>b</sup> in der Wildtyp-Infektion.

Dargestellt ist die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in verschiedenen Zelllinien 12 Stunden nach Infektion als FACS-Diagramm (a) und als Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten mehrerer Versuche im Balkendiagramm (b). Zellen wurden mit einer m.o.i. von 0,3 mit der MCMV-Mutante  $\Delta$ m04 (grau), mit Wildtyp-MCMV (gestrichelte Linie) oder  $\Delta$ m04+m06+m152 (weiß) infiziert. 12 Stunden nach Infektion wurden mit spezifischen Antikörpern verschiedene MHC-Klasse-I-Allele gefärbt und in der Durchflusszytometrie miteinander verglichen. Für (b) wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten aller durchgeführten Versuche gebildet und die Werte der Mutante  $\Delta$ m04 und von Wildtyp-MCMV auf die Werte der Mutante  $\Delta$ m04+m06+m152 (definiert als 100%) bezogen, um sie graphisch darzustellen. Es wurden für H-2K<sup>d</sup>, -D<sup>d</sup>, -L<sup>d</sup> drei Versuche durchgeführt. Für H-2L<sup>d</sup>, -K<sup>b</sup>, -D<sup>b</sup> und -K<sup>k</sup> wurden zwei Versuche durchgeführt. Die Deletion von m04/gp34 hat nur auf die Oberflächenexpression von H-2K<sup>b</sup> einen Effekt. Wird m04/gp34 nicht exprimiert, so kann H-2K<sup>b</sup> ähnlich gut, wie andere getestete Allele, zurückgehalten werden.

### 3.4.5 *M04/gp34 behindert die Retention von H-2K<sup>b</sup>*

Die Bindung von m04/gp34 an MHC-Klasse-I-Moleküle (Kleijnen et al., 1997) lässt vermuten, dass dieses Genprodukt die Hemmung des Transports von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m06/gp48 oder m152/gp40 beeinflussen kann. In Abb. 25 wurde dargestellt, dass m04/gp34 nicht die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen reduziert. Um die Art des Einflusses von m04/gp34 auf die beiden Genprodukte m06/gp48 und m152/gp40 zu untersuchen, wurde eine Deletionsmutante von *m04* getestet ( $\Delta m04$ ). 12 Stunden nach Virusinfektion ist durch die Deletion von *m04* nur die Oberflächenexpression von H-2K<sup>b</sup> verändert (Abb. 29). Während H-2K<sup>b</sup> in der Wildtyp-Infektion nicht wirksam zurückgehalten wird, ist die H-2K<sup>b</sup>-Oberflächenexpression in Abwesenheit von m04/gp34 auf 17 % reduziert. Diese Menge an H-2K<sup>b</sup>-Molekülen auf der Zelloberfläche ähnelt den Werten der meisten anderen Allele. Daraus kann man schließen, dass m04/gp34 der Retention von H-2K<sup>b</sup> durch m06/gp48 und m152/gp40 entgegenwirkt. Da die Bindung von m04/gp34 an H-2K<sup>b</sup> gesichert ist (Kleijnen et al., 1997), findet möglicherweise eine Konkurrenz um H-2K<sup>b</sup> statt. Wahrscheinlich bindet m04/gp34 stärker an H-2K<sup>b</sup> als m06/gp48 oder m152/gp40 und ermöglicht so den Transport der Moleküle zur Zelloberfläche. Im Gegensatz zu H-2K<sup>b</sup> ist die Transportinhibition von H-2D<sup>d</sup> auf umgekehrte Weise von m04/gp34 beeinflusst. Die Deletion von m04/gp34 bewirkt eine leichte Erhöhung der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (Faktor 2), die aber aufgrund der großen Standardabweichung nicht gesichert ist. Auch auf die Oberflächenexpression der anderen getesteten Allele hat m04/gp34 keine signifikante Wirkung.

### 3.4.6 *M04/gp34 kann der Oberflächenreduktion von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m152/gp40 entgegenwirken, aber kaum der Oberflächenreduktion durch m06/gp48*

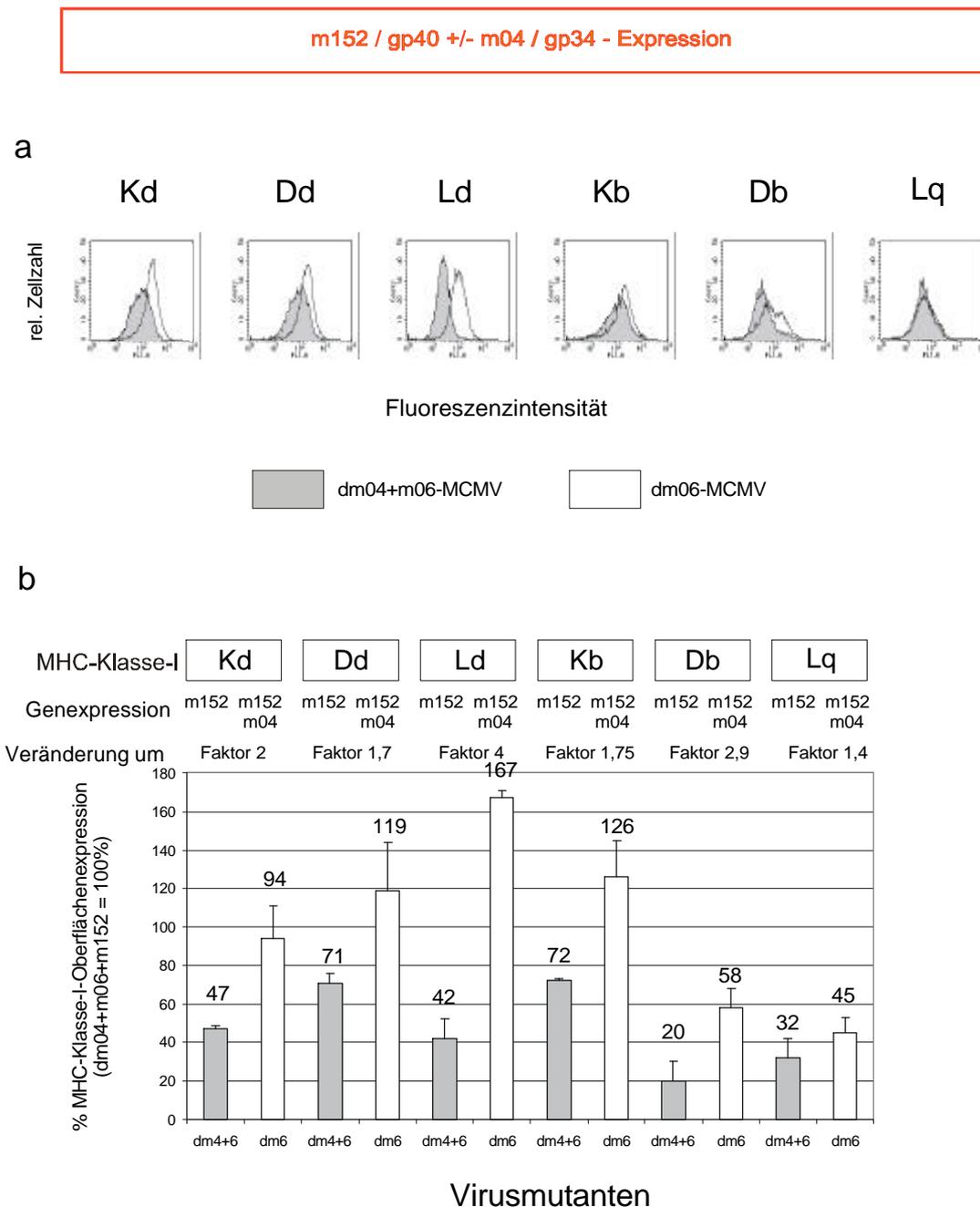
Es wurde untersucht, ob die antagonistische Wirkung von m04/gp48 auf die H-2K<sup>b</sup>-Oberflächenreduktion beide virale Genprodukte m06/gp48 und m152/gp40 oder besonders eines davon betrifft. Zu diesem Zweck wurden jeweils die MCMV-Mutanten  $\Delta m04+m06$  und  $\Delta m06$ , sowie  $\Delta m04+m152$  und  $\Delta m152$  miteinander verglichen. Betrachtet man die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression während der Expression von m152/gp40 in der Infektion, so sind deutlich weniger MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert als in Gegenwart von m152/gp40 und m04/gp34 (Abb. 30 a und b). Dies trifft auf alle MHC-

---

Klasse-I-Allele zu, in besonderem Maße aber auf H-2L<sup>d</sup> (Faktor 4 mehr MHC-Klasse-I-Moleküle). H-2L<sup>q</sup> ist am wenigsten betroffen von der m04/gp34-Funktion.

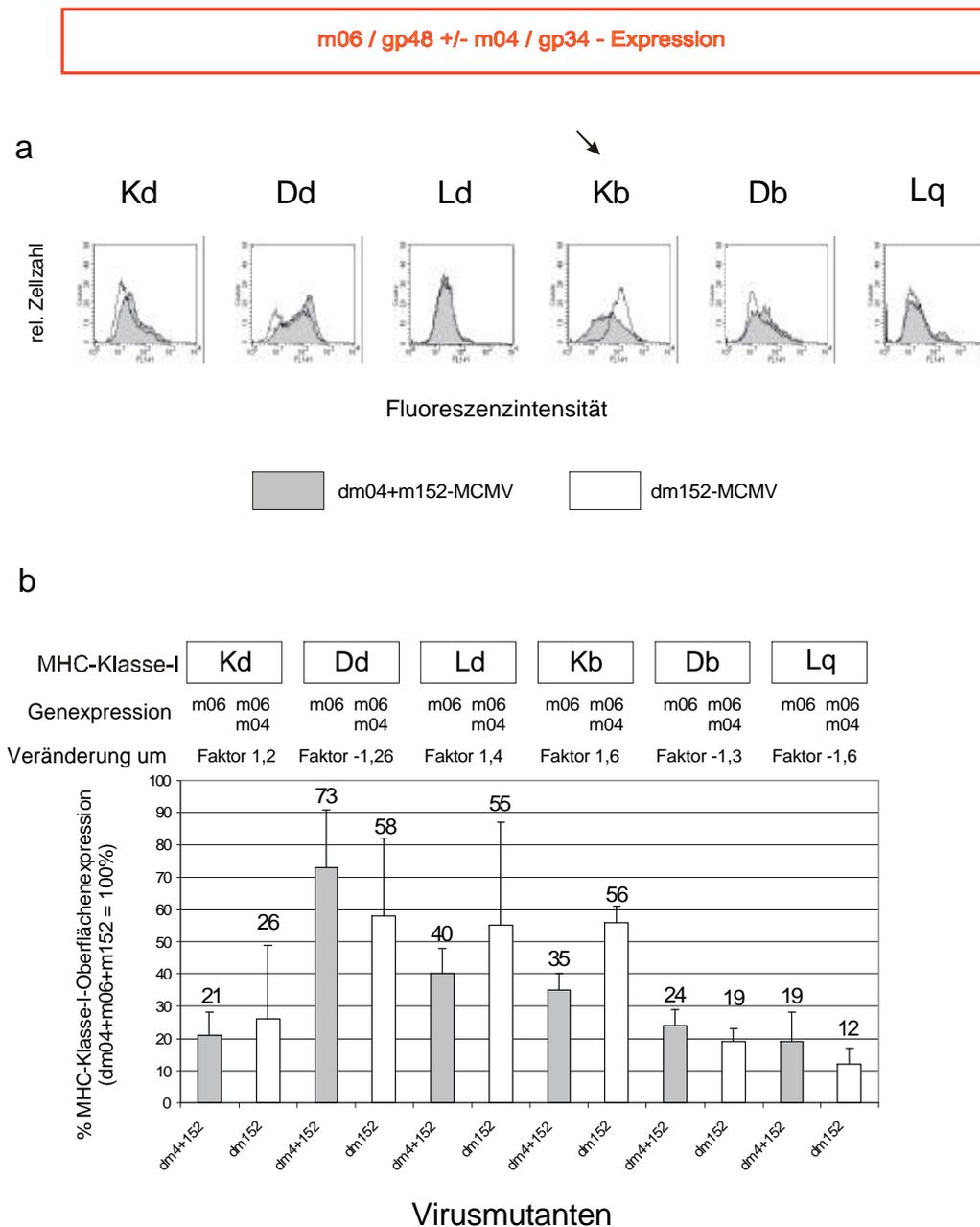
Im Gegensatz dazu kann m04/gp34 die Funktion von m06/gp48 kaum behindern (Abb. 31 a u. b). Allein H-2K<sup>b</sup> kann in Gegenwart von m04/gp34 vermehrt die Zelloberfläche erreichen (Abb. 31 a, schwarzer Pfeil). Für H-2L<sup>d</sup> erhöht sich die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression, aber aufgrund der hohen Standardabweichung ist diese Veränderung wahrscheinlich nicht signifikant (Abb. 31 b). Für H-2L<sup>q</sup> scheint ein umgekehrter Effekt aufzutreten: in Gegenwart von m04/gp34 wird H-2L<sup>q</sup> um den Faktor 1,6 besser zurückgehalten. Im Rahmen der geringen Zahl an Versuchswiederholungen sind diese Schwankungen wahrscheinlich nicht geeignet, um sie als mögliche Beeinflussung der Transportinhibition durch m04/gp34 zu interpretieren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass m04/gp34 auf die Transportblockade von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m152/gp40 aufheben kann, während der m06/gp48-Effekt eher nicht beeinflusst wird.



**Abb. 30 Die Funktion von m152/gp40 wird durch m04/gp34 antagonisiert.**

Dargestellt ist die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in verschiedenen Zelllinien 12 Stunden nach Infektion als FACS-Diagramm (a) und als Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten mehrerer Versuche im Balkendiagramm (b). Zellen wurden mit einer m.o.i. von 0,3 mit der Mutante  $\Delta m04+m06$  (grau),  $\Delta m06$  (weiß) oder  $\Delta m04+m06+m152$  (nicht gezeigt) infiziert. 12 Stunden nach Infektion wurden mit spezifischen Antikörpern verschiedene MHC-Klasse-I-Allele gefärbt und in der Durchflusszytometrie miteinander verglichen. Für (b) wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten aller durchgeführten Versuche gebildet und die Werte von  $\Delta m04+m06$  und  $\Delta m06$  auf die Werte der Mutante  $\Delta m04+m06+m152$  (definiert als 100%) bezogen, um sie graphisch darzustellen. Es wurden für H-2K<sup>d</sup>, -D<sup>d</sup>, -L<sup>d</sup> drei Versuche durchgeführt. Für H-2L<sup>d</sup>, -K<sup>b</sup>, -D<sup>b</sup> und -K<sup>k</sup> wurden zwei Versuche durchgeführt. Wird in der Virusinfektion zusätzlich zu m152/gp40 (grau) das Produkt m04/gp34 exprimiert (weiß), so ist ein Anstieg der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression zu sehen (b). Das Genprodukt m04/gp34 kann den Effekt von m152/gp40 vermindern, bzw. vollständig aufheben. Nur die H-2L<sup>d</sup>-Oberflächenexpression ist kaum verändert, wenn m04/gp34 zusätzlich exprimiert wird.



**Abb. 31 M06/gp48 wird von m04/gp34 nur schwach antagonisiert.**

Dargestellt ist die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression in verschiedenen Zelllinien 12 Stunden nach Infektion als FACS-Diagramm (a) und als Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten mehrerer Versuche im Balkendiagramm (b). Zellen wurden mit einer m.o.i. von 0,3 mit der Mutante  $\Delta$ m04+m152 (grau),  $\Delta$ m152 (weiß) oder  $\Delta$ m04+m06+m152 (nicht gezeigt) infiziert. 12 Stunden nach Infektion wurden mit spezifischen Antikörpern verschiedene MHC-Klasse-I-Moleküle gefärbt und in der Durchflusszytometrie miteinander verglichen. Für (b) wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten aller durchgeführten Versuche gebildet und die Werte von  $\Delta$ m04+m152 und  $\Delta$ m152 auf die Werte der Mutante  $\Delta$ m04+m06+m152 (definiert als 100%) bezogen, um sie graphisch darzustellen. Es wurden für H-2K<sup>d</sup>, -D<sup>d</sup>, -L<sup>d</sup> drei Versuche durchgeführt. Für H-2L<sup>d</sup>, -K<sup>b</sup>, -D<sup>b</sup> und -K<sup>k</sup> wurden zwei Versuche durchgeführt. Wird in der Virusinfektion zusätzlich zu m06/gp48 (grau) das Produkt m04/gp34 exprimiert (weiß), so ist keine signifikante Änderungen der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression zu sehen. Die teilweise hohen Standardabweichungen (b) zeigen, dass die geringen Schwankungen der Oberflächenexpression wahrscheinlich nicht von Bedeutung sind. Die Oberflächenexpression von H-2K<sup>b</sup> ist bei m04/gp34-Expression etwas erhöht (b). Das Genprodukt m04/gp34 kann den Effekt von m06/gp48 nicht stark beeinflussen.

## 4 DISKUSSION

Herpesviren sind eine erfolgreich in vielen Spezies verbreitete Virusfamilie und haben sich im Laufe der Koevolution mit ihren Wirten an deren Abwehrmechanismen angepasst. Die hohe Durchseuchungsrate der menschlichen Bevölkerung mit dem humanen Zytomegalievirus (HCMV) von 40-80 % bestätigt den Erfolg dieser viralen, immunsuppressiven Mechanismen. Das Studium der immunsuppressiven Mechanismen hilft uns, den Ablauf der Immunantwort nach einer CMV-Infektion zu verstehen. Die Interferenz von HCMV und MCMV mit dem MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg wurde in den letzten Jahren genauer untersucht und es sind inzwischen mehrere Genprodukte bekannt, die auf verschiedene Weise mit MHC-Klasse-I-Molekülen interagieren (Alcami und Koszinowski, 2000). MCMV kodiert für die Genprodukte m06/gp48 und m152/gp40, welche eine Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression bewirken (Reusch et al., 1999; Ziegler et al., 1997). Während für m06/gp48 gezeigt werden konnte, dass das virale Protein an MHC-Klasse-I-Moleküle bindet und diese Moleküle zum Abbau in die Lysosomen leitet (Reusch et al., 1999), konnte der genaue Retentionsmechanismus von m152/gp40 bisher nicht geklärt werden. Die Tatsache, dass keine Interaktion von MHC-Klasse-I-Molekülen und m152/gp40 gezeigt werden konnte, lässt vermuten, dass ein transients Interaktions-Mechanismus zur Akkumulation der MHC-Klasse-I-Moleküle führt (Ziegler et al., 1999). Ob dabei ein weiteres, unbekanntes Molekül beteiligt ist, bleibt offen. Möglicherweise induziert m152/gp40 in den MHC-Klasse-I-Molekülen eine Veränderung, die deren Verbleib im ERGIC bewirkt.

Nachdem der für die Retention wichtige Bereich von m152/gp40 auf die luminal Domäne begrenzt werden konnte, stand im Mittelpunkt dieser Arbeit das MHC-Klasse-I-Molekül. Eine Besonderheit von m152/gp40 ist die Fähigkeit, zwischen MHC-Klasse-I-Molekülen der Maus und des Menschen zu unterscheiden (Ziegler et al., 1997). Diese Besonderheit wurde genutzt, um Eigenschaften zu untersuchen, die eine Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m152/gp40 vermitteln und um den Bereich einzugrenzen, der von dem viralen Protein erkannt wird.

#### 4.1 Untersuchungen zur Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m06/gp48 und m152/gp40

##### Nur m152/gp40 kann nicht den Transport humaner MHC-Klasse-I-Moleküle hemmen

Zunächst wurde die Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen durch die viralen Proteine m06/gp48 und m152/gp40 untersucht. Im Rahmen dieser Versuche wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu m152/gp40 das Protein m06/gp48 auch humane MHC-Klasse-I-Moleküle erkennt und deren Oberflächenexpression reduziert. Daten über eine speziesspezifische Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen gibt es zu US2 und US11 von HCMV (Machold et al., 1997), sowie zu m152/gp40 und m06/gp48 von MCMV. Von diesen viralen Genprodukten ist m152/gp40 das einzige, welches humane MHC-Klasse-I-Moleküle nicht zurückhalten kann. Da für US2 und US11 (Story et al., 1999), sowie m06/gp48 (Reusch et al., 1999) eine direkte Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle gezeigt werden konnte, aber für m152/gp40 nicht (Ziegler et al., 1997), ist das möglicherweise ein Hinweis darauf, dass m152/gp40 unter Beteiligung eines weiteren Proteins mit MHC-Klasse-I-Molekülen interagiert. Dieses unbekannte Protein würde sich dadurch auszeichnen, dass es humane MHC-Klasse-I-Moleküle nicht erkennt, so dass die Funktion von m152/gp40 nicht ausgeübt werden kann. Umgekehrt ist denkbar, dass das unbekannte Protein nur humane MHC-Klasse-I-Moleküle erkennt und durch die Bindung einen Bereich des Moleküls verdeckt, der eine Interaktion mit m152/gp40 unmöglich macht. Ein Kandidat für dieses unbekannte Protein wäre BiP, ein Chaperon im ER, welches an humane MHC-Klasse-I-Moleküle bindet (Kahn-Perles et al., 1994, Lindquist et al., 1998), aber nicht an MHC-Klasse-I-Moleküle der Maus (Nössner et al., 1995). Weil in dieser Arbeit die Region von MHC-Klasse-I-Molekülen, welche von m152/gp40 erkannt wird, auf die  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne eingegrenzt wurde, wäre es interessant zu untersuchen, welcher Bereich von humanen MHC-Klasse-I-Molekülen durch BiP erkannt wird. Würde BiP im Bereich der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne binden, so wäre es denkbar, dass es dadurch die humanen MHC-Klasse-I-Moleküle vor der Transporthemmung durch m152/gp40 schützt.

Die transiente Interaktion von m152/gp40 und MHC-Klasse-I-Molekülen schließt aber nicht aus, dass m152/gp40 einen Bereich der MHC-Klasse-I-Moleküle der Maus erkennt, der in humanen Molekülen eine andere Struktur aufweist und daher nicht erkannt wird.

---

### Die Spezies des an HLA-A2 gebundenen $\beta_2$ -Mikroglobulin entscheidet nicht über die Transporthemmung durch m152/gp40

Die Untersuchung der Transporthemmung von humanen MHC-Klasse-I-Molekülen in verschiedenen Zelllinien ergab, dass die Mauszelllinie Ltk<sup>-</sup> eine Ausnahme zeigt. Nur in Ltk<sup>-</sup>-Zellen kann HLA-A2 von m152/gp40 zurückgehalten werden (Abb. 9, Tab. 2). Zunächst wurde die Ursache für dieses auffällige Ergebnis darin vermutet, dass die Spezies des an HLA-A2 gebundenen  $\beta_2$ -Mikroglobulin in den Mauszellen eine Erkennung durch m152/gp40 ermöglicht. Das bis zu diesem Zeitpunkt getestete humane Molekül HLA-B27 war in Mauszellen exprimiert worden, die humanes  $\beta_2$ -Mikroglobulin koexprimieren (Ziegler, 2000). Es konnte jedoch durch die Expression von humanem  $\beta_2$ -Mikroglobulin in den Ltk<sup>-</sup>-Zellen keine Veränderung der Transporthemmung von HLA-A2 gezeigt werden, obwohl die schwere Kette von HLA-A2 das humane  $\beta_2$ -Mikroglobulin gebunden hat (Abb. 10). In weiteren Experimenten zeigte sich, dass auch in der Mauszelllinie B12 keine Transporthemmung der HLA-A2-Moleküle stattfand - unabhängig von der Spezies des exprimierten  $\beta_2$ -Mikroglobulin (Abb. 12 u 13). Der Grund für die Hemmung des Transports von HLA-A2 in Ltk<sup>-</sup>-Zellen mag darin liegen, dass in diesen Zellen eine Veränderung stattfand, die zur Folge hatte, dass Ltk<sup>-</sup>-Zellen im Gegensatz zur ursprünglichen Zelllinie L929 keine funktionelle Thymidinkinase mehr exprimieren (Kit et al., 1963). In den L929-Zellen wird HLA-A2 ebenfalls durch m152/gp40 zurückgehalten (Abb. 11), so dass in der Veränderung der Zelllinie nicht die Ursache liegt, welche die Transporthemmung von HLA-A2 erklären kann. Möglicherweise ist die Expression eines weiteren Chaperons oder Proteins, das am Retentionsmechanismus von m152/gp40 beteiligt ist, in den Ltk<sup>-</sup>-Zellen verändert und der Grund für diese Ausnahme in Ltk<sup>-</sup>-Zellen.

### Die zusätzliche Glykosylierung in der $\alpha_2$ -Domäne der schweren Kette der Maus wird nicht von m152/gp40 erkannt

Ein Unterschied zwischen MHC-Klasse-I-Molekülen der Maus und des Menschen ist die Anzahl der Glykosylierungen der schweren Kette. Die schwere Kette der Maus besitzt zwei, manchmal drei, Glykosylierungsstellen, wohingegen die schwere Kette des Menschen nur eine Glykosylierungsstelle in der  $\alpha_1$ -Domäne aufweist (Maloy et al., 1987). Die transiente Interaktion von MHC-Klasse-I-Molekülen und m152/gp40 findet wahrscheinlich im luminalen Bereich der beiden Proteine statt, da für die Funktion von m152/gp40 die Transmembrandomäne und der zytoplasmatische Bereich des viralen Proteins nicht notwendig sind (Ziegler et al., 2000). Die Untersuchung einer Mutante von HLA-A2, die eine

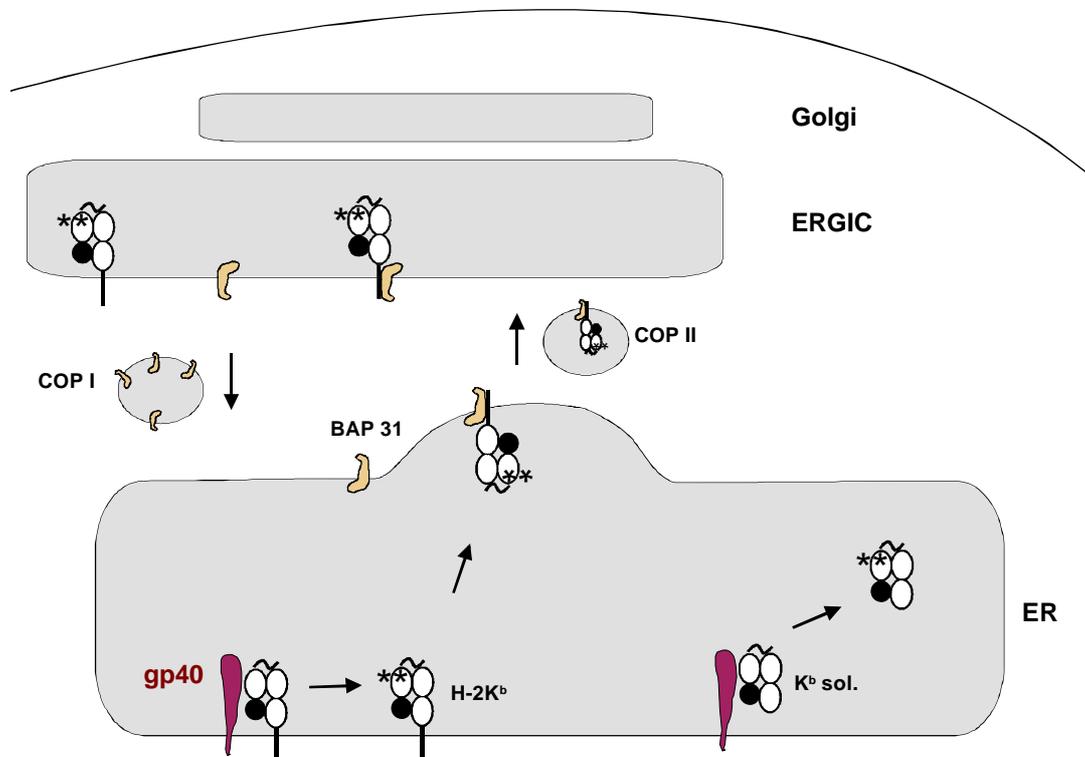
zweite Glykosylierung in der  $\alpha_2$ -Domäne aufweist, ergab, dass diese zusätzliche Glykosylierung keine Transporthemmung durch m152/gp40 vermitteln kann (Abb. 14). Betrachtet man die Struktur der schweren Kette von oben (Abb. 2 b), so liegen die beiden Aminosäuren, an die in der schweren Kette der Maus ein Zuckerrest angehängt wird, auf entgegengesetzten Seiten des Moleküls. Da die Glykosylierung in Position 176 keine Rolle spielt für die Transporthemmung durch m152/gp40, findet möglicherweise die Interaktion von MHC-Klasse-I-Molekülen mit m152/gp40 auf der entgegengesetzten Seite oder in einem Bereich der  $\alpha_3$ -Domäne statt (Abb. 2).

#### Eingrenzung des Erkennungsbereichs von MHC-Klasse-I-Molekülen durch m152/gp40

Um den Bereich der MHC-Klasse-I-Moleküle, der von m152/gp40 erkannt wird, genauer einzugrenzen, wurde zunächst untersucht, ob die luminaire Domäne der schweren Kette von m152/gp40 zurückgehalten werden kann (Abb. 17). Hierzu wurde eine Verkürzungsmutante von H-2K<sup>b</sup>, deren Transmembrandomäne und zytoplasmatische Domäne deletiert waren (K<sup>b</sup> sol.), untersucht. Diese Moleküle wurden nach einer Reifung von ca. 4 Stunden im Kulturüberstand nachgewiesen, verblieben aber zu einem Teil noch als Endo H-sensitive Moleküle in den Zellen. Nach Expression von m152/gp40 wurde K<sup>b</sup> sol. in deutlich geringerer Menge (Faktor 2,5) im Kulturüberstand nachgewiesen: nur noch ca. 40 % der Moleküle gelangten in den Kulturüberstand (Abb. 18). Das Wildtyp-H-2K<sup>b</sup> wurde zwar deutlich besser von m152/gp40 zurückgehalten (Faktor 4,5; Abb. 19) als das K<sup>b</sup> sol., doch kann man vermuten, dass ein lösliches MHC-Klasse-I-Molekül im Lumen des ER schlechter mit m152/gp40 interagiert als ein membranverankertes Protein.

Eine Untersuchung der Lokalisation von zurückgehaltenem K<sup>b</sup> sol. zeigte überraschenderweise, dass diese Moleküle in einem anderen Kompartiment akkumulieren als H-2K<sup>b</sup> (Abb. 20). Während H-2K<sup>b</sup> im ERGIC und im frühen Golgi zu finden ist, erreicht das zurückgehaltene K<sup>b</sup> sol. diese Kompartimente nicht und verbleibt im ER. In der Immunfluoreszenz kolokalisiert K<sup>b</sup> sol. mit Calretikulin und PDI, aber kaum mit Calnexin. Calnexin ist ein Chaperon, das im ER vorkommt und an der Faltung von Proteinen beteiligt ist. Die Bindestelle von Calnexin an MHC-Klasse-I-Moleküle ist bekannt und besteht aus drei Aminosäuren des Peptids, das die  $\alpha_3$ -Domäne mit der Transmembrandomäne verbindet (Margolese et al., 1993, Carreno et al., 1995). Das Konstrukt K<sup>b</sup> sol. enthält ein Stopp-Kodon direkt nach der  $\alpha_3$ -Domäne, so dass Calnexin das verkürzte Molekül nicht binden kann. Dies erklärt, warum Calnexin kaum mit K<sup>b</sup> sol. kolokalisiert (Abb. 20) und es wäre interessant zu testen, ob Calnexin und das Wildtyp-H-2K<sup>b</sup> stärker kolokalisieren. Die fehlende Bindung von

Calnexin mag auch eine Erklärung dafür sein, dass nach der Reifungszeit von 4 Stunden deutlich weniger  $K^b$  sol. Endo H-resistent wird als  $H-2K^b$ -Moleküle.



**Abb. 32 Hypothetische Rolle von BAP31 bei der Akkumulation von  $K^b$  sol. im ER.**

Schematische Darstellung einer Zelle, in der MHC-Klasse-I-Moleküle durch m152/gp40 am Transport zur Zelloberfläche gehindert werden. Die hypothetische Modifikation von  $H-2K^b$  und  $K^b$  sol. durch m152/gp40, welche die Akkumulation bewirkt, ist durch zwei Sternchen dargestellt. Während  $H-2K^b$  nach der Transporthemmung im ERGIC akkumuliert, verbleibt  $K^b$  sol. im ER. Die hypothetische Funktion von BAP31 als Transportmolekül für MHC-Klasse-I-Moleküle beinhaltet die Bindung an den Transmembranbereich von  $H-2K^b$  und dessen Transport über COP II-Vesikel vom ER ins ERGIC. Dort trennt sich BAP31 von  $H-2K^b$  und gelangt über COP I-Vesikel wieder ins ER, während  $H-2K^b$  im ERGIC verbleibt. COP II-Vesikel spielen eine Rolle beim Transport vom ER zur Zelloberfläche, während COP I-Vesikel für den Transport vom Golgi und ERGIC zurück zum ER wichtig sind. COP I und COP II sind Proteine, welche die Bildung dieser Vesikel bewirken. Weil BAP31 nicht an  $K^b$  sol. binden kann, da es keine Transmembranregion enthält, werden diese Moleküle nicht ins ERGIC transportiert und akkumulieren im ER.

Die Ergebnisse aus Abb. 20 werfen die Frage auf, warum das  $H-2K^b$  in Gegenwart von m152/gp40 in einem anderen Kompartiment akkumuliert als  $K^b$  sol. Während  $H-2K^b$  im ERGIC, also zwischen dem ER und dem Golgi, akkumuliert, ist das nicht membranverankerte  $K^b$  sol. im ER zu finden. Da der Unterschied zwischen den beiden MHC-Klasse-I-Molekülen in der fehlenden Transmembranregion und zytoplasmatischen Domäne des  $K^b$  sol. liegt, ist möglicherweise die Interaktion eines weiteren Proteins mit dieser Domäne wichtig für den Transport vom ER in ERGIC. Ein generelles Problem beim Transport von  $K^b$  sol. kann als

Ursache für die Akkumulation im ER ausgeschlossen werden, da die Moleküle die Zelloberfläche erreichen und aus dem Kulturüberstand präzipitiert werden können (Abb. 18). Wir vermuten, dass ein unbekanntes Molekül an H-2K<sup>b</sup> bindet und es ins ERGIC transportiert, wobei es in seiner Funktion durch den Retentionsmechanismus von m152/gp40 nicht behindert wird. Im ERGIC trennt sich das unbekannte „Transportmolekül“ wieder von H-2K<sup>b</sup> und die durch m152/gp40 induzierte Veränderung in H-2K<sup>b</sup> bewirkt nun den Transportblock und H-2K<sup>b</sup> verbleibt im ERGIC. Durch die Deletion der Transmembranregion und der zytoplasmatischen Domäne kann K<sup>b</sup> sol. möglicherweise nicht ins ERGIC gelangen, weil es das „Transportmolekül“ nicht binden kann. So akkumuliert K<sup>b</sup> sol. aufgrund der durch m152/gp40 induzierten Veränderung schon im ER. Diese Hypothese wird durch einige Beobachtungen gestützt. Zum Einen wird seit einiger Zeit diskutiert, dass MHC-Klasse-I-Moleküle nicht nur durch einen unspezifischen Transportmechanismus zur Zelloberfläche gelangen, sondern dass auch ein selektiver Transport durch bestimmte Moleküle eine Rolle spielt (Spiliotis et al., 2000). Es werden als „Transportrezeptoren“ vom ER zum ERGIC die Proteine der p24-Familie, ERGIC-53 und BAP31 diskutiert (Barlowe et al., 1998, Hauri et al., 2000, Spiliotis et al., 2000). Ob Proteine der p24-Familie und ERGIC-53 an MHC-Klasse-I-Moleküle binden, ist bisher nicht bekannt. BAP31 ist ein Transmembranprotein von 28 kDa Größe, das hauptsächlich im ER lokalisiert ist und an Immunglobulin D (IgD), Cellubrevin und an MHC-Klasse-I-Moleküle bindet (Adachi et al., 1996, Annaert et al., 1997, Spiliotis et al., 2000). Es gibt Hinweise, dass BAP31 über seine Transmembrandomäne an die Transmembrandomäne von Cellubrevin bindet (Annaert et al., 1997). BAP31 ist daher ein Kandidat für das unbekannte „Transportmolekül“, welches H-2K<sup>b</sup> aus dem ER in das ERGIC begleitet, während K<sup>b</sup> sol. aufgrund der fehlenden Transmembrandomäne schon im ER zurückgehalten wird (Abb. 32). Das würde auch bedeuten, dass BAP31 in seiner Transportfunktion durch den Retentionsmechanismus von m152/gp40 nicht behindert wird, wenn es H-2K<sup>b</sup> vom ER ins ERGIC transportiert. Um diese Hypothese zu klären, könnte man zunächst die Kopräzipitation von BAP31 mit H-2K<sup>b</sup> und K<sup>b</sup> sol. vergleichen. Stimmt die Hypothese, so würde BAP31 mit H-2K<sup>b</sup> kopräzipitieren, aber nicht mit K<sup>b</sup> sol.

Die Deletion der Transmembranregion und der zytoplasmatischen Domäne von H-2K<sup>b</sup> hat uns gezeigt, dass der Transport dieser Moleküle geändert ist, aber der Verbleib von K<sup>b</sup> sol. in der Zelle durch m152/gp40 nicht verhindert wird. Um den Erkennungsbereich von m152/gp40 einzugrenzen, wurden Chimären der MHC-Klasse-I-Moleküle H-2K<sup>b</sup> und HLA-B7 untersucht. Diese Chimären wurden verwendet, weil humane MHC-Klasse-I-Moleküle im

---

Gegensatz zu Maus-Molekülen nicht von m152/gp40 zurückgehalten werden. Durch einen Austausch der Domänen  $\alpha_1$  bis  $\alpha_3$  war es möglich, die Rolle der einzelnen Domänen bei der Transporthemmung zu beurteilen. Eine Chimäre, deren  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne aus dem H-2K<sup>b</sup>-Molekül stammen, konnte noch gut von m152/gp40 zurückgehalten werden. Eine Beteiligung der  $\alpha_3$ -Domäne bei der m152/gp40-Funktion kann damit ausgeschlossen werden. Die Aussage darüber, inwiefern die  $\alpha_1$ -Domäne an einer Transporthemmung durch m152/gp40 beteiligt ist, ist nicht eindeutig, da chimäre HLA-B7-Moleküle, deren  $\alpha_1$ -Domäne durch die entsprechende Domäne von H-2K<sup>b</sup> ausgetauscht wurde (KBB), kaum noch an die Zelloberfläche transportiert werden. Die zwei durchgeführten Versuche deuten aber darauf hin, dass die kleine Fraktion von KBB-Molekülen, die ohne m152/gp40 Endo H-resistent werden kann, in Gegenwart von 152/gp40 Endo H-sensitiv bleibt (Abb. 21 u. 23). Also kann die  $\alpha_1$ -Domäne alleine von m152/gp40 erkannt werden. Die Beobachtung, dass umgekehrt H-2K<sup>b</sup>-Moleküle, deren  $\alpha_1$ -Domäne durch die von HLA-B7 ersetzt wurde (BKK), nur in geringer Menge zurückgehalten werden, unterstützt die Vermutung, dass die  $\alpha_1$ -Domäne eine wichtige Rolle spielt bei der Erkennung der MHC-Klasse-I-Moleküle durch m152/gp40. Die Beobachtung, dass die Glykosylierung in der  $\alpha_2$ -Domäne keine Rolle bei der Transporthemmung spielt, unterstützt die Rolle der  $\alpha_1$ -Domäne bei der Hemmung des Transports durch m152/gp40. Wahrscheinlich erkennt m152/gp40 einen Bereich von MHC-Klasse-I-Molekülen, der größtenteils die  $\alpha_1$ -Domäne beinhaltet und nur einen geringen Teil der  $\alpha_2$ -Domäne (Abb. 2).

#### **4.2 Die viralen Proteine m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 beeinflussen sich während der Virusinfektion**

Nachdem die Funktion der MCMV-Genprodukte m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 durch Expression des jeweiligen Gens in einer Zelllinie identifiziert wurde, war es von Interesse zu untersuchen, welche Rolle die Genprodukte während der Virusinfektion spielen und wie sie sich gegenseitig beeinflussen. Es war bereits bekannt, dass m04/gp34 einen Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen bildet und zusammen mit diesen an die Zelloberfläche transportiert wird (Abb. 3; Kleijnen et al., 1997). Dort verhindert m04/gp34 die Erkennung der MHC-Klasse-I-Moleküle durch zytotoxische T-Lymphozyten (Kavanagh et al., 2001), wobei es die Transporthemmung von H-2K<sup>b</sup> durch m152/gp40 aufhebt (Kleijnen et al., 1997). Ob sich die Genprodukte m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 gegenseitig beeinflussen oder

möglicherweise in Kombination eine stärkere Hemmung des Transports bewirken, war bisher nicht untersuchbar. Mit Hilfe von MCMV-Deletionsmutanten, welche die Gene *m04*, *m06* und *m152* einzeln und in definierten Kombinationen exprimieren, wurde diese Fragestellung untersucht.

#### Nur m06/gp48 und m152/gp40 reduzieren die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression

Zunächst wurde bestätigt, dass keine weiteren Genprodukte außer *m04/gp34*, *m06/gp48* und *m152/gp40* von MCMV kodiert werden, welche die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression stark beeinflussen (Abb. 24). Auch wenn lediglich die Gene *m06* und *m152* fehlen, ist keine Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression zu beobachten (Abb. 25), so dass ein hemmender Einfluss von *m04/gp34* auf den Transport der MHC-Klasse-I-Moleküle zur Oberfläche ausgeschlossen werden kann. Damit ist erstmals formal gezeigt, dass MCMV nur durch die Genprodukte *m06/gp48* und *m152/gp40* eine Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression bewirkt.

#### M04/gp34 antagonisiert die Funktion von m152/gp40 besonders stark bei H-2K<sup>b</sup>

*M152/gp40* und *m06/gp48* können den Transport aller untersuchten MHC-Klasse-I-Moleküle der Maus hemmen (Ziegler et al., 1997, Reusch et al., 1999). Ein Vergleich der Oberflächenexpression verschiedener Allele nach Infektion mit Wildtyp-MCMV konnte in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass von den getesteten Allelen H-2K<sup>b</sup> und H-2K<sup>k</sup> nur relativ schwach zurückgehalten werden und zu 50-70 % noch auf der Zelloberfläche exprimiert sind (Abb. 26). In einer Immunpräzipitation war von der Arbeitsgruppe Hill gezeigt worden, dass *m04/gp34* die Reifung von H-2K<sup>b</sup> positiv beeinflusst und es wurde spekuliert, dass folglich die Oberflächenexpression in infizierten Zellen erhöht ist (Kleijnen et al., 1997). Hier konnte bestätigt werden, dass die gesteigerte H-2K<sup>b</sup>-Expression durch die Funktion von *m04/gp34* zustande kommt, da die Deletion von *m04* die Akkumulation von H-2K<sup>b</sup> zur Folge hat (Abb. 29). Dabei werden diese H-2K<sup>b</sup>-Moleküle auf der Zelloberfläche durch das virale Protein *m04/gp34* vor der Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten geschützt (Kavanagh et al., 2001). *M04/gp34* antagonisiert bei allen Allelen die Funktion von *m152/gp40* (Abb. 30), aber kaum die von *m06/gp48* (Abb. 31). Im Spezialfall H-2K<sup>b</sup> ist die Behinderung der *m152/gp40*-Funktion die Ursache der gesteigerten Oberflächenexpression, da die Deletion von *m06* einen deutlichen Anstieg der H-2K<sup>b</sup>-Oberflächenexpression zur Folge hat (Abb. 27), nicht aber die Deletion von *m152* (Abb. 28).

### Warum wird H-2K<sup>b</sup> durch MCMV nur schwach zurückgehalten ?

Die Funktion von m04/gp34 als Gegenspieler der Retentionsmechanismen von MCMV ist nur für H-2K<sup>b</sup> bekannt und daher kann spekuliert werden, dass H-2K<sup>b</sup> eine Eigenschaft besitzt, die es von den anderen Allelen unterscheidet und eine bessere Bindung an m04/gp34 bewirkt. Möglicherweise sind einzelne Aminosäuren in H-2K<sup>b</sup> verändert und bewirken eine bessere Bindung an m04/gp34. Weil das Allel H-2K<sup>k</sup>, wie auch H-2K<sup>b</sup>, nach Infektion mit Wildtyp-MCMV relativ schlecht zurückgehalten wird (Abb. 26), ist beiden Allelen möglicherweise eine bestimmte Aminosäuresequenz gemeinsam. Es wäre nun interessant, das Allel H-2K<sup>k</sup> nach einer Infektion mit der MCMV-Mutante  $\Delta m04$  zu untersuchen. Wenn die Deletion von *m04* eine starke Reduktion der Oberflächenexpression von H-2K<sup>k</sup> zur Folge hat, stützt das die Hypothese, dass H-2K<sup>b</sup> und H-2K<sup>k</sup> eine Eigenschaft besitzen, welche die Bindung an m04/gp34 beeinflusst. Der Vergleich der Aminosäuresequenz der hier untersuchten Allele deutet auf zwei Positionen in der  $\alpha_3$ -Domäne, die möglicherweise bei der Bindung an m04/gp34 eine Rolle spielen. An Position 197 ist in H-2K<sup>b</sup> und H-2K<sup>k</sup> eine saure Aminosäure (Asparaginsäure), wohingegen die übrigen Allele eine kleine, nicht polare Aminosäure aufweisen (Valin oder Glycin). Eine zweite Position, die für eine Rolle bei der Bindung an m04/gp34 in Frage kommt, ist die Aminosäure 266. Während H-2K<sup>b</sup> und H-2K<sup>k</sup> eine ungeladene, polare Aminosäure enthalten (Glutamin), ist in den übrigen Allelen eine basische (Lysin) oder saure (Glutaminsäure) Aminosäure zu finden. Beide Positionen sind nach außen orientiert (Abb. 2) und kommen daher als Bindestelle für m04/gp34 in Frage. Entsprechende Mutanten der schweren Kette von H-2K<sup>b</sup> und H-2K<sup>k</sup> könnten darüber Aufschluss geben. Wenn allerdings m04/gp34 an die  $\alpha_3$ -Domäne von MHC-Klasse-I-Molekülen bindet, so kann es nicht direkt die Bindung von m152/gp40 verhindern, welches an der  $\alpha_{1(2)}$ -Domäne bindet (Abb. 21). Die Beteiligung eines weiteren, unbekanntem Faktors bei der Funktion von m152/gp40 kann hier eine Erklärung bieten. Dieser Faktor würde die  $\alpha_3$ -Domäne abdecken oder verändern, so dass m04/gp34 nicht binden kann.

### Vergleich der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression und Untersuchungen mit zytotoxischen T-Lymphozyten

Die Präsentation von Peptiden durch MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zelloberfläche hat zur Folge, dass zytotoxische T-Lymphozyten diese erkennen und die Zelle lysieren. Daher sollte ein Zusammenhang bestehen zwischen der veränderten Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen und einer Änderung in der Lyse durch zytotoxische T-Lymphozyten. Die Deletion von *m152* in MCMV und die Infektion von Zellen mit dieser Mutante führt zu

---

stärkerer Lyse der infizierten Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten (Kavanagh et al., 2001). Hierzu wurden zytotoxische T-Lymphozyten verwendet, die von H-2K<sup>b</sup>, bzw. H-2D<sup>b</sup> präsentierte Peptide erkennen. Vergleicht man die Oberflächenexpression von H-2K<sup>b</sup> und H-2D<sup>b</sup> nach Infektion mit Wildtyp-MCMV und  $\Delta m152$ -MCMV in dieser Arbeit, so verändert die Deletion von *m152* die Expression kaum (Abb. 28). Das bedeutet, dass die reduzierte Oberflächenexpression der Allele hauptsächlich auf die Funktion von m06/gp48 zurückgeführt werden kann. Die geringe Erhöhung von H-2D<sup>b</sup> auf der Zelloberfläche nach Deletion von *m152* (von 10% auf 19%, Abb. 28) kann die von der Arbeitsgruppe Hill beobachtete, verstärkte Lyse der infizierten Zellen durch die zytotoxischen T-Lymphozyten möglicherweise erklären (Kavanagh et al., 2001). Jedoch ist für das Allel H-2K<sup>b</sup> die stärkere Lyse durch zytotoxische T-Lymphozyten nicht erklärbar, da die MHC-Klasse-I-Expression etwas abgenommen hat. Für die Versuche mit den zytotoxischen T-Lymphozyten wurden primäre Mausembryofibroblasten mit MCMV infiziert (Kavanagh et al., 2001), während in der vorliegenden Arbeit immortalisierte Mausfibroblasten verwendet wurden. Die primären Zellen wurden außerdem mit Interferon- $\gamma$  stimuliert, bevor sie infiziert wurden, so dass die MHC-Klasse-I-Expression stark erhöht war. Die additive Stimulation mit Interferon- $\gamma$  kann der Grund dafür sein, dass die Deletion von *m152* in MCMV in den primären Zellen eine größere Wirkung auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression hat als in den immortalisierten Zelllinien, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Ein Widerspruch zwischen den Ergebnissen mit zytotoxischen T-Lymphozyten und der Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen tritt auch bei Versuchen mit der MCMV-Mutante  $\Delta m04$  auf. Das Allel H-2K<sup>b</sup> ist nach Deletion von *m04* stärker zurückgehalten als nach Infektion mit Wildtyp-MCMV (Abb. 29). Bei einer geringeren Expression von H-2K<sup>b</sup> erwarten wir eine Reduktion der Lyse durch zytotoxische T-Lymphozyten. Die Versuche der Arbeitsgruppe Hill aber zeigen eine leichte Erhöhung der Lyse durch zytotoxische T-Lymphozyten nach Deletion des Gens *m04* in MCMV (Kavanagh et al., 2001). Es werden also die H-2K<sup>b</sup>-Moleküle, obwohl sie in geringerer Menge auf die Zelloberfläche gelangen, besser von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt. Das bestätigt, dass das Genprodukt m04/gp34 die H-2K<sup>b</sup>-Moleküle, die zur Oberfläche gelangen, vor zytotoxischen T-Lymphozyten schützt (Kavanagh et al., 2001). Ohne m04/gp34 reichen die wenigen H-2K<sup>b</sup>-Moleküle auf der Zelloberfläche (ca. 17%) aus, um eine Lyse durch zytotoxische T-Lymphozyten hervorzurufen.

### Eine mögliche Rolle von m04/gp34 bei der Inhibition von NK-Zellen

Während für m04/gp34 eine Rolle für den Schutz der Zelle vor der Lyse durch zytotoxische T-Lymphozyten tatsächlich gezeigt wurde, kann man über eine Rolle bei der Inhibition von NK-Zellen bisher nur spekulieren. Lange Zeit wurde vermutet, dass Rezeptoren auf NK-Zellen nur eine inhibitorische Funktion haben, wenn sie mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf anderen Zellen interagieren. Ist eine Zelle mutiert oder durch ein Virus so verändert, dass die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression stark reduziert ist, werden NK-Zellen nicht mehr durch eine Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle inhibiert und zerstören diese Zelle (Kärre et al., 1986). Diese „missing self“-Hypothese wurde, durch die Entdeckung von NK-Zell-Rezeptoren, die aktivierend wirken, verändert und man vermutet heute, dass additive oder synergistische Interaktionen zwischen aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren bei der Aktivierung von NK-Zellen eine Rolle spielen (Lanier, 2000). Weil die Oberflächenexpression von H-2K<sup>b</sup> und H-2K<sup>k</sup> nach der Infektion mit Wildtyp-MCMV wenig reduziert ist (Abb. 26), könnten diese Allele Liganden für inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren darstellen. Es ist denkbar, dass MCMV solche MHC-Klasse-I-Allele zurückhält, die NK-Zellen aktivieren, aber andere Allele zur Zelloberfläche gelangen lässt, welche NK-Zellen hemmen. Betrachtet man die bisher bekannten NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden, so fällt auf, dass einzelne MHC-Klasse-I-Allele oft sowohl inhibitorische als auch aktivierende NK-Zell-Rezeptoren binden können (Anderson et al., 2001). Für H-2K<sup>b</sup> konnte bisher nur eine Bindung an inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren gezeigt werden, was die Rolle von H-2K<sup>b</sup> als Inhibitor für die Zerstörung durch NK-Zellen stützt. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass es noch viele Rezeptoren gibt, deren Liganden nicht identifiziert sind und H-2K<sup>b</sup> möglicherweise auch aktivierende Rezeptoren binden kann. H-2D<sup>b</sup> wiederum bindet an den NK-Zell-Rezeptor Ly49H, welcher NK-Zellen aktiviert. Es wurde gezeigt, dass eine Zellpopulation von NK-Zellen, die Ly49H exprimieren, eine Rolle bei der Bekämpfung von MCMV in Mäusen spielt (Daniels et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass H-2D<sup>b</sup> nach MCMV-Infektion nur in geringen Mengen auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wodurch die Hypothese unterstützt wird, dass MCMV durch eine starke Reduktion der Oberflächenexpression von bestimmten MHC-Klasse-I-Allelen die Aktivierung von NK-Zellen verhindern kann. Diese immunsubversive Strategie von MCMV ist von den NK-Zell-Rezeptoren und den entsprechenden Liganden, die eine infizierte Maus exprimiert, abhängig. Dass eine solche Strategie nicht in allen Mausstämmen für MCMV erfolgreich ist, zeigt die Tatsache, dass manche Mausstämme gegenüber MCMV resistent sind, während andere Stämme durch eine MCMV-Infektion häufiger sterben (Scalzo et al., 1990).

### 4.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Bereiche von H-2K<sup>b</sup> definiert, die eine Transporthemmung durch m152/gp40 vermitteln. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion der Transmembranregion und der zytoplasmatischen Domäne eine Hemmung des Transports zwar nicht verhindert, aber die verkürzten Moleküle in einem anderen Kompartiment zurückhält. Dies gibt einen Hinweis auf einen möglichen, aktiven Transport von MHC-Klasse-I-Molekülen aus dem ER ins ERGIC unter Beteiligung eines Transportproteins. Ob dabei BAP31, wie vermutet, eine Rolle spielt, kann durch eine Ko-Immunpräzipitation mit H-2K<sup>b</sup> und K<sup>b</sup> sol. getestet werden. Weil die Deletion der Transmembranregion und der zytoplasmatischen Domäne die Transporthemmung von H-2K<sup>b</sup> aber nicht verhindert, ist dies wahrscheinlich kein Hinweis auf den Mechanismus der Transporthemmung durch m152/gp40, an dem andere Proteine beteiligt sein müssen. Die bisher einzigartige Eigenschaft von m152/gp40, humane MHC-Klasse-I-Moleküle nicht zurückzuhalten, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Chaperone, die humane MHC-Klasse-I-Moleküle binden und die der Maus nicht, sind dabei von besonderem Interesse und BiP ist ein wahrscheinlicher Kandidat. Die Eingrenzung des Bereichs, der von m152/gp40 erkannt wird, ist hierbei hilfreich, da besonders Chaperone, die in der  $\alpha_1$ -( $\alpha_2$ )-Domäne binden, in Frage kommen.

Die Untersuchung der Rolle von m04/gp34, m06/gp48 und m152/gp40 während der Virusinfektion konnte bestätigen, dass m04/gp34 die Reduktion von H-2K<sup>b</sup> auf der Zelloberfläche spezifisch verhindert und diese Moleküle vor der Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten schützt. Die übrigen, untersuchten Allele sind dagegen von der m04/gp34-Funktion nicht betroffen. Die Hypothese, dass dieser Mechanismus der Inhibition von NK-Zellen dient, kann mit Hilfe von entsprechenden Tests mit NK-Zellen, die inhibitorische Rezeptoren für H-2K<sup>b</sup> exprimieren, untersucht werden. Die Deletion von *m04* sollte dann in Zellen, die mit der MCMV-Mutante infiziert werden, eine stärkere Lyse durch NK-Zellen hervorrufen, während nach einer Infektion mit Wildtyp-MCMV die Zellen durch NK-Zellen kaum lysiert werden. Es ist hierbei sicher wichtig, verschiedene Populationen von NK-Zellen zu untersuchen, da in der Maus nicht nur eine bestimmte NK-Zelllinie zu finden ist.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Zytomegalievirus der Maus (MCMV) zählt zur Familie der Herpesviridae und hat verschiedene Strategien entwickelt, um dem Immunsystem des Wirts zu entgehen. Einer dieser Mechanismen beeinflusst die Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle und wird durch das virale Genprodukt von *m152* vermittelt. Dieses kodiert für ein Glykoprotein von 40 kDa Größe und wird in dieser Arbeit *m152/gp40* genannt. *M152/gp40* blockiert den Transport von MHC-Klasse-I-Molekülen zur Zelloberfläche und erkennt nur Moleküle der Maus, nicht aber des Menschen. Diese speziesspezifische Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen ist bisher nur für *m152/gp40* bekannt und es wurden daher in der vorliegenden Arbeit Eigenschaften von MHC-Klasse-I-Molekülen untersucht, welche diese Speziesspezifität begründen. Es konnte gezeigt werden, dass die Spezies des gebundenen  $\beta_2$ -Mikroglobulins, sowie die Anzahl der Glykosylierungen der schweren Kette keinen Einfluss auf die Erkennung von MHC-Klasse-I-Antigenen durch *m152/gp40* haben. Die Eigenschaft von *m152/gp40*, MHC-Klasse-I-Moleküle des Menschen nicht zurückzuhalten, wurde genutzt, um mit Hilfe chimärer MHC-Klasse-I-Moleküle den Bereich, der von *m152/gp40* erkannt wird, einzugrenzen. Dieser liegt hauptsächlich in der  $\alpha_1$ -Domäne, weil die  $\alpha_2$ -Domäne nur eine schwache Retention bewirkt. Zwar können MHC-Klasse-I-Moleküle, die nur den luminalen Bereich umfassen, von *m152/gp40* zurückgehalten werden, doch akkumulieren diese im ER und nicht im „*ER-Golgi intermediate compartment*“ (ERGIC) / *cis-Golgi*, wie Wildtyp-H-2K<sup>b</sup>. Es wird diskutiert, ob dies ein Hinweis auf einen aktiven Transportmechanismus von MHC-Klasse-I-Molekülen aus dem ER ins ERGIC ist.

Neben der Untersuchung der Funktion von *m152/gp40* aufgrund der Expression des Gens allein, wurde der Einfluss der drei viralen Genprodukte von *m04*, *m06* und *m152* auf die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression mit Hilfe von MCMV-Deletionsmutanten untersucht. Anhand der Analyse der Oberflächenexpression verschiedener MHC-Klasse-I-Allele nach Infektion mit Wildtyp-MCMV oder MCMV-Mutanten konnte gezeigt werden, dass in MCMV nur *m06/gp48* und *m152/gp40* die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen reduzieren. Von den untersuchten Allelen werden H-2K<sup>b</sup> und H-2K<sup>k</sup> nur schwach zurückgehalten. Es wurde gezeigt, dass dies auf die Funktion von *m04/gp34* zurückzuführen ist, wobei *m04/gp34* generell die Funktion von *m152/gp40* und kaum die Funktion von *m06/gp48* behindert. Für weitere Allele konnte gezeigt werden, dass diese unterschiedlich stark von den einzelnen viralen Proteinen zurückgehalten werden. So wird H-2D<sup>d</sup> nur von *m06/gp48* und *m152/gp40* gemeinsam gut zurückgehalten, wohingegen H-2D<sup>b</sup> von *m152/gp40* alleine gut zurückgehalten wird. Eine mögliche Rolle der unterschiedlichen Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Allelen nach MCMV-Infektion für die Inhibition von NK-Zellen wird diskutiert.

---

## 6 LITERATUR

- Adachi, T., Schamel, W.W., Kim, K.M., Watanabe, T., Becker, B., Nielsen, P.J., and Reth, M. (1996). The specificity of association of the IgD molecule with the accessory proteins BAP31/BAP29 lies in the IgD transmembrane sequence. *EMBO J.* *15*, 1534-1541.
- Alcami-A and Koszinowski, U.H. (2000). Viral Mechanisms of immune evasion. *Immunology Today* *21*, 447-455.
- Alford, C.A., Stagno, S., and Pass, R.F. (1979). Natural history of perinatal cytomegaloviral infection. *Ciba. Found. Symp.* 125-147.
- Anderson, S.K., Ortaldo, J.R., and McVicar, D.W. (2001). The ever-expanding Ly49 gene family: repertoire and signaling. *Immunol. Rev.* *181*, 79-89.
- Andersson, M., Paabo, S., Nilsson, T., and Peterson, P.A. (1985). Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. *Cell* *43*, 215-222.
- Annaert, W.G., Becker, B., Kistner, U., Reth, M., and Jahn, R. (1997). Export of cellubrevin from the endoplasmic reticulum is controlled by BAP31. *J. Cell Biol.* *139*, 1397-1410.
- Arnold, B., Burgert, H.G., Hamann, U., Hämmerling, G., Kees, U., and Kvist, S. (1984). Cytolytic T cells recognize the two amino-terminal domains of H-2 K antigens in tandem in influenza A infected cells. *Cell* *38*, 79-87.
- Barlowe, C. (1998). COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* *1404*, 67-76.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1987a). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* *329*, 506-512.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1987b). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* *329*, 512-518.
- Bolger, G., Lapeyre, N., Rheaume, M., Kibler, P., Bousquet, C., Garneau, M., and Cordingley, M. (1999). Acute murine cytomegalovirus infection: a model for determining antiviral activity against CMV induced hepatitis. *Antiviral Res.* *44*, 155-165.
- Boppana, S.B., Pass, R.F., Britt, W.J., Stagno, S., and Alford, C.A. (1992). Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *11*, 93-99.

- 
- Britt, W.J. and Alford, C.A. (1996). Cytomegalovirus. In: Virology (B.N.Fields, D.M.Knipe, and P.M. Howley, eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 2493-2523.
- Brody, A.R. and Craighead, J.E. (1974). Pathogenesis of pulmonary cytomegalovirus infection in immunosuppressed mice. *J. Infect. Dis.* *129*, 677-689.
- 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.
- Campbell, A.E., Slater, J.S., Cavanaugh, V.J., and Stenberg, R.M. (1992). An early event in murine cytomegalovirus replication inhibits presentation of cellular antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* *66*, 3011-3017.
- Carreno, B.M., Schreiber, K.L., McKean, D.J., Stroynowski, I., and Hansen, T.H. (1995). Aglycosylated and phosphatidylinositol-anchored MHC class I molecules are associated with calnexin. Evidence implicating the class I- connecting peptide segment in calnexin association. *J. Immunol.* *154*, 5173-5180.
- Crumpacker, C.S. (1992). Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *Am. J. Med.* *92*, 3S-7S.
- Daniels, K.A., Devora, G., Lai, W.C., O'Donnell, C.L., Bennett, M., and Welsh, R.M. (2001). Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49h. *J. Exp. Med.* *194*, 29-44.
- Del Val, M., Hengel, H., Hacker, 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., Munch, 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. (1991). 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.
- Deng, Y., Gibbs, J., Bacik, I., Porgador, A., Copeman, J., Lehner, P., Ortmann, B., Cresswell, P., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (1998). Assembly of MHC class I molecules with biosynthesized endoplasmic reticulum-targeted peptides is inefficient in insect cells and can be enhanced by protease inhibitors. *J. Immunol.* *161*, 1677-1685.
- Drew, W.L. (1991). Clinical use of ganciclovir for cytomegalovirus infection and the development of drug resistance. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* *4 Suppl 1S42-6*, -6.

- 
- Enright, H., Haake, R., Weisdorf, D., Ramsay, N., McGlave, P., Kersey, J., Thomas, W., McKenzie, D., and Miller, W. (1993). Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation. Risk factors and response to therapy. *Transplantation* 55, 1339-1346.
- Farrell, H., Degli-Esposti, M., Densley, E., Cretney, E., Smyth, M., and Davis-Poynter, N. (2000). Cytomegalovirus MHC class I homologues and natural killer cells: an overview. *Microbes Infect.* 2, 521-532.
- Farrell, H.E., Degli-Esposti, M.A., and Davis-Poynter, N.J. (1999). Cytomegalovirus evasion of natural killer cell responses. *Immunol. Rev.* 168, 187-197.
- Fish, K.N., Soderberg-Naucler, C., Mills, L.K., Stenglein, S., and Nelson, J.A. (1998). Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. *J. Virol.* 72, 5661-5668.
- Gonczol, E., Danczig, E., Boldogh, I., Toth, T., and Vaczi, L. (1985). In vivo model for the acute, latent and reactivated phases of cytomegalovirus infection. *Acta Microbiol. Hung.* 32, 39-47.
- Goud, B., Zahraoui, A., Tavitian, A., and Saraste, J. (1990). Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* 345, 553-556.
- Grande, A.G. and Van-Kaer, L. (2001). Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. *Trends Immunol.* 22, 194-199.
- Hahn, G., Jores, R., and Mocarski, E.S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 3937-3942.
- Hamilton, J.D. and Seaworth, B.J. (1985). Transmission of latent cytomegalovirus in a murine kidney tissue transplantation model. *Transplantation* 39, 290-296.
- Hanshaw, J.B. and Dudgeon, J.A. (1978). Congenital cytomegalovirus. *Major. Probl. Clin. Pediatr.* 1797-152, -152.
- Hauri, H.P., Kappeler, F., Andersson, H., and Appenzeller, C. (2000). ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 4), 587-596.
- Heemels, M.T. and Ploegh, H. (1995). Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 64463-91, -91.
- Hengel, H., Lucin, P., Jonjic, S., Ruppert, T., and Koszinowski, U.H. (1994). Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. *J. Virol.* 68, 289-297.
- Hill, A. and Ploegh, H. (1995). Getting the inside out: the transporter associated with antigen processing (TAP) and the presentation of viral antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 341-343.

- 
- Ho, M. (1990). Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev. Infect. Dis. 12 Suppl. 7S701-10*, -10.
- Holtappels, R., Podlech, J., Grzimek, N.K., Thomas, D., Pahl-Seibert, M.F., and Reddehase, M.J. (2001). Experimental Preemptive Immunotherapy of Murine Cytomegalovirus Disease with CD8 T-Cell Lines Specific for ppM83 and pM84, the Two Homologs of Human Cytomegalovirus Tegument Protein ppUL83 (pp65). *J. Virol. 75*, 6584-6600.
- Holtappels, R., Thomas, D., Podlech, J., Geginat, G., Steffens, H.P., and Reddehase, M.J. (2000a). The putative natural killer decoy early gene m04 (gp34) of murine cytomegalovirus encodes an antigenic peptide recognized by protective antiviral CD8 T cells. *J. Virol. 74*, 1871-1884.
- Holtappels, R., Thomas, D., and Reddehase, M.J. (2000b). Identification of a K(d)-restricted antigenic peptide encoded by murine cytomegalovirus early gene M84. *J. Gen. Virol. 81 Pt 123037-42*, -42.
- Hudson, J.B. (1979). The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections. *Arch. Virol. 62*, 1-29.
- 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.
- Huovila, A.P., Eder, A.M., and Fuller, S.D. (1992). Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J. Cell Biol. 118*, 1305-1320.
- Jones, B. and Janeway, C.A., Jr. (1981). Cooperative interaction of B lymphocytes with antigen-specific helper T lymphocytes is MHC restricted. *Nature 292*, 547-549.
- 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., 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.
- Kahn-Perles, B., Salamero, J., and Jouans, O. (1994). Biogenesis of MHC class I antigens: involvement of multiple chaperone molecules. *Eur. J. Cell Biol. 64*, 176-185.
- Kärre, K. (1995). Express yourself or die: peptides, MHC molecules, and NK cells. *Science 267*, 978-979.
- Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature 319*, 675-678.

- Kavanagh, D.G., Gold, M.C., Wagner, M., Koszinowski, U.H., and Hill, A. (2001). The multiple immune-evasive genes of murine cytomegalovirus are not redundant : m04 and m152 inhibit antigen presentation by Kb and Db in a complementary and co-operative fashion. *J. Exp. Med.* *194*, 967-977.
- Kelsey, D.K., Olsen, G.A., Overall, J.C., and Glasgow, L.A. (1977). Alteration of host defense mechanisms by murine cytomegalovirus infection. *Infect. Immun.* *18*, 754-760.
- Kieny, M.P., Lathe, R., Drillien, R., Spehner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wiktor, T., Koprowski, H., and Lecocq, J.P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* *312*, 163-166.
- Kit, S., Dubbs, D.R., Piekarski, L.J., and Hsu, T.C. (1963). Deletion of Thymidine Kinase Activity from L-Cells Resistant to Bromodeoxyuridine. *Exp. Cell Research* *31*, 297-312.
- 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.
- Kloetzel, P.M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 179-187.
- Koch, S., Koch, N., Robinson, P., and Hämmerling, G. (1983). Comparison of allogeneic and xenogeneic determinants on the H-2Kk molecule. *Transplantation* *36*, 177-180.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* *54*, 631-664.
- Koszinowski, U.H., Keil, G.M., Schwarz, H., Schickedanz, J., and Reddehase, M.J. (1987). A nonstructural polypeptide encoded by immediate-early transcription unit 1 of murine cytomegalovirus is recognized by cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *166*, 289-294.
- Koszinowski, U.H., Keil, G.M., Volkmer, H., Fibi, M.R., Ebeling-Keil, A., and Munch, K. (1986). The 89,000-Mr murine cytomegalovirus immediate-early protein activates gene transcription. *J. Virol.* *58*, 59-66.
- Krmpotic, A., Messerle, M., Crnkovic, M.I., Polic, B., Jonjic, S., 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*, 1285-1296.
- Lanier, L.L. (1997). Natural killer cells: from no receptors to too many. *Immunity* *6*, 371-378.
- Lanier, L.L. (2000). Turning on natural killer cells. *J. Exp. Med.* *191*, 1259-1262.

- 
- Lemke, H., Hämmerling, G.J., and Hämmerling, U. (1979). Fine specificity analysis with monoclonal antibodies of antigens controlled by the major histocompatibility complex and by the Qa/TL region in mice. *Immunol. Rev.* 47, 175-206.
- 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.
- Littler, E., Stuart, A.D., and Chee, M.S. (1992). Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* 358, 160-162.
- 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.
- Maloy, W.L. (1987). Comparison of the primary structure of class I molecules. *Immunol. Res.* 6, 11-29.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.
- Margolese, L., Waneck, G.L., Suzuki, C.K., Degen, E., Flavell, R.A., and Williams, D.B. (1993). Identification of the region on the class I histocompatibility molecule that interacts with the molecular chaperone, p88 (calnexin, IP90). *J. Biol. Chem.* 268, 17959-17966.
- Mayo, D.R., Armstrong, J.A., and Ho, M. (1977). Reactivation of murine cytomegalovirus by cyclophosphamide. *Nature* 267, 721-723.
- Mellert, W., Kleinschmidt, A., Schmidt, J., Festl, H., Emler, S., Roth, W.K., and Erfle, V. (1990). Infection of human fibroblasts and osteoblast-like cells with HIV-1. *AIDS* 4, 527-535.
- Metselaar, H.J., Rothbarth, P.H., Brouwer, R.M., Wenting, G.J., Jeekel, J., and Weimar, W. (1989). Prevention of cytomegalovirus-related death by passive immunization. A double-blind placebo-controlled study in kidney transplant recipients treated for rejection. *Transplantation* 48, 264-266.
- Meyers, J.D. (1984). Cytomegalovirus infection following marrow transplantation: risk, treatment, and prevention. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 20, 101-117.
- Mocarski, E. (1996). Cytomegalovirus and their Replication. In: *Virology* (B.N.Fields, D.M.Knipe, and P.M. Howley, eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 2447-2492.

- 
- Morello, C.S., Cranmer, L.D., and Spector, D.H. (2000). Suppression of murine cytomegalovirus (MCMV) replication with a DNA vaccine encoding MCMV M84 (a homolog of human cytomegalovirus pp65). *J. Virol.* *74*, 3696-3708.
- Moskowitz, L., Hensley, G.T., Chan, J.C., and Adams, K. (1985). Immediate causes of death in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *109*, 735-738.
- Myung, J., Kim, K.B., and Crews, C.M. (2001). The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med. Res. Rev.* *21*, 245-273.
- Nauseef, W.M., McCormick, S.J., and Clark, R.A. (1995). Calreticulin functions as a molecular chaperone in the biosynthesis of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* *270*, 4741-4747.
- Nössner, E. and Parham, P. (1995). Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse major histocompatibility complex class I molecules. *J. Exp. Med.* *181*, 327-337.
- Orci, L., Halban, P., Perrelet, A., Amherdt, M., Ravazzola, M., and Anderson, R.G. (1994). pH-independent and -dependent cleavage of proinsulin in the same secretory vesicle. *J. Cell Biol.* *126*, 1149-1156.
- 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*, -23.
- Plachter, B., Sinzger, C., and Jahn, G. (1996). Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv. Virus Res.* *261*, 46195-261.
- Ploegh, H.L. (1998). Viral strategies of immune evasion. *Science* *280*, 248-253.
- Prosch, S., Docke, W.D., Reinke, P., Volk, H.D., and Kruger, D.H. (1999). Human cytomegalovirus reactivation in bone-marrow-derived granulocyte/monocyte progenitor cells and mature monocytes. *Intervirology* *42*, 308-313.
- Reddehase, M.J. (2000). The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 390-396.
- Reddehase, M.J., Fibi, M.R., Keil, G.M., and Koszinowski, U.H. (1986). Late-phase expression of a murine cytomegalovirus immediate-early antigen recognized by cytolytic T lymphocytes. *J. Virol.* *60*, 1125-1129.
- Reddehase, M.J., Jonjic, S., Weiland, F., Mutter, W., and Koszinowski, U.H. (1988). Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adrenalitis 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., Weiland, F., Münch, K., Jonjic, S., Luske, A., and Koszinowski, U.H. (1985). Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* *55*, 264-273.
- 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.
- 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 [see comments]. *Nature* *386*, 514-517.
- Roizman, B. (1996). Herpesviridae. In: *Virology* (B.N.Fields, D.M.Knipe, and P.M. Howley, eds.) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 2221-2230.
- Samberg, N.L., Scarlett, E.C., and Stauss, H.J. (1989). The alpha 3 domain of major histocompatibility complex class I molecules plays a critical role in cytotoxic T lymphocyte stimulation. *Eur. J. Immunol.* *19*, 2349-2354.
- Saraste, J. and Svensson, K. (1991). Distribution of the intermediate elements operating in ER to Golgi transport. *J. Cell Sci.* *100* ( Pt 3), 415-430.
- Scalzo, A.A., Fitzgerald, N.A., Simmons, A., La Vista, A.B., and Shellam, G.R. (1990). *Cmv-1*, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J. Exp. Med.* *171*, 1469-1483.
- Smith, M.A. and Brennessel, D.J. (1994). Cytomegalovirus. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* *8*, 427-438.
- Smith, R.D. and Wehner, R.W. (1980). Acute cytomegalovirus glomerulonephritis: an experimental model. *Lab. Invest.* *43*, 278-286.
- Soderberg-Naucler, C. and Nelson, J.Y. (1999). Human cytomegalovirus latency and reactivation - a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirology* *42*, 314-321.
- Soderberg, N.C., Fish, K.N., and Nelson, J.A. (1997). Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* *91*, 119-126.
- Spiliotis, E.T., Osorio, M., Zuniga, M.C., and Edidin, M. (2000). Selective export of MHC class I molecules from the ER after their dissociation from TAP. *Immunity* *13*, 841-851.
- Stagno, S., Pass, R.F., Cloud, G., Britt, W.J., Henderson, R.E., Walton, P.D., Veren, D.A., Page, F., and Alford, C.A. (1986). Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* *256*, 1904-1908.

- 
- Stoddart, C.A., Cardin, R.D., Boname, J.M., Manning, W.C., Abenes, G.B., and Mocarski, E.S. (1994). Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* *68*, 6243-6253.
- 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.
- Sullivan, V., Talarico, C.L., Stanat, S.C., Davis, M., Coen, D.M., and Biron, K.K. (1992). A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* *358*, 162-164.
- Tanabe, M., Takiguchi, M., Yamamoto, J., Hayashi, H., and Kano, K. (1989). Analysis of xenoantigenicity of HLA class I molecules by a complete series of human-mouse hybrid genes. *Transplantation* *48*, 135-140.
- 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.
- Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J., and Wilkinson, G.W. (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* *287*, 1031.
- Ulbrecht, M., Martinozzi, S., Grzeschik, M., Hengel, H., Ellwart, J.W., Pla, M., and Weiss, E.H. (2000). Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J. Immunol.* *164*, 5019-5022.
- 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.
- Wada, I., Rindress, D., Cameron, P.H., Ou, W.J., Doherty, J.J., Louvard, D., Bell, A.W., Dignard, D., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J. (1991). SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* *266*, 19599-19610.
- Wagner, M. Entwicklung von Mutageneseverfahren für klonierte Cytomegalovirusgenome (2000). Univ. Regensburg, Dissertation
- Welsh, R.M., O'Donnell, C.L., and Shultz, L.D. (1994). Antiviral activity of NK 1.1+ natural killer cells in C57BL/6 scid mice infected with murine cytomegalovirus. *Nat. Immun.* *13*, 239-245.

- 
- Young, A.C., Zhang, W., Sacchettini, J.C., and Nathenson, S.G. (1994). The three-dimensional structure of H-2Db at 2.4 Å resolution: implications for antigen-determinant selection. *Cell* 76, 39-50.
- Zhang, Q. and Salter, R.D. (1998). Distinct patterns of folding and interactions with calnexin and calreticulin in human class I MHC proteins with altered N-glycosylation. *J. Immunol.* 160, 831-837.
- Ziegler, H. Wirkung des Murinen Cytomegalievirus Glykoproteins gp40/37 auf den Transport von MHC Klasse I Molekülen an die Zelloberfläche (2000). Univ. München, Dissertation
- Ziegler, H., Muranyi, W., Burgert, H.G., Kremmer, E., and Koszinowski, U.H. (2000). The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules. *EMBO J.* 19, 870-881.
- Ziegler, H., Thale, 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.
- Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-702.
- Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C. (1979). MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv. Immunol.* 2751-177, -177.

## 7 ABKÜRZUNGEN

APS	Ammoniumpersulfat
APC	„antigen presenting cell“ (antigenpräsentierende Zelle)
ATCC	American Type Culture Collection
$\beta_2m$	beta-2 Mikroglobulin
CD	„cluster of differentiation antigens“
CPE	„cytopathic effect“ (zytopathischer Effekt)
CTL	„cytotoxic T lymphocyte“ (zytotoxische T-Lymphozyten)
DAMP	3-amino-N-methyl dipropylamine
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
FACS	„fluorescence activated cell sorter“ (Durchflusszytometer)
FCS	„fetal calf serum“ (Fötale Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisocyanat
gp	Glykoprotein
H-2	Histokompatibilitätskomplex 2 der Maus
hc	„heavy chain“ (schwere Kette der MHC-Klasse-I-Moleküle)
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSV	Herpes Simplex Virus
IgG	Immunglobulin G
$K^b$ sol.	verkürztes H-2 $K^b$ -Molekül, das nur den luminalen Bereich der schweren Kette kodiert
mAK	monoklonaler Antikörper
MCMV	Zytomegalievirus der Maus
MHC	„major histocompatibility complex“ (Haupthistokompatibilitätskomplex)
m.o.i.	„multiplicity of infection“
NCS	„newborn calf serum“ (Neugeborenen Kälberserum)
n.i.	nicht infiziert
NK	Natürliche Killer
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“ (Offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
PDI	Proteindisulfidisomerase
PFU	„plaque forming unit“
pp	Phosphoprotein
RNAse	Ribonuklease
rpm	„rotations per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAP	„transporter associated with antigen processing“
TCR	„T cell receptor“ (T-Zellrezeptor)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U	„units“ (Enzymatische Einheiten)
VV	Vaccinia-Virus
wt	wildtyp

## 8 PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit sind oder werden veröffentlicht :

Hengel, H., Reusch, U., Gutermann, A., Ziegler, H., Jonjic, S., Lucin, P., Koszinowski, U.H. (1999). Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse. *Immunological Reviews* 168, 167-76.

Gutermann, A., Bubeck, A., Wagner, M., Reusch, U., Menard, C., Koszinowski, U.H. (2001). Strategies for the identification and analysis of viral immune evasion genes – Cytomegalovirus as example. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. In Druck.

Wagner, M., Gutermann, A., Reddehase, M., Koszinowski, U.H. During MCMV infection m06 is the dominant MHC class I interfering gene and m04 antagonizes both m06 and m152 MHC class I retention. Manuskript in Vorbereitung.

Weitere Publikation :

Sester, M., Feuerbach, D., Frank, R., Preckel, T., Gutermann, A., Burgert, H.G. (2000). The amyloid precursor-like protein 2 associates with the major histocompatibility complex class I molecule K(d). *J. Biol. Chem.* 275(5), 3645-54.

## 9 DANKSAGUNG

Auch diese Arbeit konnte nur durch die Hilfe und Unterstützung vieler Menschen entstehen, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Ein herzlicher Dank gilt Prof. U.H. Koszinowski für die fortwährende Unterstützung und Betreuung meiner Doktorarbeit am Max-von-Pettenkofer Institut für Virologie am Genzentrum.

Frau Prof. E.H. Weiß danke ich für die Betreuung der Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie und hilfreiche Diskussionen.

Herrn Prof. Dirk Eick danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ein großer Dank geht an Herrn Dr. habil. H.-G. Burgert, der mir stets mit Rat und Antikörpern zur Seite stand.

Markus Wagner und Sabine Linke danke ich für die Bereitstellung der MCMV-Mutanten und die tatkräftige Unterstützung bei den FACS-Analysen. Mark Windheim danke ich für Hilfestellungen im Labor, sowie interessante und fruchtbare Diskussionen. Für die Lösung vieler meiner Computerprobleme bedanke ich mich bei Christian Spielhauer. Prof. Stipan Jonjic und Astrid Krmpotic danke ich für die Herstellung von Peptid-Antisera und Ascites. Der Arbeitsgruppe Koszinowski, meinen Kollegen im Labor und auf dem Stockwerk danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen Hilfestellungen, besonders Christine Atzler, Anja Bubeck, Brigitte Rupp, Jörg Schlender und Walter Muranyi. Ein herzlicher Dank an die Unterstützung aus dem Sekretariat: Frau Rinck und besonders Frau Adler! Alexander Heyl, Franziska Wopfner und meiner Familie danke ich sehr für die Korrektur des Manuskripts.

Herrn Prof. van Kaick, Dr. Michael Brandt und Dr. Hans Auer möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen für ein offenes Ohr gegenüber den Sorgen einer Doktorandin.

Einen lieben Dank an meine Freunde während dieser langen Zeit: Carmen Burgmeier, Tina Grabusic, Elke Kossack, Eni Soldatits, Darja Schmidt, Gerd Waidelich.

Bei meiner gesamten Familie und besonders meinen Eltern möchte ich mich mit den Worten von Sophie Scholl aus einem ihrer Briefe bedanken : „Aber geborgen fühle ich mich erst dort, wo ich merke, dass eine selbstlose Liebe da ist. Und die ist doch verhältnismäßig selten.“

---

## 10 LEBENS LAUF

Name : Anja Erika Gutermann

Geburtsdatum : 6. Okt. 1970

Geburtsort : Unterseen / Schweiz

### Schul Ausbildung :

1976 - 1977 Grunds chule in Dossenheim

1977 - 1980 Grunds chule in Schriesheim

1980 - 1989 Abitur am Elisabeth-von-Thadden Gymnasium, Heidelberg

### Studium :

1989 - 1991: Vordiplom in Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

1991 - 1992 : Studium der Biologie, "State University of New York at Buffalo", USA

1992 - 1996 : Diplom in Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

1995 - 1996 : Diplomarbeit bei Roche (Boehringer Mannheim GmbH), Penzberg

Juli-Oktober 1996 : Wissenschaftliche Angestellte an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Physiologisches Institut

Okt. 1996 - heute : Doktorarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Max-von-Pettenkofer Institut für Virologie bei Prof. U.H. Koszinowski

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

München, den