



# **Analyse des Inhibitionsmechanismus des varicelloviralen Faktors UL49.5**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Sandra Loch  
aus Hofheim am Taunus

Frankfurt am Main, 2009

D30

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

1. Gutachter: Prof. Dr. Robert Tampé

2. Gutachter: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

Datum der Disputation: 13.08.2009

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

**Loch S**, Klauschies F, Schoelz C, Verweij M, Wiertz EJHJ, Koch J, Tampé R (2008) Signaling of a varicelloviral factor across the endoplasmic reticulum membrane induces destruction of the peptide-loading complex and immune evasion. *J Biol Chem* **283**: 13428-13436 (IF 5.581)

Koppers-Lalic D, Verweij M, Lipińska A, Wang Y, Quinten E, Reits EA, Koch J, **Loch S**, Rezende MM, Daus F, Bieńkowska-Szewczyk K, Osterrieder N, Mettenleiter TC, Heemskerk MHM, Tampé R, Neefjes JJ, Chowdhury SI, Rensing ME, Rijsewijk FA, Wiertz EJ (2008) Varicellovirus UL49.5-Proteins differentially affect the function of the transporter associated with antigen processing, TAP. *PLoS Pathog* **4**: e1000080 (IF 3.336)

Verweij M, Koppers-Lalic D, **Loch S**, Klauschies F, de la Salle H, Lehner PJ, Mulder A, Knittler MR, Tampé R, Koch J, Rensing ME, Wiertz EJHJ (2008) Structural and functional dissection of the interaction of the varicellovirus-encoded immune evasion protein UL49.5 with TAP. *J Immunol* **181**: 4894-4907 (IF 6.068)

**Loch S** and Tampé R (2005) Viral evasion of the MHC class I Antigenprocessing machinery. *Pflügers Arch* **451**: 409-417 (IF 3.842)

**Loch S** and Tampé R (2005) Immunevasine – Tricks, wie Viren dem Immunsystem entkommen. *BIOspektrum* **2**: 157-161

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>3</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
1.1 Das Immunsystem.....	5
1.2 Antigenprozessierung und -präsentation.....	7
1.3 Der Peptidbeladungskomplex (PLC) .....	10
1.4 Der ABC-Transporter TAP.....	12
1.5 Degradation zellulärer Proteine.....	14
1.6 Interaktion von Viren mit dem Immunsystem.....	19
1.7 Motivation und Zielsetzung.....	34
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>36</b>
2.1 Verwendete Materialien.....	36
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	48
2.3 Mikrobiologische Methoden.....	61
2.4 Zellbiologische Methoden.....	64
2.5 Spezielle zellbiologische Methoden.....	69
2.6 Proteinbiochemische Methoden.....	74
2.7 Spezielle proteinbiochemische Methoden.....	76
2.8 <i>In vitro</i> Translation und Degradation .....	78
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>82</b>
3.1 Interaktionsstudien von UL49.5 mit dem TAP-Komplex in Insektenzellen .....	82
3.2 Interaktion von UL49.5 mit TAP in Säugerzellen.....	90
3.3 Funktionalitätsuntersuchungen von UL49.5 in Säugerzellen .....	93
3.4 Vergleich homologer varicelloviraler UL49.5-Proteine.....	107
3.5 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit UL49.5.....	113
3.6 Zellfreie Expression von UL49.5.....	116
3.7 <i>In vitro</i> Translation und proteasomale Degradation von UL49.5 .....	119
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>129</b>
4.1 Interaktion von UL49.5 mit dem PLC.....	129
4.2 Charakterisierung der C-terminalen Domäne von UL49.5.....	131
4.3 Einfluss der N-terminalen Domäne auf die TAP-Degradation .....	132
4.4 Funktionsweise von UL49.5 .....	133
4.5 Vergleich mit der US2-vermittelten MHC I-Degradation .....	135

4.6	Funktionen homologer UL49.5-Proteine.....	137
4.7	UL49.5-vermittelten TAP-Degradation <i>in vitro</i> .....	139
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>141</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>152</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>154</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>156</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>157</b>
9.1	Klassifizierung von Herpesviren .....	157
9.2	Plasmidkarten.....	160
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>163</b>

## Zusammenfassung

Innerhalb des adaptiven Immunsystems spielt der *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Klasse I-Weg der Antigenpräsentation eine essenzielle Rolle bei der Erkennung und Zerstörung Virus-infizierter Zellen. Ein grundlegender Schritt innerhalb dieses Prozesses ist die Translokation endogener Peptide durch den *transporter associated with antigen processing* (TAP) in das ER-Lumen. Der TAP-Transporter ist zusammen mit verschiedenen Chaperonen und weiteren Faktoren in einem Peptidbeladungskomplex (PLC) assoziiert. Insbesondere Herpesviren, die durch eine lebenslange Persistenz im Wirt und wiederkehrende Reaktivierung unter Stresssituationen gekennzeichnet sind, interferieren direkt mit dem PLC und dem TAP-Transporter. Das varicellovirale Typ-I-Membranprotein UL49.5 inhibiert den TAP-Komplex, wobei das Protein des Rinderherpesvirus (Bovines Herpesvirus 1, BHV-1) zusätzlich die proteasomale Degradation verschiedener Komponenten des PLCs einleitet. Dieser Mechanismus wird durch die C-terminale Domäne des UL49.5-Proteins vermittelt und ist von keinem anderen Virusprotein bekannt. Welche Aminosäuren des Virusproteins jedoch für diese Inhibition und Degradation essenziell sind, wurde bisher nicht aufgeklärt. Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die Funktionsweise des BHV-1 UL49.5-Proteins zu verstehen und insbesondere zu analysieren, welche Bereiche des Proteins für die proteasomale Degradation des TAP-Komplexes verantwortlich sind.

Das UL49.5-Protein wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgreich in Insektenzellen und in HeLa-Zellen exprimiert. Mittels Coimmunpräzipitation (Co-IP) wurde daraufhin die Bindung verschiedener UL49.5-Varianten an den TAP-Komplex analysiert. Unterstützt wurden diese Daten durch einen *in vivo* Interaktionsscreen (BiFC) und *in vitro* translatiertes UL49.5. Hierbei stellte sich heraus, dass das UL49.5-Protein in Abwesenheit sämtlicher Komponenten des Immunsystems an beide Untereinheiten des TAP-Transporters bindet. Die Bindung erfolgt sowohl an vollständige TAP-Untereinheiten als auch an den sogenannten coreTAP-Komplex, der nur die inneren sechs Transmembranhelices besitzt. Weiterhin wurden systematisch verkürzte UL49.5-Varianten generiert, um wichtige Reste für TAP-Inhibition und proteasomale Degradation zu identifizieren. Interessanterweise sind weder die N-terminale noch die C-terminale Domäne von UL49.5 für die Bindung an

den TAP-Komplex zwingend notwendig. Die Bindung an den TAP-Transporter wird demnach über die Transmembrandomäne von UL49.5 vermittelt. Mit Hilfe von Peptidtransport-Analysen wurde die inhibitorische Aktivität verschiedener UL49.5-Mutanten eingehend untersucht. Zusätzlich wurde eine Untersuchung der MHC I-Oberflächenexpression in transient transfizierten HeLa-Zellen etabliert. In diesen Zellen wurde nach Sortierung eine drastisch reduzierte TAP-Konzentration nachgewiesen, die auf proteasomale Degradation des TAP-Komplexes zurückzuführen war. Die Untersuchung von C-terminal verkürzten UL49.5-Mutanten zeigte, dass die letzten zwei C-terminalen Aminosäuren essenziell für die Induktion der TAP-Degradation sind. Die C-terminale Domäne von UL49.5 konnte jedoch, nach Übertragung auf andere Proteine, keine proteasomale Degradation des TAP-Komplexes einleiten. Demnach ist ein weiterer Bereich des Proteins für diesen Prozess zwingend notwendig. Erstaunlicherweise waren auch N-terminal verkürzte UL49.5-Proteine deutlich in ihrer inhibitorischen Funktion beeinträchtigt. Bereits nach der Deletion von 10 N-terminalen Aminosäuren war das Protein nicht mehr in der Lage, eine proteasomale Degradation des TAP-Komplexes einzuleiten. Demnach spielt auch die ER-luminale Domäne von UL49.5 eine wichtige Rolle bei der UL49.5-induzierten TAP-Degradation.

Somit wurde ein bisher noch nicht beschriebener neuartiger Inhibitionsmechanismus für das BHV-1 UL49.5-Protein entdeckt. Nach Bindung von UL49.5 über die Transmembrandomäne an beide Untereinheiten des TAP-Transporters scheint die ER-luminale Domäne von UL49.5 ein Signal über die ER-Membran an die zytoplasmatische Domäne zu übertragen, die dann die proteasomale Degradation des TAP-Komplexes einleitet. Es konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit erstmals gezeigt werden, dass additive Effekte eines sehr kleinen Virusproteins auf zwei unterschiedlichen Seiten der ER-Membran zu einer proteasomalen Degradation eines sehr großen Membran-Komplexes führen.

## Summary

As an important strategy within the adaptive immune system, the major histocompatibility complex (MHC) class I-dependent pathway of antigen presentation can trigger the elimination of affected cells by cytotoxic T lymphocytes (CTL) upon presentation of antigenic peptides at the cell surface. A critical step is the translocation of peptides derived from proteasomal degradation into the ER-Lumen by the heterodimeric transporter associated with antigen processing (TAP). This process requires a macromolecular peptide-loading complex (PLC) comprising TAP, MHC I molecules and various chaperones and auxiliary factors. Especially herpes viruses, leading to lifelong persistence and repeated reactivation in the host, encode proteins which interfere at different steps with the MHC class I pathway, especially with the PLC. The varicellovirus protein UL49.5 employs a unique inhibition mechanism to suppress MHC class I expression on the cell surface, unknown from any other viral protein. It arrests the PLC in a functionally incompetent conformation and the protein from the bovine herpesvirus-1 (BHV-1) additionally targets components of the TAP-complex and the UL49.5 protein to proteasomal degradation, mediated by the C-terminal domain of the viral protein. The amino acid residues of UL49.5 which are responsible for TAP inhibition and degradation could not be deciphered yet. Therefore, the goal of this PhD thesis was to understand the mode of action of the BHV-1 UL49.5 protein and especially to analyze which regions of the protein are responsible for induction of the proteasomal degradation of the TAP-complex.

The UL49.5 protein could be expressed successfully in Sf9 insect and HeLa cells. Using coimmunoprecipitation studies, the binding of several UL49.5 variants to the PLC was analyzed in detail. These data were supported by an *in vivo* interaction screen (BiFC) and *in vitro* in rabbit reticulocyte lysate (RRL) translated UL49.5. The results of these studies showed that UL49.5 interacts in the absence of all components of the human immune system with both subunits of the TAP complex. Interestingly, UL49.5 binds both to the wildtype and to the coreTAP complex, consisting of the inner 6+6 transmembrane helices and the nucleotide-binding domains. Additionally, systematically truncated UL49.5 variants were generated to identify residues important for TAP inhibition and proteasomal degradation. Strikingly,

neither the N-terminal nor the C-terminal domain of UL49.5 is required for binding to the TAP-complex, indicating that the transmembrane helix of UL49.5 mediates binding to TAP. Binding of the virus protein to the PLC seems to be mediated by the transmembrane domain of UL49.5. Using peptide transport assays, the inhibitory activity of UL49.5 mutants was characterized in detail. An assay using the fluorescence activated cell sorter (FACS) to rapidly analyze the effect of different UL49.5 variants on MHC class I expression on the cell surface was successfully established. In HeLa cells transiently transfected with UL49.5, a downregulation of MHC class I molecules was detected. After FACS sorting of these cells, a drastic reduction of the TAP-level was measured, which was dependent on proteasomal activity. Remarkably, after removal of two C-terminal amino acids of UL49.5, the protein could not induce proteasomal degradation of the TAP complex any more. The isolated C-terminal domain of UL49.5 was not able to induce proteasomal degradation any more, when it was transferred on other proteins. But also after deletion of ten N-terminal amino acids, the UL49.5 protein was drastically impaired in its inhibitory function. Therefore, the ER-luminal domain plays an important role within the process of TAP-inhibition and degradation.

Taken together, a new immune evasion mechanism was identified for the BHV-1 UL49.5 protein. After binding of UL49.5 via its transmembrane domain to both subunits of the TAP-complex, the last C-terminal residues of UL49.5 induce the proteasomal degradation of the TAP-transporter. As a further important discovery, this ER-associated degradation signal strictly requires an upstream regulatory element in the ER-Luminal domain of UL49.5, hence a signalling across the ER membrane. Within this new inhibitory mechanism, it was shown for the first time that additive elements of a small viral factor at two opposing sites of the ER membrane are essential for targeted degradation of a multi-subunit membrane complex.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Organismus ist ständig äußeren Faktoren und Krankheitserregern wie zum Beispiel Bakterien, Viren, Pilzen und anderen Parasiten ausgesetzt, die lebensbedrohliche Krankheiten auslösen können. Zusätzlich können auch körpereigene entartete Zellen den Organismus bedrohen. Aus diesem Grund brauchen alle Lebewesen eine Schutzfunktion gegen diese äußeren Einflüsse. Die erste Verteidigungslinie der unspezifischen Erregerabwehr bilden die Haut und die Schleimhäute, die für fremde Organismen normalerweise nicht einfach zu durchdringen sind. Sie bilden ein physikalisches Hindernis und der dort herrschende pH-Wert, der Luft- oder Flüssigkeitsstrom, sowie die antibakteriellen Peptide machen es den Pathogenen schwer, eine Kolonisierung auf der Oberfläche zu etablieren. Die zweite Verteidigungslinie der unspezifischen Abwehr beruht vor allem auf phagozytierenden weißen Blutzellen: Neutrophile und Makrophagen in Blut und Lymphe. Diese Zellen erkennen und unterscheiden die Mikroorganismen von körpereigenen Zellen durch keimbahnkodierte Rezeptoren (*Toll-like* Rezeptoren, Mannoserezeptoren, Glukanrezeptoren sowie Scavenger-Rezeptor), die sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) erkennen. Diese sind konservierte Strukturen von Mikroorganismen, die für den Lebenszyklus essenziell sind, so dass sie nicht ohne Schaden für den Erreger mutiert werden können. Das Komplementsystem ist ein System von Plasmaproteinen, deren Hauptaufgabe darin besteht, die Oberfläche von Krankheitserregern zu bedecken, die sonst nicht von phagozytierende Zellen erkannt werden würden (Opsonierung), sowie weitere Phagozyten zum Infektionsherd zu leiten. Eine weitere wichtige Funktion ist die direkte Zerstörung von Bakterien durch das Einbringen von Poren in die Zellmembranen (Membran-Attacke-Komplex). Das Komplementsystem löst außerdem eine Reihe von Entzündungsreaktionen aus, die den Kampf gegen die Infektion unterstützen. Es wird angenommen, dass ca. 90% aller Infektionen durch das angeborene Immunsystem erkannt und erfolgreich bekämpft werden.

Zusätzlich haben Vertebraten im Laufe ihrer Evolution ein komplexes Abwehrsystem entwickelt, das sogenannte adaptive Immunsystem. Das adaptive Immunsystem ist

in der Lage, Keime, Toxine oder Gewebetransplantate als Fremd zu erkennen und somit eine auf jeden Eindringling spezifisch zugeschnittene Immunantwort aufzubauen, um ihn zu inaktivieren oder zu zerstören. Zellen der adaptiven Immunabwehr reagieren auf Fremdsubstanzen, die eine Immunantwort auslösen (Antigene), indem spezialisierte Lymphozyten aktiviert und spezifische Antikörper gebildet werden. Das adaptive Immunsystem kann in zwei Teilbereiche unterteilt werden. Die humorale Immunität wird durch zirkulierende Antikörper in Blut und Lymphe vermittelt und wehrt somit freie Viren, Bakterien und sonstige zelluläre Antigene (Toxine) ab. Die zellvermittelte Immunität geht gegen zelluläre Erreger vor, indem infizierte Zellen zerstört werden. Zusätzlich reagiert sie gegen transplantiertes Gewebe und gegen Tumorzellen. B-Lymphozyten (B-Zellen) reifen im Knochenmark und sind für die humorale Immunität zuständig. T-Lymphozyten (T-Zellen) reifen im Thymus und wirken hauptsächlich bei der zellvermittelten Immunität. Die Spezifität und Vielfalt der Immunantwort beruht zellulär auf der klonalen Selektion und Expansion von Lymphozyten. Dabei bindet ein Lymphozyt ein Antigen an seinen spezifischen Antigen-Rezeptor, wird somit aktiviert, und zu einem Klon von Effektorzellen vermehrt. Bei dieser primären Immunantwort bilden sich auch langlebige Gedächtniszellen, die für die verstärkte Reaktion (sekundäre Immunantwort) bei erneuter Begegnung mit dem Antigen verantwortlich sind. Bei der humoralen Immunantwort erfolgt die Bildung von Plasmazellen in Zusammenarbeit mit Makrophagen, die als antigenpräsentierende Zellen (APC) wirken, sowie mit T-Helferzellen. Die APCs präsentieren auf ihrer Oberfläche einen Komplex aus einem Antigenfragment und einem Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) Klasse II-Molekül (im humanen System auch HLA II genannt). Die T-Helferzelle ( $CD4^+$   $T_H2$ -Zelle) wird durch APCs stimuliert. Die Wechselwirkung wird durch CD4, einen  $T_H$ -Corezeptor verstärkt. Zusätzlich aktiviert die T-Helferzelle mittels verschiedener Zytokine (wie Interleukin 4) B-Zellen. Sie differenzieren sich anschließend und bilden Klone von B-Gedächtniszellen und Plasmazellen. Diese setzen schließlich große Mengen spezifischer Antikörper frei, die an die Antigene der Erreger binden und diese so für Phagozyten bzw. Killerzellen opsonieren. Gleichzeitig erfolgt eine Stimulation der so aktivierten T-Zelle durch Interleukin 2, wodurch die Proliferation der T-Zellen eingeleitet wird. Dies führt zur Bildung von T-Helferzellen ( $T_H$ -Zellen), die antigenpräsentierende Makrophagen mittels Interferonen bei der Zerstörung von Pathogenen unterstützen. Bei der

zellvermittelten Immunität erkennen T-Zellen, die den CD8-Rezeptor exprimieren, spezifisch MHC Klasse I-Moleküle, die endogene Peptide auf der Zelloberfläche präsentieren. Kommt es zu einer viralen Infektion oder malignen Veränderungen in der Zelle, verändert sich die Zusammensetzung der präsentierten antigenen Peptide. Solche Änderungen werden von CD8-assoziierten T-Zellrezeptoren (TCR) auf den T<sub>H1</sub>-Lymphozyten erkannt. Daraufhin setzen derartig aktivierte zytotoxische T-Zellen (CTL) Enzyme und Proteasen (Perforine) frei, die die Zellwand der betreffenden Zelle lysieren. (Alberts et al, 2004; Campbell, 1997; Janeway & Travers, 1997).

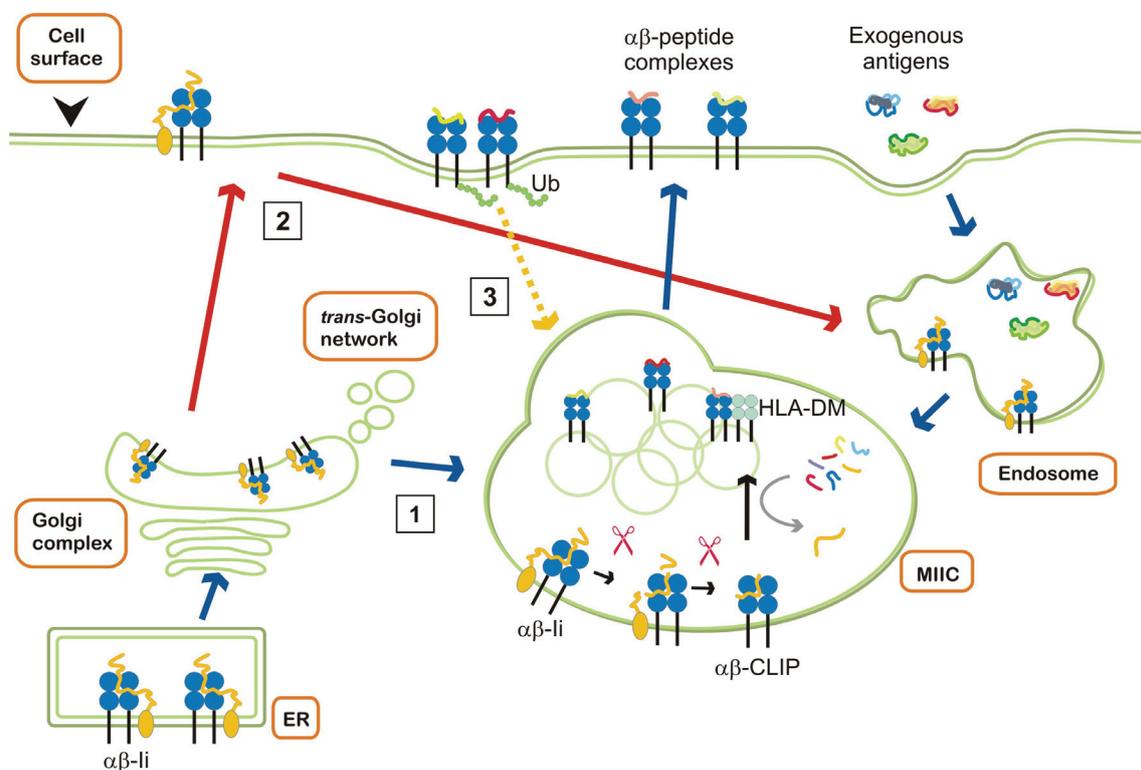
## **1.2 Antigenprozessierung und -präsentation**

Abhängig von der Herkunft der auf der Zelloberfläche präsentierten Peptide unterscheidet man zwischen zwei Wegen der Antigenprozessierung und -präsentation, die beide im Folgenden detailliert vorgestellt werden.

### **1.2.1 MHC II-Weg der Antigenprozessierung (exogene Peptide)**

Der MHC II-Weg beschreibt die Prozessierung exogener Antigene, die von APCs aufgenommen werden, sowie deren Präsentation mittels MHC Klasse II-Molekülen für CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Die aufgenommenen Antigene werden in Phagosomen (Zell-assoziierte Antigene) oder Endosomen (lösliche Antigene) internalisiert und in den endosomalen Weg eingeschleust. Im Laufe dieses Weges werden die Antigene entfaltet, reduziert und durch Proteasen gespalten, wodurch Peptide generiert werden, die auf MHC II-Moleküle geladen werden (Villadangos & Ploegh, 2000; Watts, 2001). Bei Menschen sind drei Typen von MHC II-Molekülen bekannt: HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ. MHC II-Moleküle sind membranständige Heterodimere aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, wobei die  $\beta$ 1-Domäne eine Bindungsstelle für CD4 besitzt und zusammen mit der  $\alpha$ 1-Domäne die Peptidbindungsfurche ausbildet. Diese Furche ist an beiden Enden offen, so dass Peptide bis zu einer Länge von 13-25 Aminosäuren gebunden werden können (Chicz et al, 1992). Die Heterodimere werden *de novo* im ER synthetisiert und zusammengesetzt und anschließend über den Golgi-Apparat zu den Endosomen transportiert. Während des Transports liegen die MHC II-Moleküle in einem Komplex mit der sogenannten *invariant chain* (Ii) vor. Eine spezielle Region der *invariant chain*, die auch als CLIP (*class II associated invariant chain peptide*) bezeichnet wird, liegt in der Peptidbindungsfurche und

verhindert somit die Bindung endogener Peptide. Erst durch das Erreichen der Endosomen wird die *invariant chain* durch die pH-Änderung und durch spezifische hydrolytische Proteasen (Cathepsine S und L) abgespalten. Die Proteasen degradieren das Protein dabei schrittweise, so dass das CLIP Fragment in der Peptidbindungsfurche verbleibt. Der Austausch von CLIP gegen internalisierte, exogene Peptide wird durch das Chaperon HLA-DM vermittelt. Dieses stabilisiert die unbeladenen MHC II-Moleküle, verhindert deren Aggregation und fördert den Austausch von internalisierten, exogenen Peptiden bis ein hochaffin-bindendes Protein gebunden hat. Daraufhin gelangen beladene MHC II-Moleküle an die Zelloberfläche, wo sie die Peptide den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten präsentieren (Trombetta & Mellman, 2005). Der MHC II-Weg ist in Abbildung 1 dargestellt.



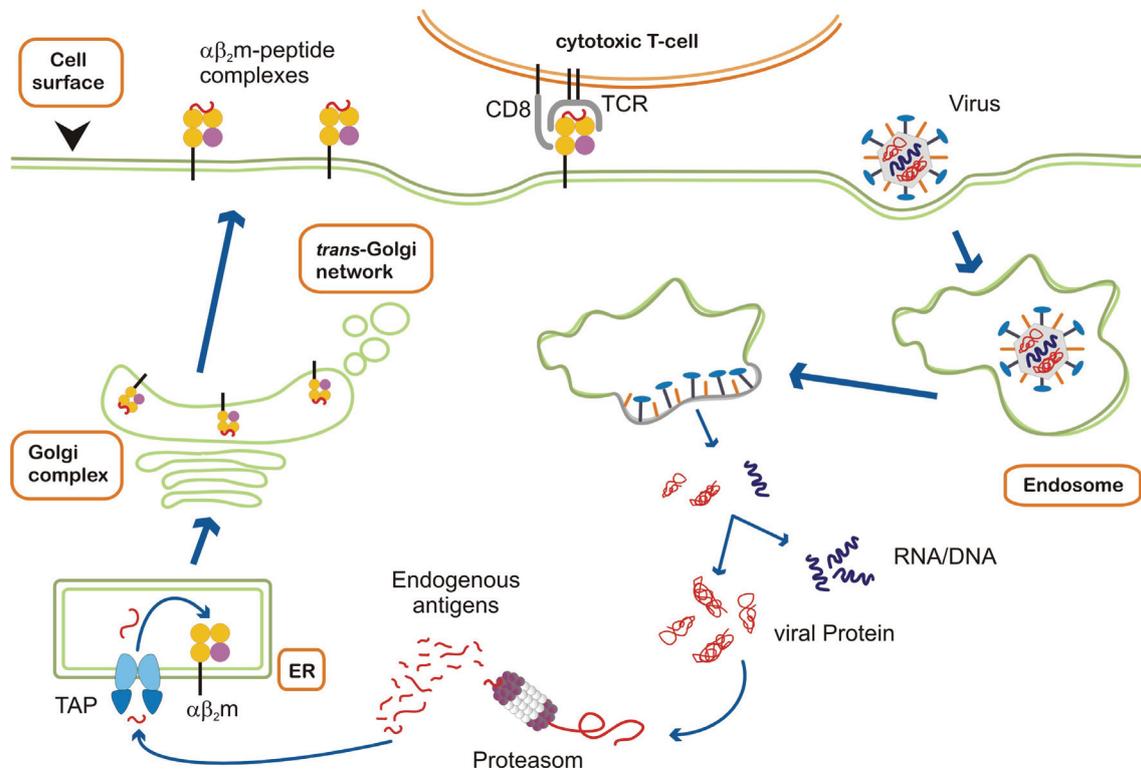
**Abbildung 1. Überblick über den MHC Klasse II-Weg der Antigenpräsentation**

Die MHC II-Heterodimere werden im ER zusammgebaut und formen eine Peptidbindungsfurche, die durch Ii blockiert ist. Das Chaperon Ii dirigiert die MHC II-Moleküle entweder direkt (Weg 1: blauer Pfeil) oder manchmal indirekt nach Wiederaufnahme von der Zelloberfläche (Weg 2: roter Pfeil) in das MIIC (*MHC class II containing compartment*), wo Ii durch eine Reihe endosomaler Proteasen bis auf das CLIP Fragment degradiert wird. Das Chaperon HLA-DM katalysiert den Austausch von CLIP gegen relevante exogene Antigenfragmente (rot und gelb) und bereitet den Transport der beladenen MHC II-Moleküle an die Plasmamembran vor. Dort verweilen die Moleküle bis sie, nach Ubiquitylierung der  $\beta$ -Kette, wieder internalisiert werden (Weg 3: oranger Pfeil) (nach Rocha & Neefjes, 2008).

### 1.2.2 MHC I-Weg der Antigenprozessierung (endogene Peptide)

Der MHC I-Weg beschreibt die Prozessierung und Präsentation von endogenen Antigenen mittels MHC I-Molekülen für CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Der Mensch kodiert für drei Typen von MHC I-Molekülen: HLA-A, HLA-B und HLA-C. Die verschiedenen Typen werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und bestehen aus einer MHC-kodierten, membranverankerten  $\alpha$ -Kette, sowie dem assoziierten  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2m), das außerhalb des MHC-Locus kodiert wird. Die Peptidbindungsfurche wird durch die  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domänen gebildet, während die  $\alpha$ 3-Domäne eine Bindungsstelle für CD8 besitzt. Die Peptidbindungsfurche erlaubt die Bindung von Peptiden mit einer definierten Länge von 8-10 Aminosäuren, da diese an den Enden geschlossen ist (Saric et al, 2002; Serwold et al, 2002; York et al, 2002). Heterodimere MHC I-Moleküle werden *de novo* im ER synthetisiert und mit Peptiden beladen. Die Peptide für die Beladung stammen dabei von endogenen Proteinen, die im Laufe des normalen Zellstoffwechsels über den Ubiquitin-Proteasom-Weg im Zytosol abgebaut werden. Besonders alte, denaturierte, falsch gefaltete oder falsch translatierte Proteine, sogenannte DRiPs (*defective ribosomal products*), werden durch das Proteasom abgebaut. Wenn eine Zelle infiziert oder entartet ist, werden jedoch auch Proteine viraler oder tumoraler Herkunft degradiert und dem MHC I-Weg zugeführt (Schubert et al, 2000). Nur 10% der degradierten Proteinfragmente werden nachfolgend vom heterodimeren TAP-Komplex (*transporter associated with antigen processing*) in das ER-Lumen transportiert und, wenn notwendig, von der im ER lokalisierten Aminopeptidase ERAP1 oder ERAP2 geschnitten. Der TAP-Komplex gehört zur Familie der ABC Transporter (*ATP-binding cassette*), die die chemische Energie des ATPs in Energie für den Membrantransport umwandeln. Die so transportierten Peptide werden im ER auf neusynthetisierte MHC I-Moleküle geladen. Dieser komplexe Assemblierungsprozess wird durch eine Reihe von Faltungsenzymen katalysiert, und führt zur Bildung eines makromolekularen Transport-, Chaperon- und Beladungskomplexes, dem Peptidbeladungskomplex (PLC) (vgl.1.3). Stabil assemblierte MHC-Peptid-Komplexe können nach Qualitätskontrolle das ER über den sekretorischen Weg verlassen und werden an der Zelloberfläche von zytotoxischen T-Zellen auf ihr beladenes Peptid überprüft. Werden neben „eigenen“ auch „fremde“ (nicht-zelleigene) Proteinfragmente präsentiert, veranlasst die T-Zelle die Apoptose der virusinfizierten bzw. entarteten Zelle. Befinden sich hingegen nur zelleigene Peptide im MHC I-Komplex, werden

diese nicht durch CTLs erkannt, da T-Lymphozyten mit einer Spezifität gegen zelleigene Peptide schon während der Reifung im Thymus eliminiert werden. Eine Übersicht über den MHC Klasse I-Weg ist in Abbildung 2 dargestellt.



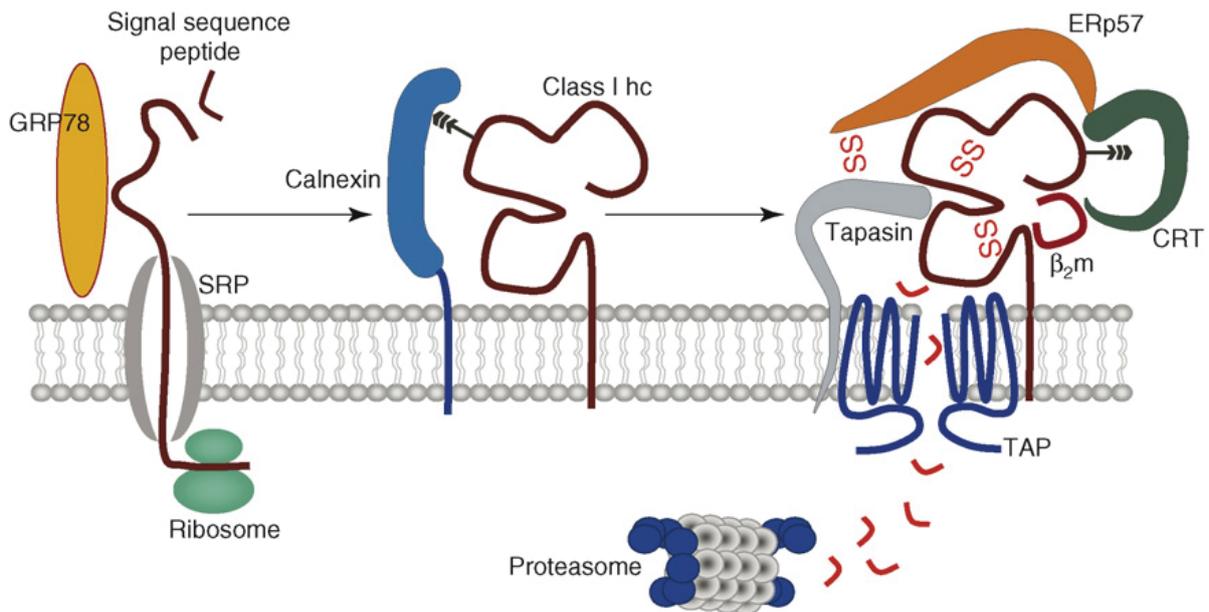
**Abbildung 2. Überblick über den MHC Klasse I-Weg der Antigenpräsentation**

Die MHC I-Heterodimere werden im ER zusammengebaut und mittels des Peptidbeladungskomplexes mit endogenen Peptiden beladen, die zuvor vom Proteasom abgebaut, und mittels TAP ins ER-Lumen transportiert werden. Die beladenen MHC I-Komplexe werden anschließend über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche gebracht, wo die Präsentation der Antigene und deren Erkennung durch zytotoxische T-Zellen erfolgt. Die endogenen Peptide können dabei von zelleigenen Proteinen stammen oder wie hier dargestellt viraler Herkunft sein (nach Rocha & Neeffjes, 2008).

### 1.3 Der Peptidbeladungskomplex (PLC)

Der Peptidbeladungskomplex (*peptide-loading complex*, PLC) spielt eine zentrale Rolle innerhalb der Antigenpräsentation mittels MHC I-Molekülen, da er für den Transport degradierter Proteine ins ER und die anschließende Beladung von MHC I-Molekülen mit viralen Peptiden verantwortlich ist. Der PLC ist ein metastabiler Komplex von etwa 1 MDa und besteht aus TAP, Tapasin, Calretikulin, der schweren

Kette von MHC I-Molekülen,  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ) und der löslichen Thiolreduktase ERp57 (Cresswell et al, 2005). Während des Aufbaus des PLCs treten MHC I- $\beta_2m$  Dimere in den Komplex ein und dissoziieren wieder, wenn sie Peptid gebunden haben. Eine zentrale Komponente des PLCs ist der heterodimere TAP-Transporter (vgl.1.4), der für den Transport der im Zytosol degradierten Proteine ins ER-Lumen verantwortlich ist. Hierbei können Peptide mit einer Länge von 8-40 Aminosäuren transportiert werden (Androlewicz et al, 1994; van Endert et al, 1994). Im ER angelangt werden die Peptidfragmente, wenn nötig, von den im ER lokalisierten Aminopeptidasen ERAP1 oder ERAP2 geschnitten. Die so entstandenen Peptidfragmente haben eine Länge von 8-10 Aminosäuren, die für die Assoziation mit MHC I-Molekülen notwendig ist (Saric et al, 2002; Serwold et al, 2002; York et al, 2002). Das TAP1/TAP2 Heterodimer wird durch das Typ-I-Membranprotein Tapasin stabilisiert, wobei vermutet wird, dass entweder zwei oder vier Tapasin Moleküle mit einem TAP-Dimer assoziiert sind (Dong et al, 2009; Ortman et al, 1997; Rufer et al, 2007). Die genaue Bindungsstelle von Tapasin an den TAP-Transporter ist noch nicht bekannt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass die erste N-terminale Transmembranhelix jeder TAP-Untereinheit essenziell für die Bindung von Tapasin an TAP ist (Koch et al, 2004; Koch et al, 2006; Procko et al, 2005). Der TAP-Tapasin-Komplex, der vermutlich schon mit der Thiolreduktase ERp57 maskiert ist, rekrutiert schließlich MHC I-Moleküle mit assoziiertem Calretikulin (Park et al, 2006). Im PLC interagiert ERp57 mit Calretikulin und ist kovalent über Disulfidbrücken an Tapasin gebunden (Peaper et al, 2005). Tapasin ist ein spezifisches Substrat für ERp57, wodurch die Bildung des Tapasin-ERp57 Konjugats unabhängig von Calretikulin ist (Cresswell et al, 2005). Die Interaktion zwischen Tapasin und ERp57 ist dabei wichtig für die Abschirmung der  $\alpha_2$ -Disulfidbindung in der Peptidbindungs-furche der MHC I-Moleküle vor Reduktion. Nur vollständig oxidierte schwere Ketten von MHC I-Molekülen sind in der Lage, an den PLC zu binden (Kienast et al, 2007; Wearsch & Cresswell, 2007). Zusätzlich ist Tapasin eine Qualitätskontrollstation, da es falsch oder nicht optimal beladene MHC I-Moleküle im ER zurückhält (*editing*) (Grande et al, 2000; Schoenhals et al, 1999). Ein derzeitiges Arbeitsmodell des PLCs ist in Abbildung 3 dargestellt.



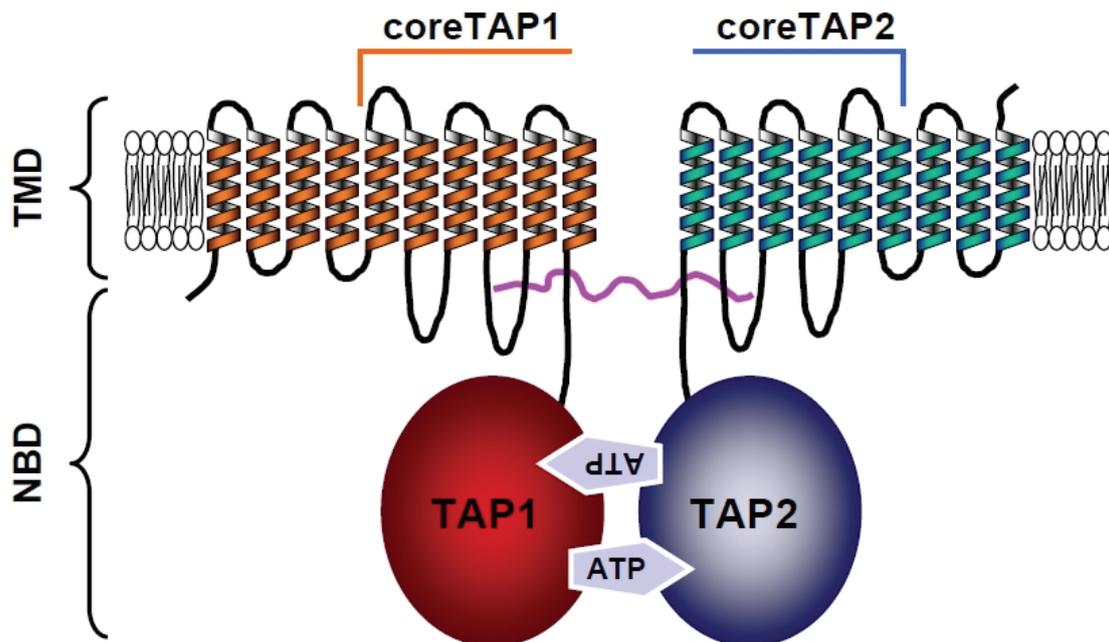
**Abbildung 3. Assemblierung des Peptidbeladungskomplexes (PLC)**

Die schwere Kette des MHC I-Moleküls wird cotranslational in die ER-Membran inseriert und durch Grp78 stabilisiert. In humanen MHC I-Molekülen ist die Aminosäure Asn86 N-glykosyliert und wird von Calnexin erkannt. Nach korrekter Faltung, Ausbildung von Disulfidbrücken und der Assoziation mit  $\beta_2m$ , wird das MHC I-Heterodimer an Calretikulin gebunden. Zusätzlich werden ERp57 und Tapasin rekrutiert. Tapasin bindet an den TAP-Komplex, der Peptide in das ER-Lumen transportiert. Nach erfolgreicher Peptidbeladung der MHC I-Moleküle, dissoziieren diese vom TAP-Komplex ab und werden über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche gebracht (Purcell & Elliott, 2008).

#### 1.4 Der ABC-Transporter TAP

Ein essenzieller Bestandteil des PLCs ist der heterodimere TAP-Transporter, der zur Superfamilie der *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter gehört. ABC-Transporter sind ubiquitär verbreitet und die humanen ABC-Transporter lassen sich nach Sequenzhomologien in sieben Unterfamilien unterteilen (ABCA-ABCG) (Abele & Tampé, 2004; Dean et al, 2001). Alle beinhalten die hochkonservierten ABC-Motive: das Walker-A-Motiv, Walker-B-Motiv und die C-Schleife (Hyde et al, 1990). Des Weiteren bestehen ABC-Transporter aus vier Domänen: zwei wenig konservierten hydrophoben Transmembrandomänen (TMD) und zwei hochkonservierten hydrophilen nukleotidbindenden Domänen (NBD), die die klassischen ABC-Motive beinhalten. Die TMDs bilden vermutlich die Translokationspore für das Substrat und verankern den Transporter in der Membran. Die NBDs sind für die ATP-Hydrolyse zuständig und stellen dadurch die für den Transport notwendige Energie zur

Verfügung. Ein funktionaler ABC-Transporter kann aus einem Protein mit vier Domänen bestehen (*full size transporter*) oder aus einem Dimer (*half size transporter*), wobei jedes Protein eine NBD und eine TMD besitzt (Abele & Tampé, 1999; Dean & Annilo, 2005). Der heterodimere TAP-Transportkomplex besteht aus zwei Untereinheiten: TAP1 (81 kDa) und TAP2 (75 kDa) und ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.



**Abbildung 4. Schematische Darstellung des heterodimeren TAP-Transporters**

TAP ist ein Heterodimer, der aus TAP1 und TAP2 besteht. Die Kerndomäne wird von den ersten 6 Transmembrandomänen (TMDs) jeder TAP-Einheit gebildet (coreTAP). Die Kerndomäne beinhaltet die Peptidbindungsstelle (Peptid in rosa dargestellt) und formt die Translokationspore. Die N-terminalen Transmembranhelices von TAP1 und TAP2 rekrutieren das Adapterprotein Tapasin, während die Nukleotidbindungsdomänen (NBDs) die Energie für den Transport des Peptids über die ER Membran durch ATP-Hydrolyse liefern (nach Koch & Tampé, 2006).

Mit neun weiteren Vertretern gehört der TAP-Transporter zur ABCB-Unterfamilie und transportiert unter ATP-Verbrauch Peptide unterschiedlicher Länge über die ER-Membran. Jede Untereinheit des Transporters besteht aus einer C-terminalen NBD und einer N-terminalen TMD. Hydrophobizitätsanalysen und Sequenzalignierungen mit verschiedenen ABC Proteinen bekannter Topologie sagen zehn Transmembransegmente für TAP1 (Schrodt et al, 2006) und neun für TAP2 (noch unklar) voraus. Die Kerndomäne besteht aus 6+6 Transmembransegmenten. Der 6+6 Kern von TAP ist für die Integration von TAP in die Membran, die Heterodimerisierung, Peptidbindung und den Transport von Peptiden ausreichend (Koch et al, 2004).

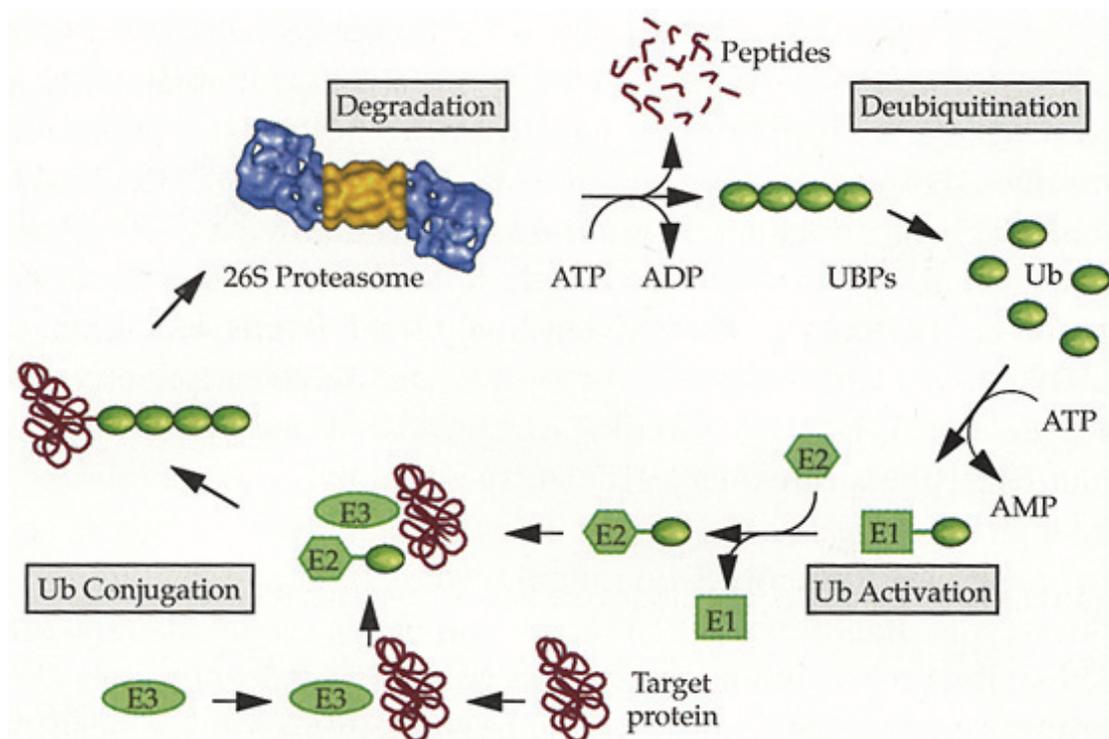
## **1.5 Degradation zellulärer Proteine**

Während des normalen Zellstoffwechsels wird eine Vielzahl von alten oder falschgefalteten Proteinen abgebaut. In der Zelle herrscht ständig ein Gleichgewicht von Synthese und Degradation von Proteinen, wobei die Lebensdauer von den jeweiligen Proteinen abhängt. Das Zellorganell, das hauptsächlich für den Abbau von Proteinen zuständig ist, ist das Lysosom. Lysosomen sind mit hydrolytischen Enzymen gefüllte Organellen, die eine kontrollierte intrazelluläre Verdauung bei einem sauren pH-Wert (pH ~5) erlauben. In den Lysosomen werden extrazellulär durch Phagozytose aufgenommene Partikel oder durch Pinozytose aufgenommene Flüssigkeiten, sowie ausgediente Organellen (Makroautophagie) und intrazelluläre Proteine (Mikroautophagie) abgebaut. Zusätzlich gibt es jedoch in der Zelle andere Mechanismen, um Proteine gezielt abzubauen. Hierfür spielt das Ubiquitin-Molekül eine essenzielle Rolle. Es vermittelt die Proteasom-abhängige Degradation (vgl. 1.5.1). Außerdem können Membranproteine über Mono- oder Oligoubiquitylierung für lysosomale Verdauung markiert werden. Zusätzlich kann das kleine Protein SUMO (*small ubiquitin-like modifier*), was dem Ubiquitin ähnelt, kovalent an bestimmte Proteine geheftet werden. Die SUMOylierung ist eine post-translationale Modifikation, die an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist, wie zum Beispiel Transkriptionskontrolle, Apoptose und Protein-Stabilität (zusammengefasst in (Ciechanover, 2005)).

### **1.5.1 Proteasom-abhängige Protein-Degradation**

Die kontrollierte Degradation zellulärer Proteine erfolgt hauptsächlich über den ATP-abhängigen Ubiquitin-Proteasom-Weg (Hershko & Ciechanover, 1998). Eine Hauptfunktion dieses Weges ist die Qualitätskontrolle von neu-synthetisierten Proteinen (Kopito, 1997). Ubiquitin wird hierfür durch ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) aktiviert, und daraufhin auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) übertragen. Das E2-Enzym und das Protein-Substrat binden spezifisch an eine Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) und die 8-kDa große, aktivierte Ubiquitin-Einheit wird schließlich an Lysin-Reste des jeweiligen Proteins angehängt. Daraufhin werden weitere Ubiquitin-Moleküle mittels Ubiquitin-Ubiquitin Isopeptidbindung angefügt. Dies geschieht so lange, bis die entstandene Kette durch das 26S-Proteasom erkannt wird. Diese multikatalytische Protease entsteht durch die Assoziation zweier

multimerer Komponenten, dem 20S-Proteasom und dem regulatorischen 19S-Komplex. Die 19S-Untereinheit erkennt polyubiquitylierte Proteine, entfernt daraufhin die Ubiquitin-Kette und leitet das Protein in das 20S-Proteasom, einem Zylinder, der aus vier heptameren Ringen besteht (Ferrell et al, 2000). Die zwei äußeren Ringe bestehen aus mehreren  $\alpha$ -Untereinheiten, die an die 19S-Untereinheit binden. Die inneren Ringe bestehen aus  $\beta$ -Untereinheiten, von denen drei spezifische Protease-Aktivitäten aufweisen. Die Pup1/Z/beta<sub>2</sub>-Untereinheit spaltet nach basischen Resten, die Pre2/X/beta<sub>5</sub>-Untereinheit nach hydrophoben und die Pre3/Y/beta<sub>1</sub>-Untereinheit nach sauren Resten (Arendt & Hochstrasser, 1997; Dick et al, 1998). Das Ziel-Protein wird somit unter ATP-Verbrauch in Peptid-Fragmente der Länge von 6-20 Aminosäuren aufgespalten (Wang et al, 1999) und wiederverwendbare Ubiquitin-Moleküle werden zum Schluss durch ein Deubiquitierungs-Enzym freigesetzt (siehe Abbildung 5).

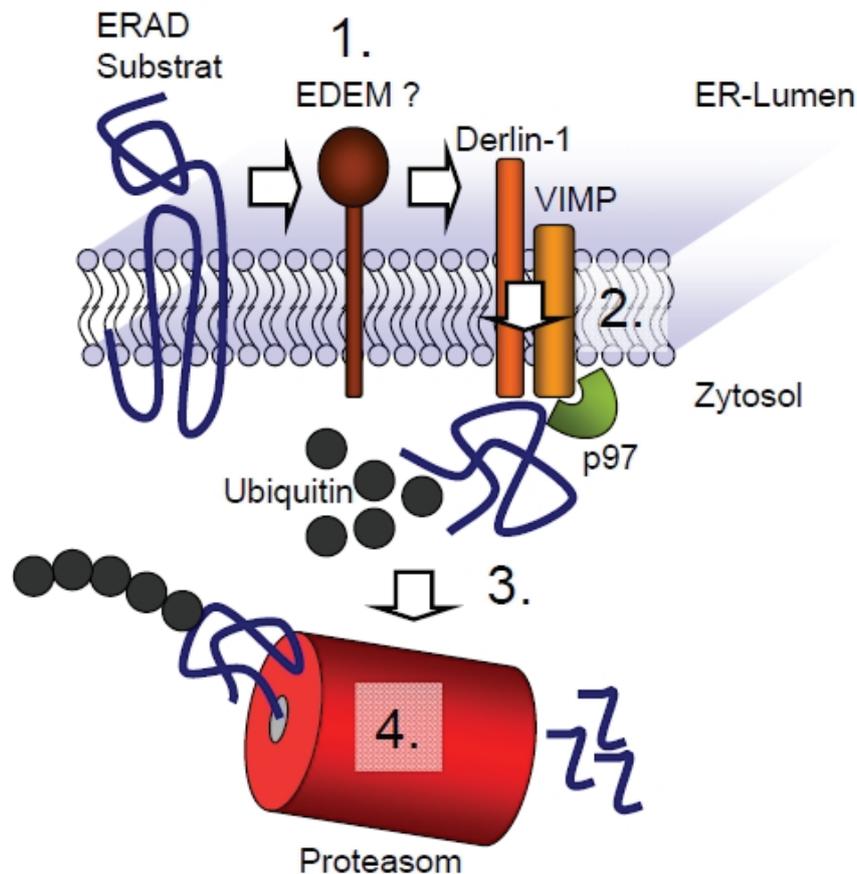


**Abbildung 5. Übersicht über den Ubiquitin-Proteasom-Weg**

Das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) aktiviert die Ubiquitin-Moleküle. Das aktivierte Ubiquitin wird auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) übertragen und zusammen mit der Ubiquitin-Protein-Ligase auf das Ziel-Protein übertragen. Nach erfolgter proteasomaler Degradation werden die Ubiquitin-Moleküle durch Deubiquitylierung wieder freigesetzt (www.hgu.mrc.ac.uk/Research/Gordon/anre.jpg, Dr. Colin Gordon, MRC, Edinburgh).

### 1.5.2 Endoplasmatisches Reticulum-assoziierte Degradation (ERAD)

Im ER werden falsch gefaltete Membranproteine sowie lösliche Proteine durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut. Dieser Prozess wird als Endoplasmatisches Reticulum-assoziierte Degradation (ERAD) bezeichnet (zusammengefasst in (Bar-Nun, 2005; McCracken & Brodsky, 2005)). In Säugerzellen kann der ERAD-Prozess in vier Schritte unterteilt werden: Erkennung, Retrotranslokation, Ubiquitylierung und Degradation. Die Erkennung ungefalteter oder falsch-gefalteter Proteine erfolgt über das *enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein* (EDEM), welches zwischen gefalteten und ungefalteten Proteinen unterscheiden kann (Hosokawa et al, 2001; Molinari et al, 2003). Nach der Erkennung wird das ERAD-Substrat aufgefaltet und die Disulfid-Brücken werden gespalten. Daraufhin wird das Substrat zur Retrotranslokations-Maschinerie übertragen, die aus p97, Derlin-1 und dem *valosin-containing protein (VCP)-interacting membrane protein* (VIMP) besteht (Ye et al, 2004). Derlin-1 könnte einen Retrotranslokations-Kanal in der ER-Membran bilden, ähnlich wie es bei dem Hefe-Homolog Der1p der Fall ist (Knop et al, 1996). Dieses Protein würde somit die Erkennung ungefalteter Proteine mit der Ubiquitin-vermittelten Degradation im Zytosol verknüpfen (Lilley & Ploegh, 2004). Derlin-1 ist mit p97 assoziiert und wird durch VIMP überbrückt. Derlin-2 und Derlin-3 sind weitere Der1-Homologe, die auch an der ERAD beteiligt sind, ihre genaue Funktion ist aber noch nicht vollständig charakterisiert. Es ist jedoch bekannt, dass p97 eine zytosolische AAA-ATPase (*ATPase associated with various cellular activities*) ist, die ungefaltete ER-Proteine im Zytosol rekrutiert (Rabinovich et al, 2002; Ye et al, 2001). Nach der Retrotranslokation werden die Proteine durch das E1-E2-E3 System ubiquityliert. Nach der Ubiquitylierung und Deglykosylierung wird das Protein im Zytosol durch das Proteasom degradiert. Eine Übersicht über den ERAD-Weg für die Degradation von Proteinen im ER ist in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6. Degradation von Proteinen im ER über den ERAD-Weg**

(1) Ungefaltete Proteine werden von EDEM erkannt. (2) Die Membranproteine Derlin-1 und VIMP unterstützen die Retrotranslokation des Proteins, (3) wonach die AAA-ATPase p97 die Entfaltung katalysiert und die Ubiquitylierung erleichtert. (4) Letztendlich erfolgt die proteasomale Degradation im Zytosol (nach Nikles & Tampé, 2007).

### 1.5.3 ERAD von CFTR

Es ist bisher noch nicht bekannt, auf welchem Wege der TAP-Transporter degradiert wird. Das erste Säuger-ER-Protein, welches als Substrat für den ERAD-Weg identifiziert wurde, ist der ABC-Transporter *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) (Jensen et al, 1995). Bei Patienten, die unter zystischer Fibrose leiden, führen Mutationen ( $\Delta$ Phe508) im CFTR-Protein zu einer verstärkten Degradation des neu-synthetisierten Proteins über den ERAD-Weg (Brodsky & McCracken, 1997; Ward et al, 1995). Die Mutation innerhalb des CFTR scheint die Proteinfaltung zu stören und somit zu einem falsch oder nicht vollständig gefalteten Protein zu führen, das von der Qualitätskontrolle im ER erkannt und

anschließend degradiert wird (Qu et al, 1997; Qu & Thomas, 1996). Wie genau das falsch-gefaltete Protein von der Zelle erkannt und schließlich degradiert wird, ist bisher unbekannt. Es wird vermutet, dass Chaperone, die an der Faltung neu-synthetisierter Proteine beteiligt sind, entweder die Reifung des CFTR unterstützen (Loo et al, 1998) oder das Protein in den ERAD-Weg leiten (Meacham et al, 2001). Um das Schicksal des CFTR-Proteins verfolgen zu können, wurde in dem Labor von Prof. William Skach in Portland, Oregon, USA der ERAD-Weg nachgestellt, wobei CFTR *in vitro* in ER-Membranen (Hunde-Pankreas-Mikrosomen) translatiert wurde (Xiong et al, 1999). Hierfür wurde das Protein in Anwesenheit von  $^{35}\text{S}$ -Methionin in Kaninchen-Reticulozyten-Lysat (RRL, *rabbit reticulocyte lysate*) translatiert. Die Translation in Hunde-Pankreas-Mikrosomen hat sich als besonders geeignet für Membraninsertion und Glykosylierung erwiesen. Es können jedoch auch andere Membranquellen oder semi-permeabilisierte Zellen eingesetzt werden. Nach erfolgreicher Translation wurden die Membranen abgetrennt und die Degradation des translatierten Proteins unter verschiedenen Bedingungen verfolgt. Das *in vitro* translatierte Protein hat dann als einziges Protein das radioaktive  $^{35}\text{S}$ -Methionin aufgenommen. Aus diesem Grund können auch radioaktive Degradationsprodukte detektiert werden, die sich nicht mehr mittels Trichloracetat (TCA) präzipitieren lassen (Carlson et al, 2005). Mit Hilfe dieser Methode konnte gezeigt werden, dass sowohl Derlin-1 als auch p97 an der Degradation von CFTR beteiligt sind (Carlson et al, 2006).

## **1.6 Interaktion von Viren mit dem Immunsystem**

Parallel zur Entwicklung des Immunsystems, haben Viren ausgeklügelte Strategien entwickelt, dieses zu umgehen (zusammengefasst in (Lilley & Ploegh, 2005; Loch & Tampé, 2005; Yewdell & Hill, 2002)). Die erste Taktik wird als „kiss and run“ bezeichnet. Hierbei repliziert sich das Virus sehr schnell, bevor eine adaptive Immunantwort aufgebaut werden kann (3–5 Tage). Diese Tricks werden insbesondere von Viren mit sehr kleinem Genom eingesetzt, wie dem Ebola-Virus oder dem Marburg-Virus, beides höchst pathogene RNA-Viren. Diese Filoviren führen zu Blutungen auslösendem (hämorrhagischem) Fieber. Trotz der schwerwiegenden Krankheiten, die durch diese Viren ausgelöst werden, ist die genomische Organisation vergleichsweise einfach. So kodiert z.B. das Genom des Marburg-Virus für nur 7–8 Proteine. Eine weitere Strategie liegt in einer hohen Mutationsrate wie beispielsweise für das humane Immundefizienz-Virus (HIV). Da sich dieses Virus ständig verändert, kann es vom Immunsystem schlecht erkannt und zerstört werden. Zudem inaktiviert das Virus gezielt eine Schaltzentrale des Immunsystems, die T-Helferzellen.

Im Gegensatz zu den vorangestellten Beispielen wenden Viren mit einer langsamen Replikationszeit und einem großen Genom (120-230 Kilobasenpaare), wie zum Beispiel Herpesviren, andere, subtilere Strategien an. Da der MHC I-Weg der Antigenpräsentation eine wesentliche Rolle bei der Erkennung und Zerstörung von Virus-infizierten Zellen spielt, interagieren eine Vielzahl von Herpesviren, aber auch einige Adenoviren und Retroviren mit diesem Weg der Antigenprozessierung, um die Präsentation von viralen Protein-Fragmenten an der Zelloberfläche zu inhibieren. Ziel ist es, dass die infizierte Zelle nicht als solche erkannt und somit nicht zerstört wird. Hierbei kommt es nicht selten vor, dass ein Virus für mehrere unterschiedliche Proteine kodiert, die an verschiedenen Punkten mit dem MHC I-Weg interferieren. Eine Besonderheit von Herpesviren ist, dass sie im Wirtsorganismus in einem sogenannten Latenzzustand persistieren. Dieser Zustand ermöglicht eine Virus-Reaktivierung, meist unter Stress oder bei einem geschwächten Immunsystem, die dann zum Ausbruch der Krankheit führen kann. Acht humanpathogene Arten der Herpesviren sind bekannt, die auch als Humane Herpesviren (HHV) bezeichnet werden. Die einzelnen Arten sind jeweils Auslöser für spezifische Krankheiten und in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1. Übersicht über humanpathogene Herpesviren**

Bezeichnung des Virus		Ausgelöste Krankheit
<b>Alpha-Herpesviren</b> replizieren schnell, haben ein breites Wirtsspektrum und persistieren in den Ganglien des Wirtes dauerhaft		
HHV-1	Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1)	<i>Herpes labialis, Herpes nasalis, Herpes genitalis, Herpes perianalis/glutealis, Stomatitis aphthosa, Herpes facialis/buccalis</i>
HHV-2	Herpes-Simplex-Virus Typ 2 (HSV-2)	<i>Herpes (simplex) genitalis, Herpes (simplex) labialis</i>
HHV-3	Varicella-Zoster-Virus (VZV)	Windpocken, Gürtelrose ( <i>Herpes zoster</i> )
<b>Beta-Herpesviren</b> replizieren langsam, haben ein enges Wirtsspektrum und führen bei infizierten Zellen zu starker Vergrößerung (Zytomegalie)		
HHV-4	Zytomeglievirus (HCMV)	CMV-Pneumonie, CMV-Sialoadenitis, Kolitis
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6	Drei-Tage-Fieber
HHV-7	Humanes Herpesvirus 7	Drei-Tage-Fieber, Röschenflechte ( <i>Pityriasis rosea</i> )
<b>Gamma-Herpesviren</b> haben sehr unterschiedliche Replikationszeiten und zeigen ein sehr enges Wirtsspektrum, gelegentlich mit malignen Erkrankungen assoziiert		
HHV-5	Epstein-Barr-Virus (EBV)	Pfeiffer-Drüsenfieber, Nasopharynxkarzinom, Non-Hodgkin-Lymphome, PTLD
HHV-8	Humanes Herpes-Virus 8	Kaposi-Sarkom, Morbus Cystleman, Lymphome

Das Herpes-Simplex-Virus (HSV-1 und HSV-2) infiziert zum Beispiel Epithelzellen und führt zu charakteristischen Herpes-Bläschen, meistens im Bereich der Lippen. Das Virus infiziert aber auch spezielle Nervenzellen und persistiert in diesen Spinalganglien des Nervensystems. Wenn das Virus wieder aktiv wird, zerstört es die Nervenzellen und befällt wieder die Epithelzellen, so dass eine akute Herpeserkrankung auftritt. Ein weiterer Vertreter der Herpesviren, das Zytomeglievirus (CMV), kommt ubiquitär vor. Abhängig vom Lebensstandard des jeweiligen Landes sind zwischen 50 und über 90% der Bevölkerung mit dem humanpathogenen CMV (HCMV) infiziert. Die meisten Primärinfektionen verlaufen jedoch asymptomatisch. Allerdings kann es bei immungeschwächten Patienten, zum Beispiel nach einer HIV-Infektion oder einer Organtransplantation, zur Reaktivierung des Virus und somit auch zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung kommen.

Einige der Strategien wie Herpesviren mit dem MHC I-Weg der Antigenprozessierung interagieren, um die Präsentation endogener Peptide auf der Zelloberfläche zu reduzieren, werden im nachfolgenden detailliert vorgestellt.

### 1.6.1 Inhibition der Degradation viraler Proteine

Das Proteasom spielt eine wichtige Rolle bei der Degradation zellulärer Proteine, die durch Ubiquitylierung für Degradation markiert sind (siehe 1.5.1). Interessanterweise geht ein Großteil der an der Zelloberfläche präsentierten Peptide aus defekten Translations-Produkten (DRiPs) hervor. Die proteasomale Degradation zytosolischer Proteine ist die erste Angriffsmöglichkeit innerhalb des MHC I-Weges, die sich bietet. Herpesviren sind in der Lage, mit dieser ersten Phase der Antigenprozessierung zu interagieren, indem die Degradation viraler Proteine und somit die Präsentation von Peptiden viraler Herkunft auf der Zelloberfläche reduziert wird. Dieser Mechanismus liegt der Latenzphase des Epstein-Barr-Virus (EBV) zu Grunde. Bei einer Infektion im Kindesalter treten meist keine Symptome auf, wobei es bei jugendlichen oder erwachsenen Infizierten in 30-60% der Fälle zum Ausbruch der infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber) kommt, die wegen der oralen Übertragung auch als *kissing disease* bezeichnet wird. Ab dem 40. Lebensjahr sind etwa 98% der Menschen mit EBV infiziert. Besteht eine Immunsuppression, kann sich das Virus unkontrolliert vermehren und zur Entstehung verschiedener seltener Krebserkrankungen führen (Burkitt-Lymphom, Lymphome, posttransplantative lymphoproliferative Erkrankung). Während der Latenzphase werden nur wenige Proteine, die der Etablierung und Aufrechterhaltung des nichtproduktiven B-Zell-Zyklus dienen (z.B. EBNA3A, LMP1 und auch das virale Protein EBNA1 (*Epstein-Barr-Virus nuclear antigen 1*), exprimiert. EBNA1 ist für die Steuerung der episomalen Replikation verantwortlich (Wu et al, 2002). Zusätzlich kann das aus Glycin und Alanin-Wiederholungen bestehende Protein mit Hilfe dieser repetitiven Sequenzen sich selbst, aber auch andere proteasomale Substrate vor der Degradation schützen, indem es das Glycin-Alanin-Motiv (GAR) auf diese überträgt (Levitskaya et al, 1997; Sharipo et al, 1998). Mit welchem Mechanismus diese Region den Abbau inhibiert, ist nicht vollständig aufgeklärt. Zusätzlich zur verlängerten Lebensdauer des Proteins, unterdrückt die GAR-Domäne die Translation von EBNA-1 mittels eines unbekanntes Mechanismus. Dies führt zu einem zweifachen Schutz bei dem zum Einen die Bildung antigener Peptide reduziert wird, wahrscheinlich durch Verringerung der DRiPs, und zum Anderen die Degradation des gereiften Proteins inhibiert wird (Yin et al, 2003). Interessanterweise ist die Mehrzahl der gebildeten EBNA-1 Epitope auf den Abbau von neu-synthetisiertem

Protein und nicht auf die Degradation von langlebigem, stabilem EBNA-1 zurückzuführen (Tellam et al, 2004).

### 1.6.2 Inhibition des intrazellulären Antigen transports

Speziell der Peptidbeladungskomplex und der TAP-Transporter bilden einen idealen Angriffspunkt für virale Proteine. Vier bekannte Proteine die mit dem PLC interferieren sind ICP47, US6, mK3 und UL49.5. ICP47 (*infected cell protein 47*), ein virales Protein des HSV-1, ist ein zytosolisches, mit der Membran assoziiertes Protein mit einer Größe von etwa 10 kDa und besitzt keine Sequenzhomologie mit anderen Proteinen, außer denen der *Herpesviridae* (Bigger & Martin, 2004). Das Protein interferiert direkt mit dem TAP-Komplex, indem es vom Zytosol aus an TAP bindet und mit Peptiden um die Peptidbindungsstelle konkurriert (IC<sub>50</sub> 50 nM). Es hat jedoch keinen Effekt auf die ATP-Bindung (Ahn et al, 1996; Früh et al, 1995; Gorbulev et al, 2001; Hill et al, 1995). ICP47 ist ein spezifischer Inhibitor für den humanen TAP-Komplex, da es keine Inhibition von Mäuse-, Meerschweinchen- oder Hasen-TAP induziert (Jugovic et al, 1998; Tomazin et al, 1998). Zusätzlich wurde die N-terminale Region von 32 Aminosäuren als die minimal aktive Domäne des Proteins identifiziert (Neumann et al, 1997). Diese Domäne ist in wässriger Lösung weitgehend unstrukturiert. In räumlicher Nähe der Membran bildet sie jedoch eine  $\alpha$ -helicale Struktur aus (Beinert et al, 1997). Von dieser Domäne konnte eine NMR-Struktur in Anwesenheit von Membranen aufgelöst werden und es wurde gezeigt, dass diese Domäne eine  $\alpha$ -Helix-loop- $\alpha$ -Helix-Struktur einnimmt (Pfänder et al, 1999). Kürzlich wurde mittels NMR diese Struktur noch verfeinert. Hierbei stellte sich heraus, dass eine der beiden Helices tiefer in die Membran eindringt und als Membrananker funktionieren könnte. Somit würde die relative ICP47-Konzentration in der Nähe des TAP-Komplexes erhöht, um diesen effizienter inhibieren zu können (Aisenbrey et al, 2006).

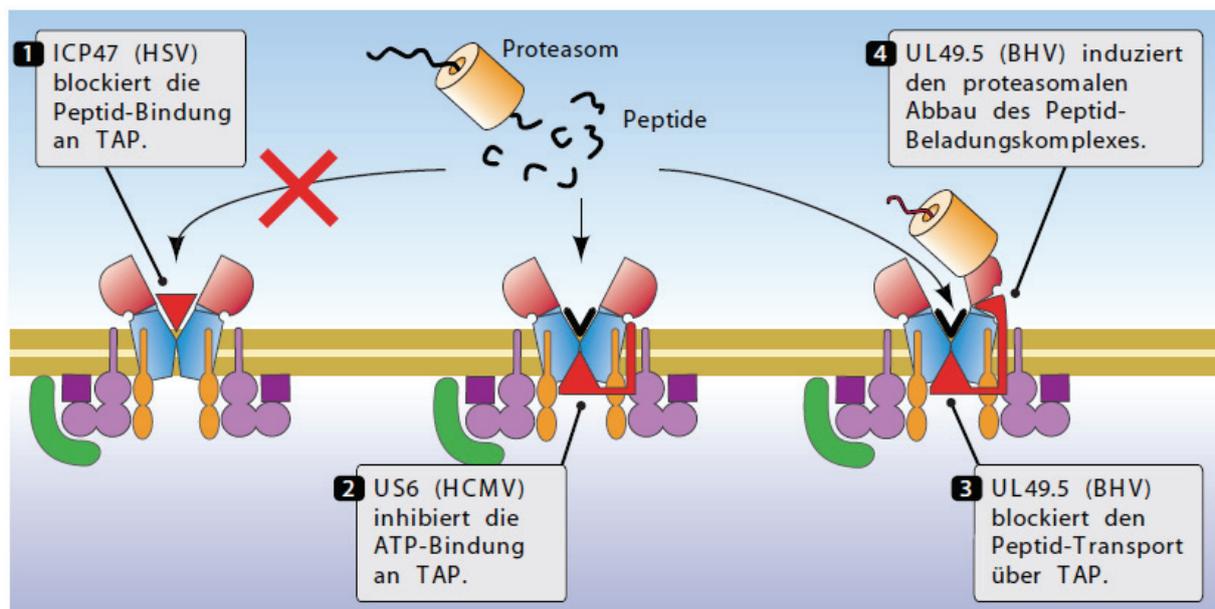
Viele Menschen sind mit dem HCMV infiziert, das jedoch selten zu einer ernsthaften Erkrankung führt. Die *unique short* (US) Gen-Region dieses Virus kodiert für mindestens fünf Typ-I-Membranglykoproteine, die mit der Antigenprozessierung via MHC I interferieren (zusammengefasst in (Hengel et al, 1998)). Das US6-Protein (23 kDa) blockiert den TAP-abhängigen Peptidtransport von der ER-luminalen Seite aus. Im Gegensatz zu ICP47 inhibiert US6 die ATP-Bindung und dessen Hydrolyse,

nicht aber die Peptidbindung an den TAP-Komplex. Genauso wie ICP47 ist US6 ein hoch spezifischer Inhibitor für den humanen TAP-Komplex (Ahn et al, 1997; Hewitt et al, 2001; Kyritsis et al, 2001; Lehner et al, 1997). Des Weiteren konnte der aktive Bereich des Proteins auf die ER-luminale Domäne eingegrenzt werden. Die Glykosylierung ist für die inhibitorische Funktion nicht von Bedeutung. Der IC<sub>50</sub>-Wert für TAP-Inhibition liegt bei 1 µM für die ER-luminale Domäne des löslichen Proteins (Kyritsis et al, 2001). Mit Hilfe des löslichen US6 konnte der Prozess der Kreuz-Präsentation in Dendritischen Zellen (DCs) nachvollzogen werden. Bei diesem Vorgang werden exogene Antigene, die normalerweise auf MHC II-Molekülen präsentiert werden, auf MHC I-Moleküle geladen (Ackerman & Cresswell, 2004). Dieses stellt eine wichtige Verbindung zwischen der Prozessierung von endogenen und exogenen Antigenen dar. Mit Hilfe von rekombinantem US6 konnte gezeigt werden, dass lösliche Antigene nach der Endozytose im ER zu finden sind. Sie werden dann ins Zytosol zurücktransportiert und durch das Proteasom degradiert. Diese Peptide werden über den klassischen Weg zurück in das ER-Lumen transportiert und auf MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche kreuz-präsentiert (Ackerman et al, 2003; Ackerman et al, 2005). Kürzlich wurde mittels löslichem US6, das an Transferrin gekoppelt ist, nachgewiesen, dass nach Transferrin-Rezeptor vermittelter Endozytose, eine Kreuz-Präsentation löslicher Antigene in einem frühen endosomalen Kompartiment erfolgt (Burgdorf et al, 2008).

Ein weiterer TAP-spezifischer viraler Inhibitor ist das mK3 des murinen  $\gamma$ -Herpesvirus 68 (MHV-68), das auf zwei Arten mit dem MHC I-Weg interagiert. Dieser  $\gamma$ 2-Herpesvirus ist sehr nahe mit dem humanen KSHV verwandt und verursacht eine Krankheit ähnlich dem Pfeifferischen Drüsenfieber bei Mäusen. Das virale Protein mK3 des MHV-68 ist ein Typ-III-Membranprotein, das die Ubiquitylierung von Proteinen, die mit mK3 assoziierten über eine zytoplasmatische N-terminale RING-Finger Domäne veranlasst (Boname et al, 2004b; Boname & Stevenson, 2001). mK3 bindet in Abhängigkeit von Tapasin an den zytoplasmatischen Anteil von neu synthetisierten MHC I-Molekülen und induziert so deren Ubiquitylierung und schnelle proteasomale Degradation (Boname et al, 2004b; Boname & Stevenson, 2001; Stevenson et al, 2000). Nach detaillierter Analyse der zytoplasmatischen Domäne von MHC I konnte gezeigt werden, dass bei der mK3-vermittelten Ubiquitylierung sowohl Serine, Threonine, als auch Lysine im MHC I ubiquityliert werden können. Somit wird eine schnelle proteasomale Degradation gewährleistet (Wang et al, 2007).

Des Weiteren bindet mK3 an den PLC und induziert zusätzlich die proteasomale Degradation von TAP und MHC I-Molekülen (Boname et al, 2004a; Boname et al, 2004b; Lybarger et al, 2003). Das virale Protein scheint dabei direkt an den TAP-Komplex zu binden und benötigt für dessen Degradation zwingend sowohl die Transmembran-Domäne als auch den zytoplasmatischen Bereich von Tapasin (Boname et al, 2004a; Boname et al, 2004b; Wang et al, 2004).

Das kürzlich identifizierte UL49.5 (aus der *unique long* Region) Protein des bovinen Herpesvirus-1 (BHV-1) hat einen neuartigen Mechanismus zur TAP-Inhibition entwickelt, indem es den Peptidtransport inhibiert und zusätzlich die proteasomale Degradation des TAP-Transporters induziert (Koppers-Lalic et al, 2005). Das UL49.5-Protein wird in Abschnitt 1.6.7 detailliert beschrieben. In Abbildung 7 sind die viralen Proteine zusammengefasst, die mit TAP interagieren.



**Abbildung 7. Virale Inhibitoren des heterodimeren TAP-Transporters**

ICP47 bindet vom Zytosol aus an TAP und inhibiert die Peptidbindung (1), wohingegen das Protein US6 von der ER-luminalen Seite aus mit TAP interferiert und so die ATP-Bindung blockiert (2). UL49.5 blockiert ebenfalls den Peptidtransport von TAP (3) und leitet zudem die Degradation des Peptidbeladungskomplexes ein (4).

Kürzlich wurden Gene der lytischen Phase von EBV analysiert und ein Genprodukt identifiziert, welches spezifisch den TAP-Komplex inhibiert. Es handelt sich um ein Gen, das während des lytischen Vermehrungszyklus des Virus exprimiert wird. Das sehr kleine (60 Aminosäuren) BNLF2a Protein interagiert mit dem TAP-Transportkomplex und inhibiert somit Peptid- und ATP-Bindung (Hislop et al, 2007). Das

Protein kann in zwei Domänen unterteilt werden, eine N-terminale Domäne und einen 18 Aminosäuren langen, hydrophoben C-terminalen Bereich, der wahrscheinlich in die Membran inseriert. Welche Funktionen die einzelnen Domänen übernehmen, wurde noch nicht charakterisiert (Horst et al, 2009). Da das Protein keine Signalsequenz besitzt, wird es vermutlich posttranslational in die ER-Membran inserieren. Dieser komplexe Prozess wurde kürzlich für ein weiteres sogenanntes *tail-anchored* (TA) Protein, Sec61 $\beta$ , charakterisiert (Stefanovic & Hegde, 2007).

### 1.6.3 Abbau von MHC I-Komplexen

Selbst nach dem Transport der Peptide in das ER-Lumen, bieten sich weitere multiple Angriffspunkte für Viren an. Bevor sich die Peptid-MHC-Komplexe auf den Weg zur Plasmamembran machen, können sie destabilisiert und abgebaut werden. Das HCMV nutzt auch diese Möglichkeit und zeigt eine besondere Anpassung an das adaptive Immunsystem. Die US-Region kodiert mindestens fünf bisher bekannte Typ-I-Membranglykoproteine, die auf unterschiedliche Weise mit dem MHC I-Weg interagieren. US2 (24 kDa) und US11 (33 kDa) leiten zum Beispiel die Retro-Translokation und den proteasomalen Abbau von neusynthetisierten MHC I-Molekülen im Zytosol ein. Die Untersuchung dieser viralen Faktoren trug zur Aufklärung des ER-Degradationsweges bei. Dieser Weg dient der Qualitätskontrolle innerhalb des Sekretionsweges, bei der im ER falsch-gefaltete oder -assemblierte Protein(komplex)e erkannt und gezielt über den Ubiquitin-Proteasom-Weg entsorgt werden (zusammengefasst in (Tsai et al, 2002)). US2 und US11 nutzen diesen Weg, um MHC I-Moleküle gezielt zu zerstören. Durch Wechselwirkung mit ihrer ER-luminalen Domänen, wird die schwere Kette von MHC I offensichtlich als falsch-gefaltet erkannt, in das Zytosol transloziert, dort deglykosyliert, ubiquityliert und letztendlich vom Proteasom abgebaut (Furman et al, 2002b; Rehm et al, 2002; Shamu et al, 2001; Wiertz et al, 1996). Hierbei ist die Transmembrandomäne von US11 essenziell für die Retro-Translokation der schweren Kette, jedoch nicht für die Bindung des viralen Faktors an das MHC I-Molekül (Lilley et al, 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Transmembrandomäne die Assoziation von MHC I-Molekülen mit Derlin-1 katalysiert, einem Protein das essenziell für die proteasomale Degradation falsch-gefalteter Proteine im ER ist (siehe 1.5.2). Derlin-1 ist für die Degradation von MHC I-Molekülen über US11, aber nicht für die US2-katalysierte Degradation zwingend notwendig (Lilley & Ploegh, 2004). Außerdem sind

die Lysin-Reste im MHC I-Molekül verantwortlich für die Degradation durch US2, aber nicht durch US11. Trotzdem wird das MHC I-Molekül an sich nicht ubiquityliert, obwohl die Lysine für die Degradation essenziell sind (Hassink et al, 2006). Dies verdeutlicht, dass die zwei viralen Proteine einen unterschiedlichen Mechanismus einsetzen. Interessanterweise scheint der kurze (14 Aminosäuren) zytoplasmatische Bereich des US2-Proteins eine wichtige Rolle bei der MHC I-Degradation zu spielen. Das Entfernen von nur vier Resten am C-Terminus führt zu einem inaktiven Protein. Zusätzlich wird spekuliert, dass der zytoplasmatische Bereich eine 3(10)-helicale Konformation einnimmt, da jeder dritte Rest dieser Domäne für die MHC I-Degradation essenziell ist (Oresic et al, 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl US2 als auch US11 mit nicht-assemblierten MHC I-Molekülen interagieren. Der US11-katalysierte Mechanismus scheint dabei einem Vorgang zu ähneln, der normalerweise für die Entsorgung falsch-gefalteter MHC I-Moleküle zuständig ist (Barel et al, 2006). Es konnte ein Interaktionspartner von US2 charakterisiert werden: Die Signalpeptid-Peptidase (SPP) spielt eine wichtige Rolle in der US2-katalysierten MHC I-Degradation (Loureiro et al, 2006).

#### **1.6.4 Umleitung von MHC I-Molekülen**

Nicht alle MHC I-Moleküle können ihren Weg zur Zelloberfläche ungehindert fortsetzen. Auf diesem Weg können sie vielfach gestoppt oder umgeleitet werden. Zwei weitere HCMV-Proteine blockieren den Export von Peptid-MHC-Komplexen aus dem ER. US3 (22 kDa) interagiert nur transient mit den MHC I-Molekülen, führt aber dennoch zu einer effektiven ER-Retention (Gruhler et al, 2000; Misaghi et al, 2004). Die luminaire Domäne von US3 ist ausreichend für die ER-Retention des viralen Proteins, wobei die Transmembrandomäne und die ER-luminale Region zusammen für den Arrest der MHC I-Moleküle verantwortlich sind (Lee et al, 2000; Misaghi et al, 2004). US3 wird anschließend in Lysosomen abgebaut. So ist eine ständige Neusynthese von diesem viralen Protein nötig, um den intrazellulären Transport von MHC I kontinuierlich zu blockieren (Gruhler et al, 2000). Zusätzlich inhibiert US3 das ER-Chaperon Tapasin. Interessanterweise existieren zwei alternative Splice-Varianten des US3-Proteins mit einem Molekulargewicht von 17 kDa und 3,5 kDa. Diese verkürzten Varianten binden nicht an MHC I-Moleküle, sondern konkurrieren mit dem 22-kDa-US3 um die Bindung an Tapasin. Somit wird die Wirkung des 22-kDa-Proteins aufgehoben und die verkürzte Isoform zeigt eine negativ-regulatorische

Funktion (Liu et al, 2008; Shin et al, 2006). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass durch die Retention von MHC I-Molekülen im ER der Angriff für das US2-Protein erleichtert wird, das daraufhin die Degradation der MHC I-Moleküle einleitet. Tatsächlich unterstützt US3 die Bindung von US2 an MHC I, und damit auch die Dislokation und Degradation des MHC I-Moleküls (Noriega & Tortorella, 2008). Das US10-Protein inhibiert ebenfalls den Export von MHC I-Molekülen aus dem ER. Dabei wird der Transport nicht vollständig blockiert, sondern verzögert. US10 bindet hierfür an die schwere Kette des MHC I-Moleküls (Furman et al, 2002a). Die genauen Inhibitionsmechanismen sind jedoch noch nicht völlig aufgeklärt. Das U21 Protein vom humanen Herpesvirus 7 (Auslöser der infektiösen Mononukleose) interagiert ebenso mit MHC I-Molekülen. Als Typ-I-Membranprotein (60 kDa) bindet U21 an MHC I-Moleküle und leitet diese dann zu Lysosomen, wo sowohl die MHC I-Moleküle als auch das U21-Protein abgebaut werden. Die ER-luminale Domäne von U21 reicht aus, um MHC I zu Lysosomen zu leiten (Hudson et al, 2003; Hudson et al, 2001). Das Protein weist keine Sequenzhomologie zu anderen bekannten Proteinen auf, außer dem U21-Homolog aus dem HHV-6. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die U21-Homologen aus HHV-6A und HHV-6B ebenfalls an MHC I-Moleküle binden und diese in ein endolysosomales Kompartiment umleiten (Glosson & Hudson, 2007).

Das murine Zytomeglievirus (MCMV) kodiert drei Typ-I-Membranglykoproteine (m152, m04 und m06), die an MHC I-Moleküle binden und diese innerhalb der Zelle umdirigieren. Diese viralen Proteine werden jedoch nicht für die Virusreplikation *in vitro* benötigt. m152 (37/40 kDa), das transient über die ER-luminale Region mit MHC-Peptid-Komplexen interagiert, führt zu deren Retention und Akkumulierung im *cis*-Golgi Netzwerk. Dieses Gen wird etwa zwei Stunden nach einer Infektion transkribiert. Etwas später kommen m04 (34 kDa) und m06 (48 kDa) ins Spiel. Beide Proteine binden stabil an MHC I-Moleküle im ER und leiten diese auf unterschiedliche Weise weiter. m04-MHC-Komplexe werden an der Zelloberfläche präsentiert. m04 wirkt hierbei wahrscheinlich antagonistisch zu m152, da die an m04 gebundenen MHC I-Moleküle der Retention durch m152 entkommen. Die Funktion der m04-MHC-Komplexe an der Zelloberfläche ist noch nicht entschlüsselt, könnte aber als Maskierung für natürliche Killerzellen dienen. Außerdem leitet m06 die MHC-Komplexe in Lysosomen um, wo sowohl MHC I als auch m06 schnell über saure Proteasen abgebaut werden. Ein Di-Leucin Motif (LL) in der zytoplasmatischen

Domäne von m06 wird für die Umleitung der MHC I-Komplexe verantwortlich gemacht (Kavanagh et al, 2001; Krmpotic et al, 1999; Reusch et al, 1999).

### 1.6.5 Internalisierung von MHC I-Komplexen

An der Zelloberfläche angelangt, sind MHC I-Moleküle noch nicht vor viralen Angriffen geschützt. Das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV/ Herpesvirus 8) ist die infektiöse Ursache des Kaposi Sarkoms (KS), eines aus Endothelzellen abgeleiteten vaskulären Tumors. KS findet sich häufig bei AIDS-Patienten und ist mittlerweile die mit Abstand häufigste Tumorform in Afrika. Das KSHV kodiert zwei verwandte integrale Membranproteine (K3 und K5), die eine Sequenzidentität von 40% aufweisen. Beide supprimieren die Oberflächenexpression von MHC I-Komplexen, indem diese über Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert werden. Die MHC I-Moleküle werden dann in Endosomen sortiert und schließlich durch saure Proteasen abgebaut (Ishido et al, 2000; Yu et al, 2002). Die viralen Proteine besitzen zwei Transmembranhelices, sodass sowohl N- als auch C-Termini dieser Proteine im Zytosol lokalisiert sind. Die konservierte N-terminale Domäne kodiert eine *plant homeodomain* (PHD), die der RING-Finger-Domäne ähnelt, welche typisch für E3-Ligasen ist (Coscoy & Ganem, 2000). Die Bindung des K3-Proteins an MHC I-Moleküle induziert dessen Ubiquitylierung in einem post-ER-Kompartiment. Dies scheint ein Signal, sowohl für die Internalisierung als auch für die Sortierung in späte Endosomen zu sein (Hewitt et al, 2002). Zusätzlich konnte der Aminosäure-Rest im MHC I-Molekül identifiziert werden, der bei diesem Prozess ubiquityliert wird (Lysin 63). Diese Ubiquitylierung ist zwingend notwendig, um die K3-vermittelte Endozytose und anschließende endolysosomale Degradation zu katalysieren. Hierbei handelt es sich um einen neuartigen Mechanismus, der vielleicht auch auf weitere Rezeptoren anwendbar ist (Duncan et al, 2006). Das K5-Protein führt zu einer ähnlichen Internalisierung von MHC I-Molekülen, wobei die Spezifität für die einzelnen MHC-Allele unterschiedlich ist (Coscoy & Ganem, 2000; Ishido et al, 2000). Im K5-Protein konnten zwei Bereiche identifiziert werden, die für die MHC I-Internalisierung von großer Bedeutung sind: Ein konserviertes endozytotisches Tyrosin-Motiv und zwei saure Bereiche in K5 sind wichtig für die Degradation von MHC I-Molekülen, sodass das virale Protein wie eine E3-Ubiquitin-Ligase funktioniert (Means et al, 2007). Es existieren im menschlichen Organismus K3/K5-homologe Proteine, die *Membrane Associated RING-CH* (MARCH), zu denen

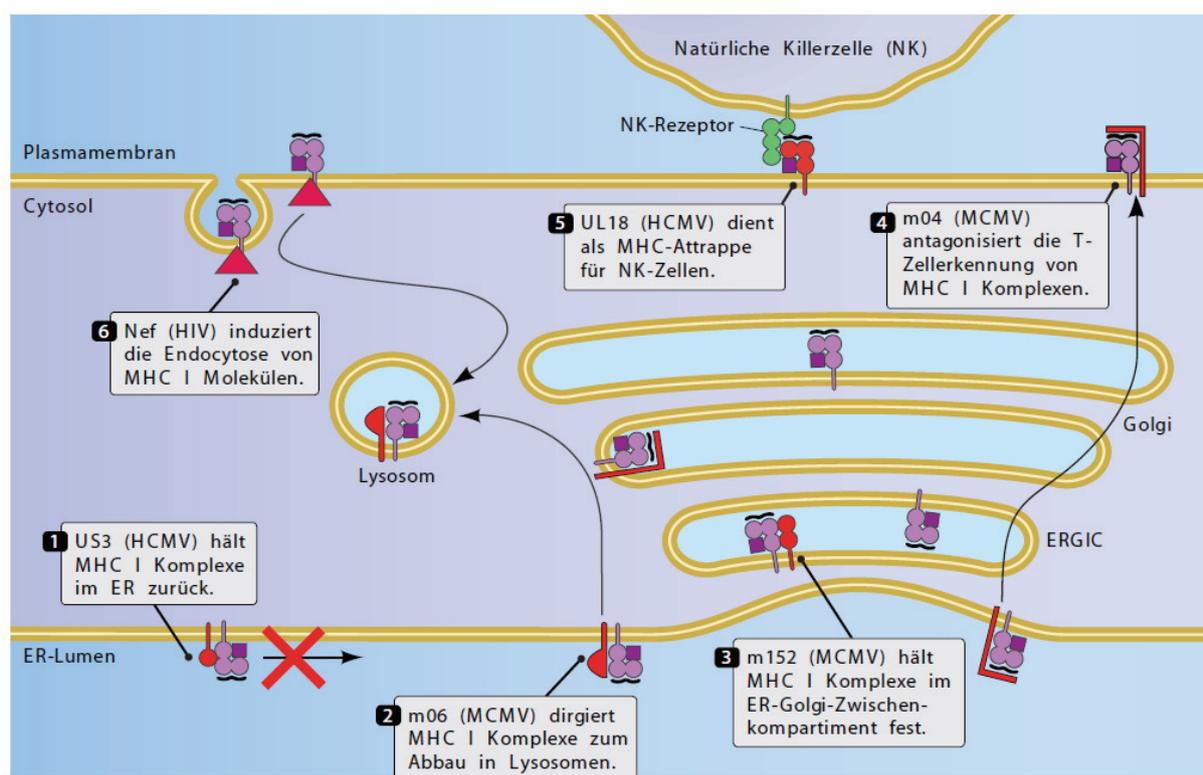
elf Proteine zählen, die auch verschiedene Membranrezeptoren (wie MHC I und MHC II) herunterregulieren. Die physiologische Funktion dieser Proteine konnte jedoch nicht geklärt werden (Nathan & Lehner, 2008).

Das humane Immundefizienz-Virus (HIV-1) kodiert für mehrere Proteine, die mit dem MHC I-Weg interagieren. Als Beispiel wird das Nef Protein (27 kDa) vorgestellt, das mittels eines Myristin-Ankers an die Membran gebunden ist. Nef interagiert mit verschiedenen Komponenten der intrazellulären Transport-Maschinerie. Unter anderem bindet Nef an den zytoplasmatischen Teil der MHC I-Moleküle und führt daraufhin zur Internalisierung von MHC I-Komplexen von der Zelloberfläche. Diese Endozytose ist Clathrin-unabhängig, und MHC I-Komplexe werden in das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und in endosomale Vesikel transportiert, wo diese abgebaut werden (Le Gall et al, 1998; Schwartz et al, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass Nef die physikalische Interaktion zwischen den MHC I-Molekülen und dem Adaptorprotein AP-1A, das im endosomalen Weg eine wichtige Rolle spielt, katalysiert (Kasper et al, 2005; Le Gall et al, 2000). Normalerweise bindet das AP-1A-Protein an Di-Leucin oder Tyrosin-Signale. In der zytoplasmatischen Domäne des HLA-A2 ist ein Tyrosin-Rest, sowie im Nef-Protein ein Methionin, für die Interaktion mit AP-1A wichtig. Somit stabilisiert Nef durch Bindung an MHC I die Interaktion des Tyrosin-Restes im MHC I mit der Tyrosin-Bindungstasche des AP-1A (Wonderlich et al, 2008). Zusätzlich wurde gezeigt, dass ein Arginin-Motiv in der N-terminalen alpha-helicalen Domäne des Nef-Proteins zwingend notwendig ist, für eine effiziente MHC I-Degradation (Schaefer et al, 2008). Es wird spekuliert, dass das Nef-Protein in Lipid-Mikrodomänen eingebettet ist, die für die inhibitorische Funktion essenziell sind (Alexander et al, 2004).

### **1.6.6 Attrappen von MHC I-Molekülen**

Werden keine MHC-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche präsentiert, wird die virus-infizierte Zelle unsichtbar für zytotoxische T-Zellen. Dies ist für das Virus jedoch nicht ohne Risiko, da Natürliche Killerzellen (NK) gerade solche Zellen erkennen und zerstören, die keine MHC-Peptid-Komplexe präsentieren. Daher kodieren sowohl das murine als auch das humane Zytomeglievirus MHC I-Homologe als Attrappen für NKs. Das UL18-Protein vom HCMV zeigt eine hohe Sequenzhomologie (25%) zur extrazellulären Domäne von MHC I-Molekülen. Bei UL18 handelt es sich um ein Typ-

I-Membranglykoprotein, das einen Komplex mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin bildet und endogene Peptide bindet. Interessanterweise ist UL18 gegen die Inhibition durch US2, US3, US6 und US11 resistent (Park et al, 2002). Das Zusammenspiel zwischen UL18 und dem TAP-Inhibitor US6 wurde detailliert beschrieben: UL18 setzt die TAP-inhibierende Wirkung von US6 außer Kraft, sodass weiterhin ein TAP-abhängiger Peptidtransport erfolgen kann. Zusätzlich interferieren UL18 und US6 zusammen mit der physikalischen Assoziation von MHC I-Molekülen und TAP, die für eine optimale Peptidbeladung zwingend notwendig ist. Somit wird trotz Wieder-aktivierung der Transportaktivität die MHC I-Oberflächenexpression niedrig gehalten (Kim et al, 2008). Die Struktur von UL18 verdeutlichte, dass ein Großteil der Protein-Oberfläche durch Zucker maskiert ist, die an 13 putativen Glykosylierungsstellen angeheftet werden. Dies erschwert den Zugang zum gebundenen Peptid und die Interaktion mit den meisten MHC I-Interaktionspartnern (Yang & Bjorkman, 2008).



**Abbildung 8. Virale Proteine, die mit MHC I-Molekülen interagieren**

US3 hält die MHC I-Moleküle im ER zurück (1), während m06 zur proteasomalen Degradation der Moleküle führt (2) und m152 die MHC I-Komplexe im ERGIC zurückhält (3). m04 bindet an die MHC I-Komplexe und verhindert an der Zelloberfläche die Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten (4). UL18 ist ein MHC I-Homolog und dient als Attrappe für Natürliche Killerzellen (5). Nef katalysiert die Endozytose von MHC I-Molekülen in Endosomen (6), während K3 und K5 die Ubiquitylierung der MHC I-Komplexe mit anschließender Endozytose und lysosomaler Degradation bewirkt.

Das homologe Protein des MCMV (m144) ist im Gegensatz zu UL18 nicht in der Lage, Peptide zu binden, wird jedoch, analog zu MHC I-Molekülen, von NK erkannt (Farrell et al, 2000; Farrell et al, 1997; Reyburn et al, 1997). In Abbildung 8 sind verschiedene Mechanismen dargestellt, bei denen Virusproteine mit MHC I-Molekülen interferieren.

### 1.6.7 Das Genprodukt UL49.5

1992 wurde bei dem Alphaherpesvirus HSV-1 innerhalb der UL-Region ein weiterer offener Leserahmen entdeckt, der für ein bis dahin noch unbekanntes virales Protein kodiert und *upstream* des für eine dUTPase kodierenden UL50-Gens liegt (Barker & Roizman, 1992; Barnett et al, 1992). Dieses als UL49.5 bzw. gN-Protein bezeichnete Genprodukt kodiert für ein nicht-essenzielles Hüllprotein des Virus (Jöns et al, 1998), welches innerhalb des ER über eine Disulfidbrücke einen Komplex mit einem anderen Hüllprotein (gM) des Virus formt (Liang et al, 1996). Dieser Komplex wird anschließend in das Golgi-Netzwerk transportiert, wo gM vollständig glykosyliert wird. Ohne UL49.5 kann gM nicht ausreichend prozessiert werden, was in einer leicht erniedrigten Infektiosität, sowie einem niedrigeren Virustiter resultiert (Rudolph et al, 2002; Tischer et al, 2002). Kürzlich konnte bei Vertretern der Alphaherpesviren eine weitere Funktion des Genprodukts UL49.5 nachgewiesen werden. Beim equinen Herpesvirus-1 (EHV-1), dem Pseudorabies Virus (PrV), sowie dem bovinen Herpesvirus-1 (BHV-1) bewirkt UL49.5 eine Reduktion der MHC I-Moleküle an der Zelloberfläche, indem es den Transport antigenener Peptide durch TAP blockiert (Ambagala et al, 2003; Ambagala et al, 2004; Ambagala et al, 2000).

Bisher sind 19 verschiedene Viren der *Herpesviridae*-Familie bekannt, deren Genom für ein homologes UL49.5-Protein kodiert; unter anderem BHV-1, GHV-1 (*gallid herpesvirus 1*), HHV-3, MDV2 (*marek's disease virus strain 2*), EHV-1 und SHV-1 (*suid herpesvirus 1*). Interessanterweise zeigen nur UL49.5-Proteine der Varicelloviren einen inhibitorischen Effekt auf den MHC I-Weg der Antigenprozessierung. Auch innerhalb der Varicelloviren unterscheiden sich die Inhibitionsmechanismen der einzelnen UL49.5-Proteine stark (Koppers-Lalic et al, 2007). Je nach Virus-Art hat UL49.5 eine Länge von 75 (HHV-3) bis 117 (GHV-1) Aminosäuren. Auf der Basis von Hydrophathie- und Consensus-Analysen wurde eine putative, etwa 22 Aminosäuren lange Transmembranhelix, sowie eine N-terminale

Signalsequenz vorhergesagt, die für die Insertion in die ER-Membran kodiert,. Für das Protein konnte außerdem bei einigen Viren eine O-Glykosylierung nachgewiesen werden (daher auch gN-Protein) (Fuchs & Mettenleiter, 2005; Jöns et al, 1996; Lake & Hutt-Fletcher, 2000; Mach et al, 2000).

Das bovine Herpesvirus (BHV-1) ist ein Mitglied der Familie der *Alphaherpesviridae* und gehört zum Genus *Varicelloviren*. Die Klassifizierung von Herpesviren ist im Anhang (siehe 9.1) zusammengefasst. BHV-1 ist ein Rinderpathogen, welches in seinem Wirt nach einer kurzen Phase der Infektion lebenslang persistiert und ist für eine Vielzahl von Krankheiten verantwortlich (Bindehautentzündung, Atemwegserkrankung, Fehlgeburt, Gehirnentzündung sowie tödliche systemische Infektion) (Liang et al, 1996). Eine Übersicht über Herpeserkrankungen bei Tieren ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2. Übersicht über die wirtschaftlich bedeutendsten Tier-Herpesviren**

Bezeichnung des Virus	Wirt	Ausgelöste Krankheit
Equines Herpesvirus 1 bis 4 (EHV-1 bis 4)	Pferd	Virusabort der Stuten, Entzündung der Atemwege
Bovines Herpesvirus 1 bis 5 (BHV-1 bis 5)	Rind	IBR-IPV (infektiöse bovine Rhinotracheitis, infektiöse pustulöse Vulvovaginitis)
Suid Herpesvirus 1 (SHV-1)	Schwein	Aujeszkysche Krankheit
Felines Herpesvirus 1 (FHV-1)	Katze	Beteiligt an Katzenschnupfen Komplex
Canine Herpesvirus 1 (CHV-1)	Hund	Scheidenentzündung, Tracheobronchitis
Hühner-Herpesvirus 1 (GaHV-1)	Hühnervögel	ILT (linfektöse Lanryngotracheitis)
Hühner-Herpesvirus 2 (GaHV-2)		Mareksche Krankheit

BHV-1 kann ebenfalls humane Zellen infizieren und dort die Antigenpräsentation stören (Koppers-Lalic et al, 2005). Dadurch können Untersuchungen in einem humanen Zellsystem durchgeführt werden und es muss nicht auf Rinderzelllinien zurückgegriffen werden. Das BHV-1 Virus enthält mindestens 33 Strukturproteine, wovon vermutlich 13 mit der Virenhülle assoziiert sind. Die Membranproteine von Alphaherpesviren spielen eine wichtige Rolle in der Virusreplikation und vor allem beim Eintrittsprozess in die Zelle. Das BHV-1 UL49.5 weist mit 75 Aminosäuren (nach Prozessierung) ein Molekulargewicht von 9 kDa auf und wird als Monomer, Homodimer und als Heterodimer mit dem viralen Glycoprotein M (gM) in infizierten Zellen und in der Virushülle gefunden (Barnett et al, 1992). Das Polypeptid hat eine 21 Aminosäuren lange N-terminale Signalsequenz, welche für die Insertion in die ER-

Membran kodiert, eine 33 Aminosäuren lange ER-luminale Domäne, eine 25 Aminosäuren lange Transmembranhelix, sowie einen zytoplasmatischen Bereich von 17 Aminosäuren (Liang et al, 1995) (siehe Abbildung 9).



### Abbildung 9. Schematische Darstellung des BHV-1 UL49.5-Proteins

Nach Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz, besteht das BHV-1 UL49.5-Protein aus 75 Aminosäuren und lässt sich in eine ER-luminale Domäne, eine Transmembranhelix und einen zytosolischen Bereich unterteilen.

Im Rahmen vielfältiger Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass das virale Protein UL49.5 von BHV-1 einen neuartigen Mechanismus entwickelt hat, um dem Immunsystem zu entkommen. Zunächst inhibiert das Protein den Transport antigener Peptide durch den TAP-Komplex. Zusätzlich induziert der zytoplasmatische Bereich die proteasomale Degradation des TAP-Komplexes, sowie des Virus-Proteins selbst (Koppers-Lalic et al, 2005). Diese proteasomale Degradation wird nur durch das BHV-1 UL49.5-Protein hervorgerufen, nicht durch weitere Homologe anderer Varicelloviren. UL49.5 ist zwar ein hoch konserviertes Protein innerhalb der Herpesviren, genaue strukturelle und mechanistische Daten fehlen hingegen, die eine detaillierte Charakterisierung der Funktionsweise des viralen Proteins zulassen.

## 1.7 Motivation und Zielsetzung

Das kürzlich identifizierte virale Genprodukt UL49.5 aus dem bovinen Herpesvirus-1 (BHV-1) bewirkt eine Verminderung von MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche. Das virale Protein interagiert mit dem *transporter associated with antigen processing* (TAP) und inhibiert den TAP-spezifischen Peptidtransport. Des Weiteren leitet die zytosolische Domäne des BHV-1 UL49.5 die proteasomale Degradation des makromolekularen Peptidbeladungskomplexes (PLC) ein. Diese UL49.5-induzierte Degradation wird nur durch das BHV-1-Protein vermittelt. Der Mechanismus der Inhibition sowie die genaue Interaktionsstelle von UL49.5 am PLC sind jedoch bislang unbekannt. Um den Funktionsmechanismus des UL49.5-Proteins nachvollziehen zu können, sollten folgende zentrale Fragestellungen im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit bearbeitet werden:

- I. BHV-1 kann speziesübergreifend sowohl Rinder- als auch humane Zellen infizieren und in diesen durch UL49.5-vermittelte TAP-Inhibition und TAP-Degradation die MHC I-abhängige Antigenpräsentation blockieren. Diese Zellen besitzen hingegen alle Komponenten des PLC. Daher sollte zur Untersuchung der Inhibition und Degradation des PLC durch UL49.5 ein Expressionssystem in Insektenzellen etabliert werden, da diese Zellen keine Proteine des humanen Immunsystems beinhalten. Somit sind diese Zellen zur Analyse der funktionalen Interaktion isolierter Komponenten des PLC und UL49.5 geeignet.
- II. Die Interaktionsstellen von UL49.5 am PLC waren bisher nicht bekannt. Aus diesem Grund sollte die Bindungsstelle im Rahmen von Coimmunpräzipitationsstudien mit verschiedenen heterodimeren TAP-Varianten bzw. den isolierten TAP-Untereinheiten und unterschiedlichen UL49.5-Mutanten eingegrenzt werden. Zusätzlich zum Insektenzellsystem sollten *in vivo*-Interaktionsstudien etabliert werden, die es erlauben, Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen zu verfolgen.
- III. Der genaue Inhibitionsmechanismus des UL49.5-Proteins konnte bisher noch nicht detailliert beschrieben werden. Um diesen besser zu verstehen, sollten kritische Domänen des Virus-Proteins identifiziert werden, die Aufschlüsse

über die Funktionsweise von UL49.5 geben. Als Typ-I-Membranprotein besteht UL49.5 aus einer ER-luminalen Domäne, einer Transmembranhelix und einem kurzen zytoplasmatischen Teil. Die inhibitorische Funktion dieser einzelnen Domänen sollte mittels verschiedenster UL49.5-Mutanten detailliert charakterisiert werden. Da bis jetzt der virale Faktor nur in stabil transduzierten Säugerzellen analysiert wurde, war es unter anderem ein Hauptziel, ein transientes Transfektionssystem zu etablieren, mit dem es möglich ist, eine Vielzahl von UL49.5-Varianten in kürzester Zeit zu untersuchen. Mit diesem System sollte die Funktionsweise von systematisch N- und C-terminal verkürzten UL49.5-Varianten detailliert untersucht werden.

- IV. Bisher war bekannt, dass die C-terminale zytoplasmatische Domäne von UL49.5 für die Degradation des PLC verantwortlich ist. Welche Reste für diese Degradation verantwortlich sind, und wie diese Degradation vermittelt wird, war völlig unbekannt. Mit verschiedenen Mutationsstudien sollte deswegen die Wirkungsweise des C-terminalen Bereichs des viralen Proteins untersucht werden. Um nähere Informationen über die UL49.5-vermittelte proteasomale Degradation des TAP-Komplexes zu bekommen, sollten der TAP-Komplex sowie das UL49.5-Protein *in vitro* translatiert werden. Somit sollte der Einfluß von UL49.5 auf die Stabilität des TAP-Komplexes untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemische Substanz	Hersteller
Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid (30%)	Roth
Agar für die Mikrobiologie	Roth
Ampicillin (Na-Salz)	Roth
APS (Ammonium-peroxo-disulfat)	Roth
Apyrase	Sigma
ATP	Sigma
Baculovirus-Agarose	Invitrogen
Benzamidin	Sigma
Bluo-Gal (5-Bromo-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid)	Roth
Bromphenolblau	Sigma
BSA (bovines Serumalbumin)	Roth
Ca-Acetat	Roth
CaCl <sub>2</sub>	Roth
Concanavalin A Sepharose	Sigma
Coomassie-Brillant-Blau R250	Roth
Coumarinsäure	Roth
Digitonin	Merck
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth/Finnyzymes
dNTP-Mix (10mM)	Fermentas
DTT (Dithiothreitol)	Roth
EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure)	Roth
Essigsäure (Eisessig)	Roth
Ethanol (p.A.)	Roth
Ethidiumbromid	Roth
<i>Gene Ruler 100bp Ladder Plus</i>	Fermentas
<i>Gene Ruler 1kb Ladder</i>	Fermentas
Glucose	Südzucker
Glycerin (87%)	Roth
Glycin	Roth
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Roth
HCl	Roth
Hefeextrakt	Roth
Isopropanol	Roth

K-Acetat	Roth
Kanamycin	Roth
KCl	Roth
LE Agarose	Seakem
Luminol	Roth
Methanol	Merck
Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid	Sigma
Mg-Acetat	Roth
MgCl <sub>2</sub>	Roth
Milchpulver	Merck
MnCl <sub>2</sub>	Roth
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth
NaCl	Roth
NAD <sup>+</sup> (100mM)	Fermentas
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth
NaOH	Roth
NP-40/Igepal	Roth
<i>Page Ruler Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas
Ponceau S	Sigma
Protein G Magnetobeads (Dynabeads)	Dynal
RbCl	Roth
Saponin	Sigma
SDS (Na-Dodecylsulfat)	Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth
Sucrose	Südzucker
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth
Tetrazyklin	Roth
TRIS (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)	Roth
Triton X 100	Anatrace
Trypan-Blau	Sigma
Trypton oder Pepton	Roth
Tween 20	Roth

### 2.1.2 Reagenzien für *in vitro* Transkription/Translation (RNase-frei)

Substanz	Hersteller
[ <sup>14</sup> C] Protein Molekulargewichts Marker (Rainbow)	GE Healthcare
CAP (G(5')ppp(5')G)	NEB
Creatin-Kinase (CK)	Roche
Creatinphosphat (CP)	Sigma
H <sub>2</sub> O für Molekularbiologie RNase-frei	Sigma
L-Aminosäure-Kit (21 L-Aminosäuren + Glycin)	Sigma
Mikrosomen (Hunde-Pankreas RmD12, OD70)	<i>W. Skach, Portland</i>
Mikrosomen (Raji, 5 mg/ml)	<i>G. Plewnia, Institut f. Biochemie</i>
Nuclease (Micrococcus)	Fermentas
Ribonucleosid Triphosphat Set (ATP, CTP, GTP, UTP)	Roche
Spermidin	Sigma
Trans <sup>35</sup> S-label für metabolisches Labeling	MP Biomedicals
tRNA (Kalbsleber)	Sigma
RiboLock <sup>TM</sup> RNase-Inhibitor	Fermentas
RRL #9 (+Hämin, + Nuclease)	<i>W. Skach, Portland</i>
RRL #10 (unbehandelt)	<i>W. Skach, Portland</i>
SP6 RNA-Polymerase	Fermentas

Puffer	Zusammensetzung
CB (5x) für Transkription	200 mM Tris HCl, pH 7,5
	30 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM Spermidin
4 NTP-cap (10x) für Transkription	5 mM ATP, CTP, UTP
	1 mM GTP
	20 mM Tris, pH 8,0
CB (20x) für Translation	40 mM Tris Ac, pH 7,5
	2 M K Ac
	16 mM MgAc <sub>2</sub>
E-Mix (5x) für Translation	5 mM ATP, GTP
	60 mM CP
	0,2 mM jeder Aminosäure außer Methionin
	5 µCi/µl Trans <sup>35</sup> S-Methionin pH 7,6 (Tris-Base)

0,1 M Sucrose-Puffer	0,1 M Sucrose
	100 mM KCl
	5 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 mM DTT
	50 mM HEPES-KOH, pH 7,5
0,5 M Sucrose-Puffer	0,5 M Sucrose
	100 mM KCl
	5 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 mM DTT
	50 mM HEPES-KOH, pH 7,5
Degradationspuffer (10x)	10 mM ATP
	120 mM CP
	30 mM DTT
	50 mM MgCl <sub>2</sub>
	100 mM Tris-HCl, pH 7,5

### 2.1.3 Enzyme und dazugehörige Puffer

Enzym	Hersteller
Restriktionsenzyme mit vom Hersteller vorgeschriebenen Puffern	Fermentas
Amp-Ligase	Fermentas
Benzonase	Merck
Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Phu-HF-Polymerase) GC-Puffer	Finnzymes
Pfu-Polymerase 10xPfu-Puffer + MgSO <sub>4</sub>	Fermentas
RNAse A	Sigma
T4-Ligase T4-Ligase Puffer	Fermentas
T4-Polynukleotid-Kinase Kinase Puffer A forward	Fermentas
Taq-Polymerase Taq-Puffer + NH <sub>4</sub> SO <sub>3</sub>	Fermentas

### 2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Substanz	Hersteller
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	PAA
Phosphat buffered saline (PBS)	PAA
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA
L-Glutamin	PAA
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA
Trypsin / EDTA (100x)	Gibco
Fugene HD	Roche
Proteasominhibitor Cbz-L3 (MG132)	Sigma
$\gamma$ -Interferon	Sigma
Sf900 II Medium	Gibco
Pluronic	Gibco

### 2.1.5 Kulturmedien und Lösungen

Puffer / Medium	Zusammensetzung
3x Probenpuffer (nicht-reduzierend)	150 mM TRIS, pH 6,8 6% SDS 30% Glycerin 0,3% Bromphenolblau
3x Probenpuffer (reduzierend)	150 mM TRIS, pH 6,8 6% SDS 30% Glycerin 0,3% Bromphenolblau 100 mM DTT 5% $\beta$ -Mercaptoethanol
AP-Puffer	5 mM $MgCl_2$ , pH 7,0 in PBS
Blockpuffer	TBST + 7% Milchpulver oder BSA
Cavitation Puffer II	250 mM Sucrose 25 mM K-Acetat 5 mM Mg-Acetat 0,5 mM Ca-Acetat 50 mM TRIS, pH 7,4
Cavitation-Puffer I	250 mM Sucrose 50 mM TRIS, pH 7,4

DNA-Ladepuffer (5x)	0,1% (w/v) Bromphenolblau 50% (v/v) Glycerin 0,1 M EDTA, pH 8.0 5x TAE Aliquots werden bei $-20^{\circ}\text{C}$ gelagert.
ECL1-Lösung	10 mM TRIS, pH 8,5 2,5 mM Luminol (in DMSO) 0,4 mM Coumarin (in DMSO)
ECL2-Lösung	10 mM TRIS, pH 8,5 18 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$
IP-Lyse-Puffer	20 mM TRIS, pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM MgCl
IP-Wasch-Puffer	20 mM TRIS, pH 7,5 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0,1% Digitonin
LB-Agar (autoklaviert)	1% (w/v) Trypton oder Pepton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl 1,5% (w/v) Agar
LB-Medium (autoklaviert)	1% (w/v) Trypton oder Pepton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl
Lösung I	15 mM TRIS, pH 8,0 10 mM EDTA 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A
Lösung II	0,2 M NaOH 1% SDS
Lösung III	3 M KAc, pH 5,5
Lyse-Puffer (Bindung)	1% SDS in PBS, pH 7,0
Lyse-Puffer (Transport)	50 mM TRIS, pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM $\text{CaCl}_2$ 1 mM $\text{MnCl}_2$ 1% NP-40

Modifiziertes SF900 II Medium	SF900 II Medium Penicillin (10 U/ml) Streptomycin (0,1 mg/ml) 0,2% Pluronic 5% FCS
PBS-Puffer	10 mM Na-Phosphat, pH 7,5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ / $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 130 mM NaCl
Pi-Mix	5 mg/ml AEBSF-HCl 0,1 mg/ml Aprotinin 1 mg/ml Leupeptin 0,5 mg/ml Pepstatin A 15,6 mg/ml Benzamidin
Sammelgel-Puffer	0,5 M TRIS, pH 6,8 0,4% SDS
SDS-Laufpuffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 0,1% SDS
Silbernitrat-Lösung	0,1% (w/v) $\text{AgNO}_3$ 0,025% (v/v) Formaldehyd
SOC-Medium (autoklaviert)	2% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl Nach dem Autoklavieren erfolgt die Zugabe von: 10 mM $\text{MgCl}_2$ (steril-filtriert) 20 mM Glucose (steril-filtriert)
Stop-Puffer (Transport)	5 mM $\text{MgCl}_2$ 10 mM EDTA in PBS
TAE-Puffer	40 mM TRIS/Essigsäure 1 mM EDTA
TBF I – Puffer (steril filtriert)	30 mM K-Acetat, pH 5,8 100 mM RbCl 50 mM $\text{MnCl}_2$ 10 mM $\text{CaCl}_2$ Glycerin (EK 13%)

TBF II – Puffer (steril filtriert)	10 mM MOPS, pH 6,8 10 mM RbCl 75 mM CaCl 9,5% (v/v) Glycerin
TBS	150 mM NaCl 20 mM TRIS, pH 8,0
TBS-T	TBS + 0,1% (v/v) Tween 20
Thiosulfatpuffer	100 mM NaAc, pH 6,0 30% (v/v) Ethanol 1 mg/ml Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Transferpuffer	192 mM Glycin 25 mM TRIS 20% Methanol
Trenngel-Puffer	1,5 M TRIS, pH 8,8 0,4% SDS

### 2.1.6 Peptide

Peptid	Sequenz
C4F	RRYΦKSTEL (Φ, Fluorescein-markiertes Cystein)
NSTCL	RRYQNSTΦL (Φ, Fluorescein-markiertes Cystein)
R9LQK	RRYQKSTEL

### 2.1.7 DNA-Aufreinigung

Kit	Hersteller
<i>Baculo Gold Transfection Set</i>	BD Pharmingen
<i>Nucleobond AX100 Kit</i>	Macherey & Nagel
<i>NucleoSpin Plasmid Kit</i>	Macherey & Nagel
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen

### 2.1.8 Antikörper

Antikörper	Herkunft
anti-Kaninchen-HRP	BD Pharmingen
anti-Maus-HRP	Sigma
anti-Ratte-HRP	Sigma
anti-Myc	Hybridomüberstand (Maus); freundlicherweise von Carola Hunte (MPI für Biophysik, Frankfurt) zur Verfügung gestellt.
anti-Tap1 (148.3)	Laboreigener Hybridomüberstand (Maus)
anti-Tap2 (435.3)	Laboreigener Hybridomüberstand (Maus)
anti-Tapasin (7F6)	Laboreigener Hybridomüberstand (Ratte)
anti-UL49.5 <sub>C</sub>	Hybridomüberstand (Kaninchen), freundlicherweise von E. Wiertz (Leiden) zur Verfügung gestellt
anti-UL49.5 <sub>N</sub>	Hybridomüberstand (Kaninchen), freundlicherweise von E. Wiertz (Leiden) zur Verfügung gestellt
anti-β-actin	Sigma
Phycoerythrin (PE) anti-human HLA-ABC (W6/32)	eBioscience
Phycoerythrin (PE) Mouse IgG2a Isotype Control	eBioscience
anti-His (10)	Novagen

### 2.1.9 Bakterienstämme, Zelllinien und Viren

Bakterienstamm	Verwendung
<i>E. coli</i> DH5α	Transformation mit Plasmid-DNA
<i>E. coli</i> DH10Bac	Transformation mit Bacmid-DNA

Zelllinie	Herkunft
E.derm	Epidermale Pferdezelllinie
HeLa	Humane Gebärmutterkarzinom Zelllinie
HEK293T	Humane embryonale Nierenzelllinie
Mel JuSo (MJS)	Humane Melanozyten Zelllinie
MDBK	Rinder Nierenzelllinie
PK15	Schweine Nierenzelllinie
ROSS	MJS stabil transduziert mit TAP1-EGFP und BHV-1 UL49.5 (sortiert)
WOS	MJS stabil transduziert mit TAP1-EGFP und BHV-1 UL49.5 falsch-orientiert (sortiert)

<b>Virus</b>	<b>Herkunft</b>
wtTAP1/2-Virus	Labor-Stock
Tapasin-Virus	Labor-Stock
BHV1 UL49.5His <sub>10</sub> -Virus	Von <i>F. Klauschies</i> zur Verfügung gestellt
BHV1 UL49.5wt-Virus	Von <i>F. Klauschies</i> zur Verfügung gestellt
BHV1 UL49.5ΔN5	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
BHV1 UL49.5ΔN10	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
BHV1 UL49.5Δtail	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
BHV1 UL49.5ΔC3	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
BHV1 UL49.5 C21A	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
BHV1 UL49.5 C57A	Im Rahmen dieser Arbeit generiert
BHV1 UL49.5 C21A C57A	Im Rahmen dieser Arbeit generiert

### 2.1.10 Plasmide

<b>Plasmid</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Expressionsystem</b>
pIRES2-EGFP	Kanamycin	humane Zellen
pcDNA3.1	Ampicillin	humane Zellen
pEGFP-N1	Kanamycin	humane Zellen
pFastBac-1	Ampicillin	Insektenzellen
pYHT9	Ampicillin	Hefezellen
pET21a	Ampicillin	<i>E. coli</i>
pSP64	Ampicillin	<i>In vitro</i> Translation

### 2.1.11 Hergestellte DNA-Konstrukte

Konstrukt	Resistenz	Expressionsystem
pEGFPN3-YC155-GS-TAP1	Ampicillin	BiFC
pEGFPN3-YC155-GS-coreTAP1	Ampicillin	BiFC
pEGFPN3-US6-YN155	Ampicillin	BiFC
pEGFPN3-ICP47-YN155	Ampicillin	BiFC
pEGFPN3-UL49.5 (BHV)-YN155	Ampicillin	BiFC
pEGFPN3-UL49.5 (SHV)-YN155	Ampicillin	BiFC
pEGFPN3-UL49.5 (EHV)-YN155	Ampicillin	BiFC
pEGFPN3-UL49.5 (VZV)-YN155	Ampicillin	BiFC
pEGFPN3-UL49.5 $\Delta$ tail (BHV)-YN155	Ampicillin	BiFC
pEGFPN3-UL49.5 $\Delta$ N5 (BHV)-YN155	Ampicillin	BiFC
pEGFPN3-UL49.5 $\Delta$ N10 (BHV)-YN155	Ampicillin	BiFC
pEGFPN3-UL49.5 $\Delta$ N15 (BHV)-YN155	Ampicillin	BiFC
pEGFPN3-UL49.5 $\Delta$ N20 (BHV)-YN155	Ampicillin	BiFC
pEGFPN3-UL49.5 $\Delta$ N25 (BHV)-YN155	Ampicillin	BiFC
pEGFPN3-UL49.5 $\Delta$ N30 (BHV)-YN155	Ampicillin	BiFC
pEGFP-N1-UL49.5wt	Kanamycin	humane Zellen
pEGFP-N1-UL49.5 $\Delta$ tail	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-US6	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-ICP47	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 (BHV)	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 (SHV)	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 (EHV)	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 (VZV)	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 $\Delta$ tail	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 ERlum	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 HIS10	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 YN155	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 $\Delta$ N5	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 $\Delta$ N10	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 $\Delta$ N15	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 $\Delta$ N20	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 $\Delta$ N25	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 $\Delta$ N30	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5(BHV) Vtail	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5(VZV) Btail	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 $\Delta$ C1	Kanamycin	humane Zellen

---

pIRES2-EGFP-UL49.5 ΔC2	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 ΔC3	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 ΔC6	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 ΔC9	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 ΔC12	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 C21A	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 C57A	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 C21A C57A	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 K68A	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 K69A	Kanamycin	humane Zellen
pIRES2-EGFP-UL49.5 K68A K69A	Kanamycin	humane Zellen
pFastBac-1 UL49.5 Δtail	Ampicillin	Insektenzellen
pFastBac-1 UL49.5 ΔC3	Ampicillin	Insektenzellen
pFastBac-1 UL49.5 ΔN5	Ampicillin	Insektenzellen
pFastBac-1 UL49.5 ΔN10	Ampicillin	Insektenzellen
pFastBac-1 UL49.5 C21A	Ampicillin	Insektenzellen
pFastBac-1 UL49.5 C57A	Ampicillin	Insektenzellen
pFastBac-1 UL49.5 C21A C57A	Ampicillin	Insektenzellen
pYTH9-UL49.5 C-tail	Ampicillin	Hefezellen
pET21a-T7-UL49.5	Ampicillin	<i>E. coli</i>
pET21a-HIS10-UL49.5	Ampicillin	<i>E. coli</i>
pSP64-UL49.5	Ampicillin	<i>In vitro</i> Translation
pSP64-UL49.5 Δtail	Ampicillin	<i>In vitro</i> Translation
pSP64-UL49.5 ΔN10	Ampicillin	<i>In vitro</i> Translation
pSP64-UL49.5 ΔN10 Δtail	Ampicillin	<i>In vitro</i> Translation
pSP64-US6	Ampicillin	<i>In vitro</i> Translation
pSP64-ICP47	Ampicillin	<i>In vitro</i> Translation
pSP64-TAP1 opt	Ampicillin	<i>In vitro</i> Translation
pSP64-TAP2 opt	Ampicillin	<i>In vitro</i> Translation

---

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion bietet eine einfache Möglichkeit, um DNA-Segmente *in vitro* spezifisch zu vervielfältigen. Sie wird eingeleitet, indem man die als Matrize dienende, denaturierte DNA mit DNA-Polymerase und zwei Primern inkubiert. Während der multiplen Zyklen erfolgt dann die Synthese der komplementären Stränge. Die Zusammensetzung des Reaktionsmixes, sowie die Bedingungen der PCR sind in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3. Reaktionsmix und Bedingungen einer PCR**

Reaktionsmix		Reaktionsbedingungen		
DNA (100-200 ng)	1 µl	95°C	5 min	} 35x
Phusion-Polymerase (2U/µl)	1 µl	95°C	1 min	
GC-Puffer (5x)	20 µl	63°C	30 sec	
dNTP (10 mM)	4 µl	72°C	30 sec	
Primer for (100 pmol/µl)	1 µl	72°C	10 min	
Primer rev (100 pmol/µl)	1 µl	4°C	∞	
DMSO	5 µl			
Wasser	67 µl			

Die Produkte der PCR wurden mittels des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) aufgereinigt. Alle aus PCR-Reaktionen hervorgegangenen Sequenzen wurden nach der Klonierung durch DNA-Sequenzierung überprüft.

### 2.2.2 Ligase Kettenreaktion (LCR)

Die Ligase Kettenreaktion (LCR) funktioniert ähnlich wie eine PCR, wobei jedoch nicht die eigentliche Zielsequenz vermehrt wird, sondern der elongierte Primer amplifiziert wird, der durch eine Ligase wieder zu einem Ring verknüpft wird. Die Methode der LCR wird für die spezifische Punkt-Mutagenese benutzt, indem man Mutationen über den jeweiligen Primer in das Gen einführt. Dieser bindet an die Zielsequenz, wird nach Elongation durch Ligation wieder zu einem Ring geschlossen und steht im nächsten Zyklus erneut als Templat zur Verfügung. Um die Ringschließung zu ermöglichen, werden die Primer vor der LCR phosphoryliert. Der Phosphorylierungsansatz wird 30 min bei 37°C und zur Deaktivierung der Kinase

10 min bei 70°C inkubiert. Es werden 100-200 ng Plasmid-DNA als Templat eingesetzt. Die Reaktionsansätze für die Phosphorylierung und die LCR sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 4. Reaktionsansatz für Phosphorylierung der LCR-Primer**

Reaktionsmix	
Primer (100 pmol/μl)	2 μl
Kinase Puffer A forward (10x)	2 μl
ATP (10 mM)	2 μl
T4 Polynukleotid-Kinase (10 U/μl)	1 μl
Wasser	13 μl

**Tabelle 5. Reaktionsmix und Bedingungen für die LCR**

Reaktionsmix		Reaktionsbedingungen		
DNA	1 μl	95°C	3 min	} 30x
Pfu-Polymerase	1 μl	95°C	1 min	
Pfu-Puffer (-MgSO <sub>4</sub> )	10 μl	55°C	1 min	
Mutagener Primer, phos.	2 μl	65°C	9 min	
dNTP (2mM)	10 μl	4°C	∞	
NAD (100 mM)	1 μl			
Amp-Ligase (5 U/μl)	1 μl			
Wasser	74 μl			

Um nach der LCR-Reaktion die ursprüngliche Templat-DNA aus dem Ansatz zu entfernen, wurde ein *DpnI* Verdau durchgeführt. Das Enzym schneidet spezifisch methylierte DNA und kann die von den Bakterien methylierte DNA zerschneiden, nicht aber die neu synthetisierte DNA. Zu 19 μl LCR Ansatz wurde 1 μl *DpnI* (10 U/μl) und 1 μl Puffer Y<sup>+</sup>/Tango gegeben und mindestens 4 h bei 37°C inkubiert.

### 2.2.3 Präparativer und analytischer Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurden Restriktionsenzyme des Typs II verwendet, welche eine spezifische Spaltung von doppelsträngiger DNA an der jeweiligen Erkennungsstelle ermöglichen. Diese Enzyme schneiden an ihrer Erkennungsstelle, die zumeist aus palindromisch angeordneten Basenpaaren besteht. Typ II-Restriktionsendonukleasen benötigen Magnesium-Salze als Cofaktor.

Die Hydrolyse der DNA mit Restriktionsenzymen wurde nach Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Test-Hydrolysen zur Überprüfung von Klonierungen wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt (es wurden 2 µl Plasmid-DNA eingesetzt) und 2 h bei 37°C inkubiert. Die Hydrolyse von Vektoren und Inserts für eine anschließende Klonierung wurde in einem Volumen von 100 µl (10 µg DNA) für 4 h bei 37°C durchgeführt. Die Hydrolyse mit unterschiedlichen Enzymen erfolgte gleichzeitig, wenn die Puffer- und Reaktionsoptima vollständig übereinstimmten. Bei Verwendung der Restriktions-Endonukleasen wurde darauf geachtet, dass mindestens 2 U Enzymaktivität für je 1 µg Nukleinsäure eingesetzt wurden. Das Volumen der Glycerinhaltigen Enzymlösung sollte ein Zehntel des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Nach der Restriktion wurden die DNA-Fragmente mittels des *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt.

#### 2.2.4 Modifizierung von DNA-Enden

Zum Auffüllen von 5'-zurückhängenden und zum Abbau von 3'-überhängenden Enden wurde die T4-DNA-Polymerase verwendet. Es wurden 10 µg gereinigte DNA-Lösung in einem 70 µl-Ansatz nach Angaben des Enzym-Herstellers eingesetzt. Dem zugehörigen Puffer wurden 1 µl dNTPs (10 mM jedes Nukleotids) und 1 µl (10 U) Enzym zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor einer weiteren Modifikation wurde der Ansatz gereinigt (*QIAquick PCR Purification*).

#### 2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation eines DNA-Inserts mit linearisierter Vektor-DNA wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Die Menge der Nukleinsäureanteile wurde mittels eines analytischen Agarosegels abgeschätzt und Vektor und DNA-Insert in einem molaren Verhältnis von etwa 1:3 verwendet (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6. Reaktionsmix für die Ligation**

Reaktionsmix	
Linearisierte Vektor-DNA	50 ng
Geschnittene Insert-DNA	10 ng
T4-Ligase Puffer (10x)	1,5 µl
T4 DNA Ligase (10U/µl)	1 µl
Wasser	ad 15 µl

Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 15°C. 10 µl Ligationsansatz wurden anschließend zur Transformation von *E. coli DH5α* eingesetzt. Erhaltene Transformanten wurden durch Plasmid-Minipräparation und analytische Restriktionsspaltung charakterisiert.

### 2.2.6 Zusammenlagern komplementärer Oligonukleotide

Für die Klonierung von kleinen DNA-Fragmenten, welche sich mittels DNA-Säulchen nicht aufreinigen lassen, wurden zwei komplementäre Oligonukleotide durch Denaturierung bei 95°C für 3 min und langsames Abkühlen auf 37°C für 60 min aneinandergelagert. Hierzu wurden jeweils 1,5 µl (entspricht 150 pm) *forward*- und *reverse*-Oligonukleotid mit 46 µl 1x Annealing-Puffer (Ambion) zusammengegeben. Die entstandenen zusammengelagerten Oligonukleotide wurden anschließend mit Wasser 1:10 verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden dann 2 µl, das ungefähr 0,6 pmol entspricht, für eine Ligation eingesetzt.

### 2.2.7 Elektrophorese zur Analyse und Isolierung von Nucleinsäuren

Zur Überprüfung von Restriktionsanalysen und zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die DNA auf 0,8%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion wird Ethidiumbromid, eine in die DNA interkalierende Substanz, verwendet. Durch UV-Licht können die  $\pi$ -Elektronen des konjugierten, aromatischen Systems zur Fluoreszenz angeregt werden und somit die DNA-Banden im Agarosegel sichtbar gemacht werden.

Als Elektrolyt für die Elektrophorese diente TAE-Puffer (2.1.5). Die Agarose wurde in den Puffer gegeben und durch Kochen in Lösung gebracht. Nach Abkühlung auf etwa 55°C wurde die Lösung in die Gelträger gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Gele mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen DNA-Probenpuffer (2.1.5) versetzt, in die Geltaschen gegeben und bei 90-100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach durchgeführter Elektrophorese wurde das Gel 20 min in wässriger Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt und im Anschluss die DNA-Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Zur Determinierung der Größe der DNA-Fragmente wurden folgende DNA-Standards verwendet (Angabe der Fragmente in Basenpaaren):

1 kb-ladder (MBI): 10 000, 8 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 500, 2 500, 2 000, 1 500, 1 200, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 250

100 bp-ladder (MBI): 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200

### 2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Nach der Transformation wurden Einzelklone isoliert und auf einer neuen Agarplatte ausgestrichen. Gleichzeitig wurde mit demselben Klon eine 5 ml Übernachtskultur angeimpft und die Zellen über Nacht kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde daraufhin aus den Bakterien isoliert. Für besonders reine und salzarme DNA (beispielsweise für Sequenzierung oder weitere Versuche), wurde die Präparation über NucleoSpin-Säulen (NucleoSpin Plasmid Kit, Macherey&Nagel, „Mini-Präparation“) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Von positiven Klonen wurden daraufhin 200 ml Übernachtskulturen angeimpft und die Plasmid-DNA mit Hilfe des *Nucleobond AX100* Kits (Macherey&Nagel, „Midi-Präparation“) isoliert. Für größere DNA-Mengen, wurden 500 ml Kulturen angeimpft und mittels des *Nucleobond AX500* Kits (Macherey&Nagel, „Maxi-Präparation“) gereinigt.

### 2.2.9 Bacmid-Präparation

Die Isolierung von Bacmid-DNA doppelt-positiver Klone erfolgte nach dem *Bac-to-Bac Expression System-Protocol* (Invitrogen). Die Präparation der Bacmid-DNA glich der Isolierung von DNA mittels „Midi-Präp“. Statt einer Reinigung über eine Silicagel-Matrix wurde hierbei die DNA lediglich mittels einer Isopropanol/Ethanol-Fällung gereinigt und im Anschluss in Elutionspuffer aufgenommen.

Die Zellen wurden 1 min bei 14.000x g abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl Lösung II zugefügt, die Suspension vorsichtig durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Zellaufschluss mit 300 µl Lösung III versetzt, für 10 min auf Eis inkubiert und erneut bei 14.000x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 800 µl Isopropanol versetzt und die Bacmid-DNA für 10 min auf Eis gefällt. Daraufhin wurde die DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 40 µl warmen Elutionspuffer (10 mM TRIS, pH 8,5) aufgenommen. Die isolierte und gereinigte Bacmid-DNA

wurde bei 4°C gelagert. Aufgrund der Größe der Bacmid-DNA (~136 kb) würde eine Lagerung bei -20°C die DNA zerstören.

### 2.2.10 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration isolierter und aufgereinigter DNA kann photometrisch bestimmt werden, da die Absorption der einzelnen Basen proportional zu deren Menge ist. Dabei entsprechen 50µg/µl doppelsträngige DNA einer  $A_{260}$  von 1. Zur Überprüfung der Reinheit wird ein Spektrum zwischen 220 nm und 320 nm aufgenommen, wobei der Quotient von  $A_{260}/A_{280}$  Auskunft über die Reinheit gibt: Reine DNA besitzt einen Quotienten von 1,7–1,9; Verhältnisse von 1:1 zwischen DNA und Proteinen ergeben Quotienten von etwa 1,5 (Methoden in der Proteinanalytik 1996). Berechnet wurde die Konzentration nach folgender Formel:

$$C \text{ (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 2.2.11 Klonierungsstrategien

Das UL49.5 Gen wurde durch *de novo* Gensynthese durch die Firma GenScript hergestellt. Somit lag das Gen im pUC47 Vektor vor und wurde als Templat für Amplifizierungen mittels PCR eingesetzt. Alle hergestellten Konstrukte wurden mittels Sequenzierung überprüft. Die Plasmidkarten der Vektoren und der hergestellten Konstrukte sind im Anhang (9.2) dargestellt.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG als Lyophilisat bezogen und mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 100 µM verdünnt. Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert. Die Sequenzen aller Oligonukleotide sind in 5' → 3' Orientierung aufgeführt.

#### 2.2.11.1 Klonierung von UL49.5 in den pEGFP-Vektor

Für die Generierung von Fusionsproteinen mit dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) wurde das UL49.5 Gen, beziehungsweise das UL49.5Δtail Konstrukt, in den pEGFP-N1 (Clontech) Expressionsvektor kloniert. Dieser erlaubt die Expression C-terminaler Fusionskonstrukte eines Gens mit EGFP unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Die Amplifizierung des BHV-1 UL49.5 erfolgte mit Hilfe von PCR unter Verwendung der Primer Eco-BTIP-for und BTIP-Bam-rev-GFP

beziehungsweise BTIP-tail-Bam-rev-GFP, unter Einführung einer *EcoRI* und einer *BamHI* Schnittstelle. Alle Primer für diese Klonierungen sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Der pEGFP-N1-Vektor wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* aufgeschnitten und für die Ligation eingesetzt.

**Tabelle 7. Primer für Klonierung von UL49.5 –EGFP Fusionsproteinen**

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt

Primer-Name	Sequenz
Eco-BTIP-for	CCG <u>G</u> AAT <u>T</u> CCGG-ATGCCAAGGTCC
BTIP-Bam-rev-GFP	CGC <u>G</u> GAT <u>C</u> CG-CACCTCTACCTCTACTC
BTIP-tail Bam-rev-GFP	CGC <u>G</u> GAT <u>C</u> CGC-CAGACGGAAGCACAGAC

### 2.2.11.2 Klonierung Split-YFP (Bimolecular Fluorescence Complementation)

Die Plasmide für das Split-YFP System wurden freundlicherweise von Prof. Kerppola (University of Michigan, USA) zur Verfügung gestellt. Das YN-Fragment des YFP, bestehend aus den Aminosäuren 1 – 154, sowie das YC-Fragment, bestehend aus den Aminosäuren 155 – 238, wurden zunächst in den pcDNA3.1 Vektor umkloniert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Schreiner, Universität Frankfurt). Das YN-Fragment wurde an den C-Terminus des viralen Proteins fusioniert, ein Flexibler (GGSGGSGS) linker sorgte für die nötige Beweglichkeit. Das UL49.5 Gen bzw. UL49.5 $\Delta$ tail wurde mit Hilfe der Primer Eco-BTIP-for und BTIP-Bam-rev bzw. BTIP-tailSL-Bam-rev unter Einführung einer *EcoRI* und einer *BamHI* Schnittstelle amplifiziert. Nach der Restriktion mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* wurde das Produkt in den pcDNA3.1-YN-Vektor zwischen die *EcoRI* und *BamHI*-Schnittstellen, kloniert. Für die Generierung N-terminal verkürzter UL49.5-Varianten wurden neue *forward*-Primer konstruiert, die die Signalsequenz von UL49.5, mit zwei zusätzlichen Aminosäuren der N-terminalen Domäne, beinhalten. Danach wurden schrittweise Aminosäuren deletiert (siehe Tabelle 8). Nach der Deletion bindet der Primer normal an das UL49.5 Gen. Bei der Konstruktion der Primer wurde darauf geachtet, dass die zwei Aminosäuren nach der Signalsequenz beibehalten wurden, weil diese für die korrekte Abspaltung der Signalsequenz wichtig sind.

**Tabelle 8. Primer für Klonierung von UL49.5 –Split-YFP Fusionsproteinen**

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt

Primer-Name	Sequenz
Eco-BTIP-for	CCG <u>GAATTC</u> CGG-ATGCCAAGGTCC
BTIP-Bam-rev	CGCGGATCC-ACCTCTACCTCTACTC
BTIP-tailSL Bam-rev	CGCGGATCC-CAGACGGAAGCACAGAC
BTIP AS1-23 29-96	CG <u>GAATTC</u> CATGCCAAGGTCCCCTCTGATCGT GGCTGTAGTGGCCGCTGCCCTGTTTCGCTATCGTCCGTGGCAGGGA- CATGCGCAGAGAGGGTGCTATG
BTIP AS1-23 34-96	CG <u>GAATTC</u> CATGCCAAGGTCCCCTCTGATCGT GGCTGTAGTGGCCGCTGCCCTGTTTCGCTATCGTCCGTGGCAGGGAC- GCTATGGACTTCTGGAGC
BTIP AS1-23 39-96	CG <u>GAATTC</u> CATGCCAAGGTCCCCTCTGATCGTG GCTGTAGTGGCCGCTGCCCTGTTTCGCTATCGTCCGTGGCAGGGAC- AGCGCTGGATGCTACGCTC
BTIP AS1-23 44-96	CG <u>GAATTC</u> CATGCCAAGGTCCCCTCTGATCGT GGCTGTAGTGGCCGCTGCCCTGTTTCGCTATCGTCCG- TGGcaGggACGCTCGTGGCGTGCCTCTG
BTIP AS1-23 49-96	CG <u>GAATTC</u> CATGCCAAGGTCCCCTCTGATCGTG GCTGTAGTGGCCGCTGCCCTGTTTCGCTATCGTC- CGTGGCagGgacCTGAGCGAGCCGCCCCAG
BTIP AS1-23 54-96	CG <u>GAATTC</u> CATGCCAAGGTCCCCTCTGATCG TGGCTGTAGTGGCCGCTGCCCTGTTTCGCTATCGTCCGTGGCAGGGAC -CAGGCTCTGGTCGTG

Das YC-Fragment wurde, ebenfalls separiert durch einen flexiblen (GGSGSGS) linker, an den N-Terminus von TAP1 bzw. coreTAP1 fusioniert. coreTAP1 wurde mit Hilfe der Primer Bam-coreTAP-for (siehe Tabelle 9) unter Einführung einer *Bam*HI und *Not*I Restriktionsschnittstelle amplifiziert. TAP1 wurde mittels *Bam*HI und *Not*I aus dem pcDNA3.1-TAP1wt ausgeschnitten, und in den vorher ebenfalls mit *Bam*HI und *Not*I geschnittenen pcDNA3.1-YC Vektor eingeführt.

**Tabelle 9. Primer für Klonierung von coreTAP1 –Split-YFP Fusionsproteinen**

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt

Primer-Name	Sequenz
Bam-coreTAP1-for	CGCGGATCC-ATGGGCGCCTCTGGAAACC
coreTAP1-Not-rev	TAAAGCGGCCGCTTA-ATTCTGGAGCATCTGCAGG

### 2.2.11.3 Klonierung von UL49.5 für Expression mit dem pIRES2-EGFP Vektor

Für die Expression in Säugerzellen wurde der pIRES2-EGFP Vektor (Clontech) verwendet. Er erlaubt mit Hilfe einer *internal ribosome entry site* die gleichzeitige

Translation zweier Gene (in diesem Falle EGFP und UL49.5) mittels eines CMV-Promotors. Somit können transient transfizierte Zellen aufgrund grüner Fluoreszenz aussortiert werden, ohne ein Fusionsprotein zu bilden, welches einen negativen Einfluß auf die Funktion des Proteins haben kann. Die Amplifizierung des UL49.5 aus verschiedenen Varicelloviren erfolgte mit Hilfe von PCR unter Verwendung der Primer, die in Tabelle 10 aufgeführt sind unter Einführung einer *EcoRI* und einer *BamHI* Schnittstelle, sowie eines Stop-Kodons. Der Vektor wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* aufgeschnitten und mit den PCR Produkten ligiert.

**Tabelle 10. Primer für Klonierung von UL49.5 in den pIRES2-EGFP-Vektor**

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt

Primer-Name	Sequenz	UL49.5
Eco-BTIP-for	CCGGAATT <u>CCGG</u> -ATGCCAAGGTCC	BHV-1
BTIP-STOP-Bam-rev	CGCGGATCCTCA-ACCTCTACTCTACTC	BHV-1
VTIP-Eco-for	CCGGAATT <u>C</u> -ATGGGATCAATTACCGC	hVZV
VTIP-Bam-rev	CGCGGAT <u>CC</u> -TTACCACGTGCTGCG	hVZV
Eco-STIP-for	CCGGAATT <u>CCGG</u> -ATGGTCTCTTCC	SHV-1
STIP-STOP-Bam-rev	CGCGGATCCTTA-TACGCGACGACCAGCC	SHV-1
Eco-ETIP-for	CCGGAATT <u>CCGG</u> -ATGTTGTCGACTAG	EHV-1
ETIP-STOP-Bam-rev	CGCGGATCCTTA-GTGCAAGTGCTGCAG	EHV-1

Für die Klonierung N-terminal verkürzter UL49.5-Varianten in den pIRES2-EGFP-Vektor wurden die entsprechenden Konstrukte aus dem Split-YFP-Vektor mit Hilfe der BHV-1 spezifischen Primer aus Tabelle 10 herausamplifiziert, mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in den ebenfalls geschnittenen Vektor ligiert.

**Tabelle 11. Primer für Klonierung von C-terminal verkürzten UL49.5-Varianten**

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt

Primer-Name	Sequenz	Deletion
BTIP-C1.1-STOP-Bam-rev	CGCGGATCCTCA-TCTACCTCTACTCTCC	$\Delta C1$
BTIP-C1.2-STOP-Bam-rev	CGCGGATCCTCA-ACCTCTACTCTCCTTC	$\Delta C2$
BTIP-C1-STOP-Bam-rev	CGCGGATCCTCA-TCTACTCTCCTTCTTGTTGG	$\Delta C3$
BTIP-C2-STOP-Bam-rev	CGCGGATCCTCA-CTTCTTGTTGGGGCCAGAG	$\Delta C6$
BTIP-C3-STOP-Bam-rev	CGCGGATCCTCA-GGGGCCAGAGGCGCCCATCA	$\Delta C9$
BTIP-C4-STOP-Bam-rev	CGCGGATCCTC-A-GGCGCCATCAGACGGAAGC	$\Delta C12$
BTIP-STOP-tail-Bam-rev	CGCGGATCCTCA-CAGACGGAAGCACAGAC	$\Delta tail$
BTIP-TM-STOP-Bam-rev	CGCGGATCCTCA-GGGCGGCTCGCTCA	$\Delta tail\Delta TM$

Um C-terminal verkürzte UL49.5-Varianten herzustellen, wurde das Protein mit Hilfe des *forward* Primers Eco-BTIP-for und der unterschiedlichen *reverse* Primer aus Tabelle 11 amplifiziert und nach Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI* in den geschnittenen Vektor ligiert. Um chimäre UL49.5-Mutanten zu generieren, wurden die *reverse* Primer aus Tabelle 12 eingesetzt. Ausgehend vom BHV-1 UL49.5 wurde ein chimäres Protein mit dem zytosolischen Schwanz des hVZV UL49.5 generiert. Ein weiteres chimäres Protein bestand aus dem hVZV UL49.5 mit dem zytosolischen Schwanz des BHV-1 UL49.5.

**Tabelle 12. Primer für Klonierung chimärer UL49.5-Varianten**

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt

Primer-Name	Sequenz
BTIP+Vtail STOP Bam-rev	CGCGGATCCTTACCACGTGCTGCGTAATACAGAACGAGTAAACA GACGGAAGCACAGAC
VTIP +Btail STOP Bam-rev	CGCGGATCCTTAACCTCTACCTCTACTCTCCTTCTTGTGGGGCC AGAGGCGCCCATTAACCGGAAACACGCATG

#### 2.2.11.4 Klonierung von UL49.5 für Insektenzell-Expression

Interessante Konstrukte, die genauer untersucht werden sollten, wurden zusätzlich für die Expression in Insektenzellen kloniert. Dafür wurde der pFastBac<sup>TM</sup>1-Vektor (Invitrogen) verwendet. Die Amplifizierung des UL49.5 Gens erfolgte unter Verwendung der Primer Bam-BTIP-for und verschiedener *reverse* Primer (siehe Tabelle 13) unter Einführung einer *BamHI* und *HindIII*-Schnittstelle und eines Stop-Kodons. Der Vektor wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen *BamHI* und *HindIII* geschnitten und mit den PCR-Produkten ligiert.

**Tabelle 13. Primer für Klonierung von UL49.5-Varianten in den pFastBac1-Vektor**

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt

Primer-Name	Sequenz	Deletion
Bam-BTIP-for	CCGGGATCC-ATGCCAAGGTCCCCTCTG	
BTIP-STOP-Hind rev	CGCAAGCTTTCA-ACCTCTACCTCTACTC	keine
BTIP-tail-STOP-Hind-rev	CGCAAGCTTTCA-CAGACGGAAGCACAGAC	$\Delta$ tail
BTIP-C1-STOP-Hind-rev	CGCAAGCTTITCA-TCTACTCTCCTTCTTGTGG	$\Delta$ C3

### 2.2.11.5 Klonierung von UL49.5 für Hefe-Zwei-Hybrid-Screen

Um mögliche Interaktionspartner mit der zytosolischen Domäne von UL49.5 zu identifizieren, wurde der zytoplasmatische Schwanz in einen Hefe-Zwei-Hybrid-Vektor pYTH9, der das GAL4-Bindungsdomäne enthält, aus der Gruppe von I. Dikic (Universitätsklinikum, Frankfurt) kloniert (beschrieben in (Hecker et al, 2006)). Das Konstrukt, das für den Screen benutzt wurde, besteht aus der zytosolischen Domäne von UL49.5 gefolgt von fünf Aminosäuren der Transmembrandomäne und einem flexiblen Glycin-Serin-Linker dazwischen (siehe Abbildung 10).



#### Abbildung 10. Konstrukt für Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Konstrukt besteht aus einem Linker-Bereich, wenigen Aminosäuren der TM-Domäne von UL49.5 und dem gesamten C-terminalen Schwanz von UL49.5.

Das Genfragment wurde mit Hilfe zweier komplementärer Oligonukleotide hergestellt, die in Tabelle 14 dargestellt sind. Durch das Zusammenlagern der beiden Stränge entstanden direkt eine 5' *Sa*II und eine 3' *Bg*II-Schnittstelle, die für die Klonierung in den Vektor benutzt wurden.

#### Tabelle 14. Primer für Klonierung für das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Bereiche des UL49.5 sind unterstrichen und die Schnittstellen sind in Kleinbuchstaben dargestellt

Primer-Name	Sequenz
Y2H-Ctail-GS-for	tcgacgGGTGGAGGCGGTTTCAGGCCGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGA TCGCTGTGCTTCCGTCTGATGGGCGCCTCTGGCCCCAACAAAGAA GGAGAGTAGAGGTAGAGGTtaa
Y2H-Ctail-GS-rev	gatctTTAACCTCTACCTCTACTCTCCTTCTTGTGGGGCCAGAGGCGC CCATCAGACGGAAGCACAGCGATCCGCCACCGCCGCTGCCACCTC CGCCTGAACCGCCTCCACCcg

### 2.2.11.6 Generierung von UL49.5-Konstrukten für zellfreie Expression

Um das UL49.5-Protein im zellfreien System (*E. coli*) zu exprimieren, wurden zwei Konstrukte generiert. Es wurde hierfür der pET21a-Vektor (Novagen) verwendet, bei dem es sich um einen *E. coli*-Expressionsvektor handelt. Die ER-Leader-Sequenz wurde weggelassen und das Protein jeweils mit einem N-terminalen T7-tag und His<sub>10</sub>-tag fusioniert. Das T7-fusionierte UL49.5 wurde mittels der Primer Nde-His-

BTIP-Lead-for und BTIP-STOP-Sal-rev amplifiziert und über eine *NdeI* und eine *SalI*-Schnittstelle in den pET21a-Vektor kloniert. Dieser enthält bereits eine T7-Sequenz, der für die Klonierung verwendet wurde. Das His<sub>10</sub>-fusionierte UL49.5 wurde mit Hilfe der Primer Bam-BTIP-Lead-for und BTIP-STOP-Sal-rev amplifiziert und über eine *BamHI* und eine *SalI*-Schnittstelle in den pET21a-Vektor kloniert. Die Primer für die Amplifizierung sind in Tabelle 15 dargestellt.

**Tabelle 15. Primer für Klonierung von UL49.5 für zellfreie Expression**

Schnittstellen sind unterstrichen dargestellt

Primer-Name	Sequenz
Nde-His-BTIP-Lead-for	GGAATT <u>C</u> CATAT <u>G</u> CATCACCATCACCATCACCATCACCATCACCATCAC AGGGACCCGCTGCTGG
BTIP-STOP-Sal-rev	CGC <u>G</u> TCGACTCA-ACCTCTACCTCTACTC
Bam-BTIP-Lead-for	CGC <u>G</u> GATCCATGAGGGACCCGCTGCTGG
BTIP-STOP-Sal-rev	CGC <u>G</u> TCGACTCA-ACCTCTACCTCTACTC

### 2.2.11.7 Klonierung für *in vitro* Transkription/Translation

Für die *in vitro* Transkription / Translation mittels RRL wurden verschiedene Proteine in den pSP64-Vektor kloniert, der von W. Skach (OHSU, Portland, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Alle Konstrukte wurden nach eine 5' UTR vom *Xenopus* Globin hinter eine *NcoI*-Schnittstelle kloniert. Für die Klonierung der UL49.5-Konstrukte wurde das Protein mittels des *forward* Primers BTIP-nco-for und des jeweiligen *reverse* Primers (siehe Tabelle 16) amplifiziert. Für das N-terminal verkürzte Konstrukt wurde die DNA ausgehend von der verkürzten UL49.5-Variante amplifiziert.

**Tabelle 16. Primer für Klonierung von UL49.5 für *in vitro* Transkription**

Schnittstellen sind unterstrichen dargestellt

Primer-Name	Sequenz
BTIP-nco-for	CATG <u>C</u> CATGGGA-CCAAGTCCCCTCTGATCG
BTIP-Bam-rev	CGC <u>G</u> GATCC-ACCTCTACCTCTACTC
BTIP-tailSL Bam-rev	CGC <u>G</u> GATCC-CAGACGGAAGCACAGAC

TAP1 und TAP2 (beides optimierte Sequenz) wurden aus dem pIRES-Vektor mittels *NcoI* und *SalI* herausgeschnitten (beides freundlicherweise von S. Unger, Universität Frankfurt zur Verfügung gestellt) und über diese in den pSP64-Vektor kloniert.

### 2.2.11.8 Einführung von Punktmutationen in UL49.5

Als Ausgangskonstrukt für die Einführung einzelner Punktmutationen im UL49.5 Gen wurde das pIRES2-UL49.5 Konstrukt verwendet. Durch ortsspezifischer Mutagenese (siehe 2.2.2) wurden mittels der in Tabelle 17 aufgelisteten Oligonukleotide einzelne stark konservierte Aminosäuren zu Alaninen, beziehungsweise unter Beibehaltung der Ladung zu Argininen mutiert. Das erfolgreich mutierte Gen wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* ausgeschnitten und erneut in den pIRES2-EGFP Vektor (ebenfalls mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten) eingefügt.

**Tabelle 17. Primer für Punktmutationen in UL49.5**

Mutierte Basen sind in Kleinbuchstaben dargestellt

Primer-Name	Sequenz
BTIP C42A LCR	ACTTCTGGAGCGCTGGAgcCTACGCTCGTG
BTIP C78A LCR	ACGCTTACGGTCTGgcCTTCCGTCTGATGG
BTIP K89R LCR	TCTGGCCCCAACAgGAAGGAGAGTAGAGGT
BTIP K90R LCR	TCTGGCCCCAACAgGAAGGAGAGTAGAGGT
BTIP LCR KK89-90RR	TCTGGCCCCAACAgGAAGGAGAGTAGAGGT

### 2.2.12 DNA-Sequenzierung

Alle Konstrukte wurden von der *Scientific Research and Development GmbH* nach der Kettenabbruchmethode mittels Fluorophor-gekoppelter ddNTPs nach Sanger sequenziert (Sanger et al, 1977). Für die Sequenzier-Reaktionen wurden folgende Sequenzierprimer verwendet (siehe Tabelle 18).

**Tabelle 18. Sequenzierprimer**

Primer-Name	Sequenz	Vektor
pIRES-seq-for	AAATGGGCGGTAGGCGTGTA	pIRES2-EGFP
pIRES-seq-rev	AACGCACACCGGCCTTATTC	pIRES2-EGFP
pEYN-seq-for	GCGTGTACGGTGGGAGGTCTAT	Split-YFP
pEGFP-N1-Seq-rev	TTGCCGGTGGTGCAGATGAA	pEGFP-N1
pFastBac1-seq-for	GTGGTTGGCTACGTATACTC	pFastBac1
pET21-seq-rev	GGAATTGTGAGCGGATAAC	pET21a
pSP64-seq-for	CTGACGGCAGTTTACGAGAG	pSP64
pSP64-seq-rev	AGCTGGCACGACAGGTTTCC	pSP64

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Kulturbedingungen von *E. coli*

Zur Kultivierung von *E. coli DH5 $\alpha$*  verwendete hitzestabile Lösungen wurden bei 120°C, 2 bar für 20 min autoklaviert, hitzeempfindliche Lösungen wurden durch einen 0,2  $\mu$ m-Spritzenvorsatzfilter steril filtriert. Glasgeräte wurden für 2 Stunden bei 180°C hitzeinaktiviert, Zentrifugenbecher mit 80% Ethanol sterilisiert.

Die Kultivierung von *E. coli DH5 $\alpha$*  erfolgte in LB-Medium (2.1.5), die Anzucht von transformierten *E. coli* erfolgte in dem entsprechenden antibiotikahaltigen LB-Medium. Für die Vereinzelnung der Klone und für die Plasmidpräparation erfolgte die Inkubation ca. 15 h bei 37°C in 3 ml Schüttelkulturen. Zur Plasmid-Midi-Präparation wurden 200 ml antibiotikahaltiges LB- Medium mit einem Klon plasmidtransformierter *E. coli DH5 $\alpha$*  angeimpft und 15 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

**Tabelle 19. Konzentration der Zusätze in LB-Agar-Platten**

Zusatz	Konzentration [ $\mu$ g/ml]
Ampicillin	100
Kanamycin	50
Gentamycin	7
Bluo-Gal	100
IPTG	40

### 2.3.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

In einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen wurden 5 ml LB-Medium mit Bakterien angeimpft und für 18 Stunden bei 37°C im Bakterieninkubator geschwenkt. Diese Kultur wurde in 100 ml frisches LB-Medium überführt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,4 – 0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Messung der OD<sub>600</sub> wurde in einem Doppelstrahlphotometer in Polystyrolküvetten durchgeführt. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,4 OD, wurde das Wachstum der Bakterien sofort gestoppt, indem die Suspension auf Eis abgekühlt wurde. Daraufhin wurden die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert, anschließend in jeweils 15 ml eiskaltem TBF Puffer I resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (4000x g; 10 min; 4°C) und

die Präzipitate in jeweils 4 ml eiskaltem TBF Puffer II resuspendiert. Die Suspensionen wurden zu 50 µl oder 100 µl aliquotiert, bevor sie portionsweise in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### **2.3.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli***

Zur Transformation wurden Ligationsansätze oder Plasmid-DNA verwendet. Hierzu wurden die Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der DNA (10 µl Ligationsansatz oder 1 µl Plasmid-DNA) wurde der Ansatz vorsichtig durchmischt und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 90 s bei 42°C. Die Bakterien wurden 3 min auf Eis abgekühlt, bevor 500 µl LB-Medium dazugegeben wurden. Die Bakterien wurden 1 h bei 37°C im Bakterienschüttler (120 rpm) inkubiert, auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen (20% bzw. 80%) und anschließend 15 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **2.3.4 Lagerung von *E. coli***

Für die dauerhafte Lagerung von *E. coli DH5α* oder von Transformanden wurde der entsprechende Klon in LB- Selektionsmedium herangezogen (12 h; 37°C; 120 rpm), die Bakteriensuspension wurde daraufhin mit sterilem Glycerin auf 30% Glycerin eingestellt, durchmischt und zunächst 30 min bei -20°C abgekühlt. Die endgültige Lagerung erfolgte dann bei -80°C.

### **2.3.5 Transformation kompetenter Zellen (*E. coli* DH10Bac)**

*E. coli* DH10Bac-Zellen tragen ein Bacmid, das für das Baculovirus-Genom kodiert. Mittels Transposition durch *attTn7-Sites*, die sich auch auf dem pFastBac1-Vektor befinden, kann das jeweilige Gen in das Bacmid und somit in das Genom des Virus integriert werden. Die Transformation erfolgte nach dem *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System Protocol* (Invitrogen). Positive Klone wurden zweifach selektiert: Zum Einen kodieren DH10Bac-Zellen für eine Kanamycin- und Tetracyclin-Resistenz, der pFastBac-Vektor hingegen für eine Gentamycin-Resistenz, sodass nur erfolgreich transformierte Zellen resistent gegen alle drei Antibiotika sind. Zum Anderen trägt das Bacmid, einen lacZ-Komplementationsfaktor, der bei erfolgreicher Transformation die Expression von β-Galactosidase zulässt, was durch die Umsetzung von Bluo-Gal zu einem blauen Farbstoff detektiert wird. Klone die neben

einer erfolgreichen Transformation auch eine erfolgreiche Transposition vorweisen, besitzen ebenfalls die erforderlichen Antibiotika-Resistenzen, sind aber nicht zu einer Komplementation des lacZ-Gens fähig, da die Transpositionsstelle innerhalb des Komplementationsfaktors liegt. Um falsch-positive Klone ausschließen zu können, wurden doppelt positive Klone (Transformation und Transposition) neu ausgestrichen und mittels Colony-PCR auf ein erfolgreiches Transpositionereignis getestet.

In Tabelle 20 sind die Reaktionsbedingungen für die PCR aufgeführt, um auf doppelt positive Klone zu testen. Bei positiver Transposition erhält man ein 2600 bp Fragment, bei einer nicht stattgefundenen Transposition ein 300 bp Fragment.

**Tabelle 20. Reaktionsmix und PCR zum Test auf doppelt-positive Klone**

Reaktionsmix		Reaktionsbedingungen		
DNA	2,5 µl	95°C	5 min	} 30x
Taq-Polymerase (10U/µl)	0,5 µl	95°C	1 min	
Taq-Puffer (-MgCl <sub>2</sub> +KCl)	5 µl	52°C	1 min	
MgCl <sub>2</sub>	5 µl	72°C	5 min	
dNTP (10 mM)	5 µl	72°C	10 min	
Primer M13 for	0,5 µl	4°C	∞	
Primer M13 rev	0,5 µl			
DMSO	2,5 µl			
Wasser	28,5 µl			

Von positiven Klonen wurde eine 5 ml Übernachtskultur für die Bacmid-Präparation (2.2.9) angezogen.

## **2.4 Zellbiologische Methoden**

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden in einer Sterilbank der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Glasgeräte wurden bei 180°C im Trockenschrank über Nacht hitzesterilisiert. Hitzestabile Lösungen wurden bei 120°C und 1,2 bar für 20 min autoklaviert, hitzeempfindliche Lösungen wurden durch einen 0,2 µm-Spritzenvorsatzfilter steril filtriert.

### **2.4.1 Kultivierung von adhärennten Säugerzellen**

Die Kultivierung von adhärennten Säugerzellen erfolgte bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-begasteten Brutschrank in einer Atmosphäre von 95% Luft, 5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 100%. Die Zellen wurden in DMEM-Komplettmedium mit 10% FCS, 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin sowie 100 mg/ml Streptomycin in Gewebekulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> (T75) oder 25 cm<sup>2</sup> (T25) kultiviert. In T25-Flaschen wurden 5 ml Medium verwendet und in T75-Flaschen 10 ml. Zur Passage wurde das überstehende Medium vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, und die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% (w/v) Trypsin, 0,6 mM EDTA in PBS) überschichtet und 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit der Pipette im dreifachen Volumen Komplettmedium resuspendiert, bei 1000 rpm für 5 min bei RT in der Tischzentrifuge sedimentiert, im entsprechenden Medium resuspendiert und auf neue Gewebekulturflaschen verteilt.

### **2.4.2 Bestimmung von Zelldichten**

Zur Bestimmung von Zelldichten wurden die Zellen im Medium suspendiert und zum Auszählen der Zellen in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Die Grundfläche des Zählrasters der verwendeten Kammer besteht aus einem großen Quadrat, das 16 mittlere Quadrate enthält, welche wiederum in je 16 kleinere Quadrate unterteilt sind. Die Zellsuspension wird automatisch durch Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Zählraster eingesaugt. Die Zellen innerhalb fünf mittlerer Quadrate werden daraufhin unter dem inversen Mikroskop gezählt. Aus dem Ergebnis wird das arithmetische Mittel für die Zellzahl innerhalb eines mittleren Quadrats gebildet und mit dem Faktor  $1 \times 10^4$  multipliziert, um die Zelldichte in Zellen/ml zu erhalten.

### 2.4.3 Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden die Zellen eines 70-80% konfluenten Zellrasens suspendiert und in der Tischzentrifuge 5 min bei 1000 rpm und Raumtemperatur sedimentiert. Das Zellsediment wurde in frischem FCS, das 10% DMSO enthielt, suspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml-Portionen in Kryoröhrchen überführt, auf Eis gestellt und in Styroporboxen über Nacht langsam bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Anschließend wurden die Dauerkulturen in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

### 2.4.4 Transfektion mit Fugene6 HD (Roche)

Die Zellen sollten am Tag der Transfektion zu 50-80% konfluent sein. Einen Tag vor der Transfektion wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in ein *well* (6-*well* Schale) oder  $1 \times 10^6$  Zellen in eine T75-Flasche ausgesät. Für jede Transfektion wurden 1  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt (8  $\mu\text{g}$  für T75). Pro Ansatz (6-*well*) wurden 3  $\mu\text{l}$  Fugene6 HD in 97  $\mu\text{l}$  DMEM ohne Zusätze gelöst (35  $\mu\text{l}$  Fugene + 765  $\mu\text{l}$  DMEM pro T75-Flasche) und für 5 min bei RT inkubiert. Die DNA wurde mit dem Fugene-Reagenz gemischt und für 30 min bei RT inkubiert, damit sich die DNA-Fugene-Reagenz-Komplexe bilden konnten. Das DNA-Fugene-Gemisch wurde direkt auf die Zellen gegeben und mit dem Zellkulturmedium vermischt. Die Zellen wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 24 h inkubiert. Einen Tag nach der Transfektion konnte ein Mediumwechsel durchgeführt werden. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen schließlich analysiert.

### 2.4.5 Ernten der Zellen für Expressionstests

Die Zellen wurden in T75-Flaschen kultiviert, bis sie zu 90-95% konfluent waren. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 1 ml PBS geerntet. Zur Sedimentierung wurden die Zellen abzentrifugiert (1600 rpm, 3 min, RT). Um die Zellen aufzubrechen, wurden sie einmal eingefroren und wieder aufgetaut (*freeze and thaw*). Anschließend wurde das Zellpellet je nach Größe in 30–100  $\mu\text{l}$  Lämmli Probenpuffer (mit 300 mM DTT) aufgenommen. Die Proben wurden danach für 20 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  erhitzt, damit die Proteine vollständig denaturiert werden. Die Proben wurden daraufhin mit 2  $\mu\text{l}$  Benzonase bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 30 min inkubiert, da die Proben aufgrund der hohen DNA-Konzentration eine zu hohe Viskosität aufwiesen.

### 2.4.6 Monolayerkultur von Sf9-Zellen

Sf9-Zellen sind ovariale Insektenzellen von *Spodoptera frugiperda* (ATCC Nr. CRL 1711), welche *in vitro* mit Viren der Baculovirus-Familie infiziert werden können. Dabei wird ca. 18-24h nach der Infektion Polyhedrin in sehr hoher Konzentration exprimiert. Das virale Gen, das unter Kontrolle eines starken Polyhedrin-Promotors steht, kann durch ein fremdes Gen ersetzt werden, sodass dieses rekombinante Gen in großer Menge in der Zelle translatiert wird (bis zu 50% des Gesamtproteingehalts der Zelle). Neben der hohen Proteinausbeute, haben Insektenzellen außerdem den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu prokaryotischen Bakterienzellen in der Lage sind, eukaryotische Proteine zu glykosylieren und korrekt zu falten (insbesondere Ausbildung von Disulfidbrücken). Sf9-Zellen können sowohl in Suspension (Schüttelkultur) als auch als Monolayerkultur (adhärent) gezüchtet werden.

Monolayerkulturen von Sf9-Zellen wurden in modifiziertem SF900 II Medium gezüchtet. Dazu wurden  $1,2 \times 10^7$  Zellen aus einer Schüttelkultur in T75-Flaschen ( $75 \text{ cm}^2$  Wachstumsfläche) ausgesät und die Zellen 20 min bei  $27^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Adhärenz und Konfluenz (50-70%) wurden unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und das Medium, sowie nicht-adherente Zellen (*floaters*), abgesaugt. Im Anschluss wurden 10 ml vorgewärmtes modifiziertes SF900 II Medium dazu pipettiert und die Zellen bei  $27^\circ\text{C}$  kultiviert. Im Falle von T25-Flaschen ( $25 \text{ cm}^2$  Wachstumsfläche) wurden  $4 \times 10^6$  Zellen in 3-5 ml Medium ausgesät.

### 2.4.7 Schüttelkultur von Sf9-Zellen

Sf9-Zellen wurden in modifiziertem SF900 II Medium für Monolayerkulturen, sowie für die Proteinexpression in Schüttelkultur gezüchtet. Stammkulturen wurden zu 50, 100, 250 oder 500 ml und einer Zelldichte von  $0,5-4 \times 10^6$  Zellen/ml bei  $27^\circ\text{C}$  im Schüttler kultiviert und bei Bedarf passagiert (verdünnt auf  $0,5-1 \times 10^6$  Zellen/ml). Es musste zu jeder Zeit eine stationäre Phase von etwa  $5-6 \times 10^6$  Zellen/ml vermieden werden. Expressionen (100, 250 und 500 ml) wurden bei Zelldichten von ca.  $1,8-2 \times 10^6$  Zellen/ml durchgeführt. Die Zelldichte der Schüttelkulturen wurde täglich bestimmt. Dazu wurden Sf9-Zellen 10 min mit Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 inkubiert und anschließend die Zahl der toten und lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

### 2.4.8 Transfektion von Sf9-Zellen

Die Transfektion von Sf9-Zellen erfolgte nach dem *Baculo Gold Transfection-Protocol* (BD Pharmingen). Dabei wurden  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in 60 mm Kulturschalen ausgesät und mit 2 µg der zuvor isolierten Bacmid-DNA (2.2.9) mittels Calciumphosphat transfiziert. Nach 4 h wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch 3 ml frisches modifiziertes SF900 II Medium ersetzt. Die Kulturschalen wurden 5-7 Tage bei 27°C inkubiert und anschließend wurde der Überstand mit dem rekombinanten Virus abgesaugt, 10 min bei 1500x g zentrifugiert, um Zellreste und floater zu entfernen, und bei 4°C gelagert. Im Folgenden werden die Initialvirus-stocks als P0 bezeichnet; nachfolgende amplifizierte Virus-stocks (2.1.9) dementsprechend als P1, P2, usw. Als Negativ-Kontrolle diente eine Kultur, die mit denselben Transfektionspuffern, jedoch nicht mit Bacmid-DNA behandelt wurde.

### 2.4.9 Virusamplifikation in Sf9-Zellen

1 ml P0 Virus-stock hat für gewöhnlich einen Titer von etwa  $1 \times 10^7$  pfu (plaque forming units) /ml. Der rekombinante Virus wurde 3 mal amplifiziert, bevor er zur Infektion von Zellen im großen Maßstab verwendet wurde. Dabei wurden 10 ml P1 durch Infektion von  $1,2 \times 10^7$  in T75-Flaschen mit 2 ml P0-Virus erhalten, die P2 durch Infektion von 50 ml  $1,8 \times 10^6$  Zellen/ml mit 6 ml P2 und die P3 durch Infektion von 500 ml  $2 \times 10^6$  Zellen/ml mit 35 ml P2. Alle Amplifikationen wurden durchschnittlich 5 Tage bei 27°C durchgeführt (die genaue Zeitdauer richtete sich nach der Anzahl toter Zellen, welche bei mindestens 85-90% liegen sollte).

### 2.4.10 Infektion von Sf9-Zellen zur Protein-Expression

500 ml Schüttelkulturen wurden bei 27°C in modifiziertem SF900 II Medium in Fernbach-Kolben zu einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert und mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 3 (pro Konstrukt) mit P3 Virus infiziert. Die Kultivierung erfolgte 48-72 h bei 27°C bis zu einer Totenrate von maximal 30% der Zellen. Die Zellen wurden im Anschluss 10 min bei 1.500x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 10 ml bzw. 25 ml PBS gewaschen und bei -20°C gelagert.

### 2.4.11 Bestimmung des Virus-Titers mittels Plaque-Assay

Sf9-Zellen wurden in 35 mm 6-well-Platten ( $1,2 \times 10^6$  Zellen pro well) ausgesät und 2 h bei 27°C inkubiert. Vom P3 Virus-stock wurden mit nicht-modifiziertem Sf900 II Medium Verdünnungen von  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$  hergestellt. Daraufhin wurde das Kulturmedium der Zellen abgesaugt und durch 1 ml der jeweiligen verdünnten P3-Lösung ersetzt. Die Zellen wurden danach 1 h bei 27°C inkubiert und im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt; die Zellen wurden dann mit jeweils 3 ml Baculovirus-Agarose (1% in 100 ml modifiziertem SF900 II Medium ohne Pluronic) pro well überschichtet. Die Zellen wurden 5 Tage bei 27°C inkubiert. Das Anfärben der *Plaques* erfolgte 1 h bei 27°C mit 0,1%iger Neutral-Rot-Lösung in PBS (0,5 ml pro well). Danach wurde die Färbelösung abgenommen und die *Virus-plaques* am nächsten Tag gezählt. Jeder *Plaque* ist durch Infektion einer Zelle mit einem einzelnen Baculovirus-Partikel entstanden. Somit kann die Anzahl aller Viren eines P3-stocks und damit der Titer bestimmt werden:

$$\boxed{pfu/ml = (Anzahl\ der\ Plaques) \times (Verdünnung^{-1})}$$

## 2.5 Spezielle zellbiologische Methoden

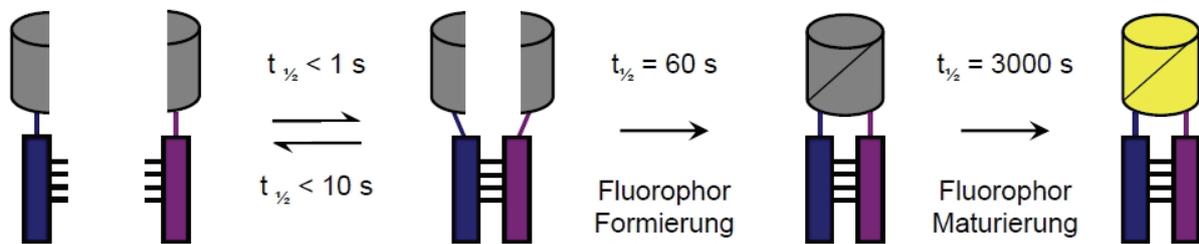
### 2.5.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie dient der dreidimensionalen Darstellung von Objekten. Es können Schnitte durch ein Präparat erhalten werden, welche anschließend in einem Computer zu dreidimensionalen Modellen zusammengesetzt werden können. In dieser Arbeit wurde das Konfokale Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510-META von Zeiss verwendet. Die Deckgläschen mit den transfizierten HeLa Zellen wurden nach der Inkubation (2.4.1) aus den *wells* der *6well* Platten entnommen und in eine spezifische Klemmvorrichtung des Mikroskops eingespannt. Mit Hilfe eines Dioden-Lasers ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ , für DAPI) und eines Argon-Ionen-Lasers ( $\lambda = 514 \text{ nm}$ , für YFP) wurde das Präparat entsprechend angeregt. Das dem Brennpunkt entstammende Licht wurde mit Hilfe von Sperrfiltern getrennt (420-480 nm, für DAPI sowie 530-600 nm für YFP).

### 2.5.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Das Prinzip beruht auf der Komplementation zweier Fragmente des Gelb-Fluoreszierenden Proteins YFP (*yellow fluorescent protein*). Das YFP (238 Aminosäuren) ist eine modifizierte Form des *green fluorescent protein* (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Das Protein bildet eine zylindrische Struktur aus 11  $\beta$ -Faltblättern mit einer zentralen  $\alpha$ -Helix. Das eigentliche Fluorophor des GFP bildet sich autokatalytisch aus der Tripeptidsequenz Ser<sub>65</sub>-Tyr<sub>66</sub>-Gly<sub>67</sub>. Die fluorophore Gruppe unterbricht die  $\alpha$ -Helixstruktur im geometrischen Zentrum des Proteins. Für das BiFC-System wurde der Zylinder des YFP auf genetischer Ebene geteilt. Das N-terminale Fragment wurde als YN (N-terminale Hälfte des YFP) und das C-terminale Fragment als YC (C-terminale Hälfte des YFP) bezeichnet. Beide Domänen zeigen allein exprimiert keine messbare Fluoreszenz. Werden diese Fragmente jedoch mit anderen Proteinen fusioniert, die miteinander wechselwirken, können die beiden YFP-Fragmente interagieren und zu einem funktionsfähigen Fluorophor reifen. Das System wurde im Labor von Prof. Kerppola etabliert, wobei die Transkriptionsfaktoren bFos und bJun als Modellproteine dienten (Hu et al, 2002; Hu & Kerppola, 2003). Nach der Interaktion der fusionierten Proteine bildet sich das

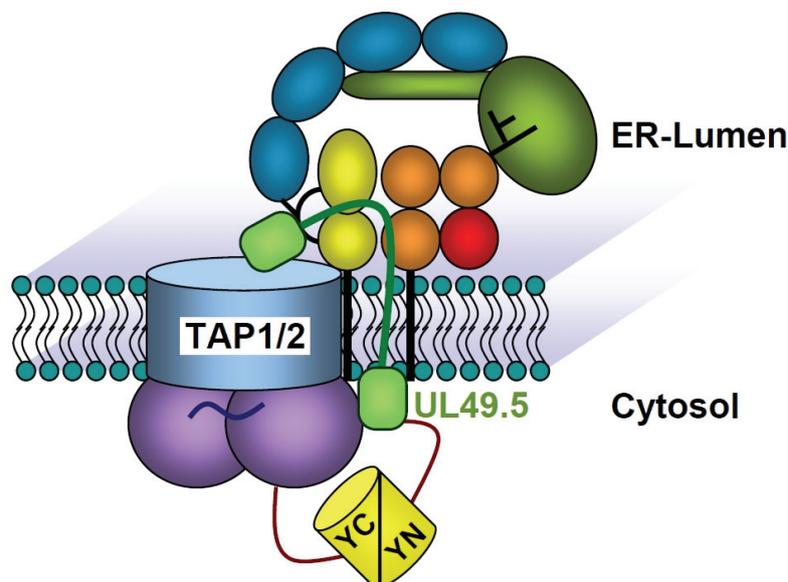
Fluorophor relativ schnell. Danach folgt ein langsamerer Schritt der Fluorophor-Reifung, in dem die gelbe Fluoreszenz wiederhergestellt wird (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11. Schema des BiFC am Beispiel von bFos und bJun**

Die zwei Hälften des YFP wurden jeweils an die N-Termini der beiden Transkriptionsfaktoren bFos und bJun fusioniert. Nach einer schneller Interaktion von Fos und Jun, folgt eine langsame Formierung des Fluorophors und eine viel langsamere Maturierung des Fluorophors (modifiziert nach Hu et al, 2002).

In dieser Arbeit wurden verschiedene virale Fusionsproteine hergestellt, die mit YN über einen Glycin-Serin-Linker (GSGGSGGS) verbunden waren. Diese wurden mit dem Fusionsprotein YC-TAP1 (YC-Glycin-Serin-Liker-TAP1) auf BiFC getestet. Hierfür wurde der YC-Teil des YFP an den N-Terminus von TAP1 und der YN-Teil des YFP an den C-Terminus des UL49.5-Proteins fusioniert (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12. Schema des BiFC von TAP und UL49.5**

Das YC-Fragment des YFP wurde an den N-Terminus von TAP1 fusioniert und das YN-Fragment wurde an den C-Terminus von UL49.5 fusioniert.

Bei erfolgreicher Interaktion der zwei Proteine, kommen die zwei YFP-Hälften im Zytosol zusammen und die gelbe Fluoreszenz ist in einem ER-Kompartiment zu detektieren. HeLa Zellen wurden mit jeweils 0,5 µg der entsprechenden Plasmide transfiziert (siehe Kapitel 2.4.4) und nach 48 Stunden durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet.

### 2.5.3 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzmethode wird oft angewendet, wenn Proteine in einer Zelle mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden sollen. Bei der indirekten Immunfluoreszenz, die im folgenden beschrieben wird, bindet ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen, welches durch einen zweiten, fluoreszenz-konjugierten Sekundärantikörper, der gegen den ersten gerichtet ist, lokalisiert wird. Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und für 24 h kultiviert, bis sie etwa 50-80% konfluent waren. Bei der Immunfluoreszenzfärbung müssen die Zellen fixiert und gefärbt werden: Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS (37°C) gewaschen. In jedes *well* wurden 1 ml 2% PFA (in PBS, pH 7,0) gegeben und die Zellen 12 min bei RT fixiert. Das PFA wurde abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden daraufhin auf mit Parafilm bedeckte Petrischalen überführt. Die Zellmembran wurde im Anschluß mit 100 µl 0,1% Triton X-100 (in PBS) für 20 min permeabilisiert. Während der Inkubationen wurden die Petrischalen geschlossen, um ein Verdunsten der geringen Flüssigkeitsmengen zu verhindern. Danach wurde das Triton entfernt und die Zellen mit 100 µl 5% BSA (in PBS) für mindestens 30 min inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Die BSA-Lösung wurde entfernt und die Zellen mit dem Primärantikörper (60 µl) für 30 min inkubiert (siehe Tabelle 21). Nicht gebundene Antikörper wurden dreimal mit PBS herausgewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser mit dem fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper für 30 min überschichtet (im Dunkeln). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Mounting-Medium eingedeckt, wobei ein Tropfen Mounting-Medium auf einen Objektträger getropft und das Deckglas luftblasenfrei mit den Zellen nach unten aufgelegt wurde. Nach etwa 20 min wurden die Deckgläser mit Nagellack umrandet. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

**Tabelle 21. Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenz.**

Alle Antikörper wurden in 1% BSA mit 0,02% Natriumazid verdünnt.

Primär-Antikörper	Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Verdünnung
anti-Calnexin	1:500	Cy3 donkey anti- <i>rabbit</i> IgG	1:400

### 2.5.4 Durchflusszytometrie (FACS)

FACS steht für *fluorescence activated cell sorting* und ist eine spezielle Art der Durchflusszytometrie. Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Das besondere an der FACS Methode ist, dass sie eine heterogene Mischung von Zellen in zwei oder mehr Populationen physikalisch sortieren kann. Dafür wird jede einzelne Zelle auf ihre spezifischen Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht. Bei dieser Art der Durchflusszytometrie befindet sich im Gerät ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit, in welche die zu messende Zellsuspension eingebracht wird. Durch die höhere Geschwindigkeit der Trägerflüssigkeit vereinzeln sich die Zellen und werden auf diese Weise an einem Detektor mit Lasereinheit vorbeigeführt. Die Zellen emittieren dabei Streulicht und Fluoreszenzimpulse (wenn die Zelle mit entsprechenden Antikörpern markiert wurde oder Fluoreszenzproteine exprimiert), wodurch die Zelle aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften, aber auch nach morphologischen Zellparametern unterschieden werden kann. Die Vorwärtsstreuung (FSC = *forward scatter*) wird von der Größe der Zelle, die Seitwärtsstreuung (SSC = *side scatter*) von der Granularität der Zelle bestimmt. Die Signale werden mittels Photomultiplier verstärkt, von Detektoren gemessen und zur Auswertung auf einen Computer übertragen. Werden die Zellen nicht nur analysiert, sondern auch sortiert, werden einzelne Tropfen, die eine Zelle beinhalten je nach der analysierten Eigenschaft der Zelle mit einer elektrostatischen Ladung versehen. Die geladenen Tropfen werden durch elektrostatische aufgeladene Platten abgelenkt und sortiert.

Für die Messung der Zellen am FACS-Gerät wurden diese 48 h zuvor transient mit pIRES-EGFP Konstrukten transfiziert und am Tag der Messung mit Antikörpern

gegen MHC I-Moleküle markiert. Die Zellen wurden für die Antikörper-Markierung mittels Trypsin abgelöst, abzentrifugiert (3 min, 1200 rpm, 4°C) und 1x mit FACS-Puffer gewaschen. Untransfizierte Proben wurden in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und auf Eis gestellt. Transfizierte Proben wurden mit je 100 µl BSA für 10 min auf Eis inkubiert, 2x mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit 100 µl anti-human HLA-ABC Antikörper (1:5 in FACS-Puffer) für 15 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Zum Schluß wurden die Proben nochmals 2x mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend für die Messung in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen.

Die Durchflusszytometrie erfolgte an einem BD FACSAria Cell-Sorting System mit der BDFACSDiVa Software. Zunächst wurde mit der ungefärbten *gate*-Probe die Population gesucht und die Kanäle für FSC und SSC über die Spannung so eingestellt, dass im *dot plot* eine definierte Population erschien. Die Kanäle für FITC und PE wurden ebenfalls über die Spannung so verändert, dass das Peakmaximum im Histogramm für den jeweiligen Kanal bei  $10^2$  lag. Anschließend wurden die Kanäle für FITC und PE mit den entsprechenden Proben kompensiert. Nach diesen Voreinstellungen konnten die Proben gemessen werden. Für eine Messung wurden 30.000 Zellen analysiert. Die Daten wurden mit Flow Jo 7.2.2 (Tree Star) analysiert.

## 2.6 Proteinbiochemische Methoden

### 2.6.1 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli dient der elektrophoretischen Trennung denaturierter Proteine. Zur Denaturierung wird das anionische Tensid SDS verwendet, welches sich infolge hydrophober Wechselwirkungen an Proteine und Peptide in einem Verhältnis von ungefähr 1,4:1 anlagert. Dabei werden Sekundär- und Tertiärstrukturen fast vollständig aufgebrochen, wodurch langkettige Partikel mit nahezu konstant negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Eine weitere Entfaltung der Proteine wird durch reduktive Spaltung intra- und intermolekularer Disulfidbrücken mit  $\beta$ -Mercaptoethanol und DTT erreicht. Durch die gleichförmige Gestalt der SDS-beladenen Proteine und ihrer der Masse proportionalen Ladung erhält man Partikel mit theoretisch gleicher elektrophoretischer Beweglichkeit, welche in der SDS-PAGE durch Überlagerung mit Molsiebeeckeffekten durch den makroporösen Träger Polyacrylamid aufgehoben wird, was eine Auftrennung der Proteine nach ihrem spezifischen Molekulargewicht ermöglicht. Die SDS-Gele wurden nach Tabelle 22 angesetzt.

**Tabelle 22. Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele nach Laemmli (2 Gele)**

	10% Trenngel	12% Trenngel	5% Sammelgel
Acrylamid (30% v/v)	3,1 ml	5,3 ml	0,65 ml
Trenngel-Puffer	3,95 ml	3,3 ml	-
Sammelgel-Puffer	-	-	1,1 ml
H <sub>2</sub> O	3,95 ml	3,3 ml	2,7 ml
APS (10%)	40 $\mu$ l	40 $\mu$ l	30 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l

Die Proteinproben wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung 20 min lang bei 65°C in Probenpuffer denaturiert. Die Vorbereitung ganzer Zellen zur Elektrophorese erfolgte auf die gleiche Art und Weise, jedoch wurden die Zellen zuvor eingefroren (-20°C oder N<sub>2</sub>) und anschließend 5 min bei 95°C erhitzt („*rapid freeze and thaw*“ zum besseren Zellaufschluss), bevor sie mittels Probenpuffer denaturiert wurden. Teilweise wurden die Zellen nach dem Zellaufschluss mittels „*rapid freeze and thaw*“ mit 50  $\mu$ g/ $\mu$ l DNase I (1 h, 37°C) vorinkubiert.

## 2.6.2 Immunoblot (semi-dry)

Western-Blotting ist eine hoch sensible Methode zum Nachweis kleinster Proteinmengen (<10 ng). Dabei werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (2.6.1) mit dem semi-dry-Verfahren nach Kyhse-Anderson in einem elektrischen Feld aus einer Acrylamidgel-Matrix auf Nitrocellulosemembranen übertragen und dort gleichzeitig immobilisiert. Der Nachweis der Proteine erfolgt immunchemisch über eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion. Für den Transfer der Proteine wurden alle Filter und Membranen in Transferpuffer getränkt. Von unten nach oben wurden eine Lage Filterpapier, die Nitrocellulosemembran (NC-Membran), das Acrylamidgel und eine weitere Lage Filterpapier aufeinandergeschichtet und zwischen die Elektroden der semi-dry-Blot-Apparatur (Biorad) gelegt. Der Blot-Vorgang wurde 1 h bei 1 mA/cm<sup>2</sup> Gel durchgeführt. Um die Effizienz des Transfers zu bestimmen wurde die NC-Membran zum einen auf die Übertragung der gefärbten Markerspuren hin begutachtet und zum anderen 3 min mit Ponceau S-Lösung inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde mit H<sub>2</sub>O entfernt. Für den immunchemischen Nachweis der Proteine wurde die Membran 30 min bei RT oder über Nacht bei 4°C mit Blockpuffer behandelt, um später unspezifische Wechselwirkungen der Antikörper mit der Membran zu unterbinden. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Erst-Antikörper inkubiert (siehe Tabelle 23). Die Membran wurde drei mal mit TBS-T gewaschen und daraufhin mit dem Zweit-Antikörper, welcher mit HRP (horseradish peroxidase) konjugiert ist, für 1-2 h bei RT inkubiert (siehe Tabelle 23). Die Membran wurde erneut 3-fach mit TBS-T gewaschen und anschließend 30 s mit 5 ml ECL1-Puffer, gefolgt von 5 ml ECL2-Puffer inkubiert. Die Proteine wurden durch ihr Chemilumineszenz-Signal mittels eines Lumi-Imagers (Roche) detektiert.

### Tabelle 23. Verwendete Antikörper für Immunoblots.

Alle Antikörper wurden in TBS-T, 2% Milchpulver verdünnt.

Primär-Antikörper	Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Verdünnung
anti-Tap1 (148.3)	1:5	anti-mouse	1:20000
anti-Tap2 (435.3)	1:5	anti-mouse	1:20000
anti-Tap1 (1P2)	1:10000	anti-rabbit	1:20000
anti-Tapasin (7F6)	1:20	anti-rat	1:20000
anti-UL49.5 <sub>N</sub> (H11)	1:500	anti-rabbit	1:20000
anti-UL49.5 <sub>C</sub> (H19)	1:500	anti-rabbit	1:20000

## **2.7 Spezielle proteinbiochemische Methoden**

### **2.7.1 Präparation von Sf9-Mikrosomen**

Zur Präparation von Mikrosomen wurden Sf9-Zellpellets mit dem dreifachen Volumen Cavitation II-Puffer, sowie 1% Pi-Mix auf Eis aufgetaut und anschließend mit einem Glashomogenisator aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde 4 min bei 200x g und danach 8 min bei 700x g zentrifugiert, um nicht-aufgeschlossene Zellen und Zellkerne abzutrennen, und der Überstand mit dem 3,08-fachen Volumen 2,7 M Sucroslösung versetzt. Im Anschluss wurde in Zentrifugenbechern ein Sucrose-gradient hergestellt, wobei die mit Sucrose-versetzte Zellsuspension mit jeweils 5 ml 1,8 M Sucroslösung und 0,4 M Sucroslösung überschichtet wurde. Der Sucrose-gradient wurde in einem *Swing-out*-Rotor 14 h bei 100.000x g und 4°C zentrifugiert und anschließend wurden die Mikrosomen gesammelt, die sich zwischen der 1,8 M/0,4 M Schichtgrenze befanden. Die Mikrosomen wurden mit dem gleichen Volumen PBS versetzt und 30 min bei 160.000x g zentrifugiert. Schließlich wurde das Mikrosomenpellet in 2 ml PBS resuspendiert, die Gesamtprotein-Konzentration ermittelt und die Mikrosomen mit PBS auf eine Endkonzentration von 5 mg Gesamtprotein/ml verdünnt. Die Membranen wurden zu 100 µl aliquotiert, in N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### **2.7.2 Transportassay mit semi-permeabilisierten Zellen**

Mit Hilfe des Transportassays kann der Einfluss von Peptiden oder Proteinen auf den TAP-spezifischen Peptidtransport untersucht werden. Dazu werden Zellen semipermeabilisiert und das fluoreszenz-markierte Peptid (RRYQNSTCL) in die Zellen eingebracht. Findet ein ATP-getriebener Transport durch TAP ins ER statt, so werden die transportierten Fluoreszenz-Peptide an ihrer Glykosylierungssequenz (NXT/S) N-glykosyliert. Die Zellen werden daraufhin lysiert, glykosylierte Peptide an Concanavalin A Sepharose gebunden und dort von nicht-gebundenen Peptiden getrennt. Die Rest-Menge an Fluoreszenz wird bestimmt und mit dem Signal von nicht-ATP-getriebenem Transport, bzw. Diffusion verglichen.

Für den Transportassay wurden die Zellen einer T75-Kultur ( $1,2 \times 10^7$  Zellen), die mit den jeweiligen Konstrukten infiziert und kultiviert wurden, durch Abklopfen geerntet,

die Anzahl toter und lebender Zellen bestimmt und die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen bei 1.000x g abzentrifugiert und in 300 µl eiskaltem PBS-Puffer resuspendiert. Zum Permeabilisieren der Zellmembran wurden 3 µl 5%iges Saponin zugegeben, die Zellen vorsichtig gemischt und 1 min bei 32°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde mit 1 ml eiskaltem PBS-Puffer aufgefüllt, die Zellen schonend 2 min bei 1.500x g abzentrifugiert und erneut mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden dann in 300 µl PBS resuspendiert und zu 50 µl aliquotiert. Drei der Aliquots wurden mit jeweils 1 µl Apyrase (1 U/µl) 1 min bei 32°C inkubiert und anschließend mit 20 µl NSTCL-Peptid (2,3 µM), 27 µl PBS-Puffer und 2 µl MgCl<sub>2</sub> (1 M) gemischt (Negativ-Proben). Die drei verbleibenden Aliquots wurden mit 20 µl NSTCL-Peptid (2,3 µM), 24,7 µl PBS-Puffer, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (1 M) und 3,3 µl ATP (300 mM) gemischt (Positiv-Proben). Alle Aliquots wurden 3 min bei 32°C inkubiert, danach mit 1 ml eiskaltem Stop-Puffer aufgefüllt und schonend bei 1.500x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml Lyse-Puffer resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde erneut bei 1.500x g abzentrifugiert und der Überstand mit jeweils 60 µl Concanavalin A Sepharose versetzt und 2 h im Schüttler bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde im Anschluss zweimal mit 1 ml Lysepuffer gewaschen und gebundene Peptide 30 min bei RT mit 300 µl Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid (200 mM) eluiert. Die Menge an Fluoreszenz-Peptid wurde in einem ELISA-Reader detektiert. Die Messung wurde mit Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid (200 mM) geeicht.

### **2.7.3 Transportassay mit Sf9-Mikrosomen**

Der Peptidtransport von fluoreszenz-markiertem Peptid durch TAP kann auch mit Mikrosomen untersucht werden, da die Mikrosomen im Innern dem ER-Lumen ähneln. Hierbei ist eine Vorbehandlung mit Saponin nicht nötig, da die Zellmembran nicht mehr vorhanden ist. Der Assay wird analog zum Transportassay mit semipermeabilisierten Zellen durchgeführt (2.7.2).

### **2.7.4 Coimmunpräzipitation**

Die Coimmunpräzipitation (Co-IP) wird zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner in Proteinkomplexen verwendet. Für die Co-IP wurden 100 µl Membranen mit 900 µl kaltem IP-Lyse-Puffer und Digitonin (Endkonzentration 1%) versetzt und 1 h

bei 4°C im Überkopfschüttler solubilisiert. Währenddessen wurden pro Co-IP Ansatz 50 µl 50%iger (v/v) Protein G-*Magnetobeads* (beladen mit *goat anti-mouse* Antikörper), zweifach mit kaltem IP-Lyse-Puffer gewaschen, in Lysepuffer mit dem jeweiligen Antikörper (für Serum-Antikörper bzw. Hybridomüberstände 500 µl, für aufgereinigte Antikörper etwa 10 µg) 1 h im Schüttler bei 4°C inkubiert und daraufhin erneut zweifach mit kaltem IP-Lyse-Puffer gewaschen. Die mit dem jeweiligen Antikörper beladenen Protein G-*beads* wurden in 500 µl Lysepuffer mit 0,1% Digitonin resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt. Die Membran-Suspension wurde dann 20 min bei 50.000x g zentrifugiert, um unlösliches Material abzutrennen und der Überstand mit den vorbehandelten *Magnetobeads* gemischt und bei 4°C 2 h im Überkopfschüttler inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Protein G Matrix dreifach mit IP-Wasch-Puffer gewaschen und die *beads* in 50 µl SDS-Probenpuffer eluiert. Die Proben wurden mittels Immunoblotting analysiert.

## **2.8 *In vitro* Translation und Degradation**

Für alle *in vitro* Transkriptionen und Translationen ist es sehr wichtig, dass RNase-frei gearbeitet wird. Hierfür wurden alle Puffer mit RNase-freien Chemikalien und RNase-freiem Wasser angesetzt und anschließend durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert. Sowohl zum Ansetzen der Puffer als auch für die Durchführung der Reaktionen wurden RNase-freie Reaktionsgefäße eingesetzt. Da an den Händen eine große Menge RNAsen vorzufinden sind, ist es äußerst wichtig, dass alle Arbeitsutensilien wie Pipetten und Reaktionsgefäße und auch der gesamte Arbeitsplatz nur mit Handschuhen benutzt wird. Eine mögliche Kontamination mit RNAsen führt zur Degradation der synthetisierten mRNA und es sind keine Translationsreaktionen mehr möglich.

### **2.8.1 Zellfreie Transkription von mRNA**

Mit Hilfe der *in vitro* Transkription können RNA-Transkripte hergestellt werden, ausgehend von einer DNA, die hinter einen SP6 Promotor kloniert wurde. SP6 ist ein *Salmonella* Phage, dessen Promotor eine hohe Aktivität *in vitro* aufweist. Dieser Promotor wurde kloniert und da die entsprechende Polymerase kommerziell zu erwerben ist, handelt es sich um eine effiziente Methode, um synthetische mRNAs herzustellen. Für eine anschließende Translation wird die mRNA in Anwesenheit von

*gecappten* Nucleotiden transkribiert, so dass *gecappte* Transkripte entstehen, die eine höhere Effizienz für die Translation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erlauben. Als Ausgangs-DNA wird linearisierte Plasmid-DNA verwendet, da bei linearisierter DNA die Transkriptionseffizienz erhöht ist.

Die Transkription erfolgte in einem Volumen von 10–50 µl für 1 h bei 40°C. Die Transkripte können bei -80°C für einige Zeit gelagert werden. Die Zusammensetzung des Reaktionsmix ist in Tabelle 24 dargestellt.

**Tabelle 24. Reaktionsmix für *in vitro* Transkription (10 µl Endvolumen)**

Reaktionsmix	
CB Puffer (5x)	2 µl
0,1 M DTT	1 µl
NTP-Mix (10x)	1 µl
GpppG CAP (10x)	1 µl
SP6-Polymerase (10U/µl)	0,4 µl
RNAse-Inhibitor (10U/µl)	0,4 µl
Wasser	2,2 µl
Linearisierte Plasmid-DNA (1µg/µl)	2 µl

### 2.8.2 Zellfreie Translation von Proteinen

Zellfreie Systeme zur *in vitro* Translation von Proteinen wurden sowohl für prokaryotische als auch für mehrere eukaryotische Systeme etabliert. Bei eukaryotischen Systemen haben sich das Kaninchen-Reticulozyten-Lysat (RRL, *rabbit reticulocyte lysate*) und das Weizenkeim-Extrakt durchgesetzt. Beide Extrakte beinhalten alle Komponenten, die für die *in vitro* Translation ausgehend von *in vitro* synthetisierter mRNA nötig sind.

Die Translationsreaktion ist an die Transkription gekoppelt, so dass die *in vitro* hergestellte mRNA nicht ein weiteres Mal aufgereinigt wird. Die Zusammensetzung der Puffer für die Translation ist darauf abgestimmt, dass 20% der Translationsreaktion aus dem Transkript bestehen. Die Translation wird bei kleinen Proteinen für 1 h bei 24°C durchgeführt. Für größere Proteine (TAP1 und TAP2) wird die Inkubationszeit auf 90 min erhöht. Der Reaktionsmix für *in vitro* Translation ist in Tabelle 25 zusammengefasst.

**Tabelle 25. Reaktionsmix für *in vitro* Translation (10 µl Endvolumen)**

Reaktionsmix	
CB Puffer (20x)	0,5 µl
E-Mix	2 µl
RRL	4 µl
tRNA (10 mg/ml) aus Kalbsleber	0,1 µl
Creatin Kinase (4 mg/ml)	0,1 µl
RNAse-Inhibitor (10U/µl)	0,1 µl
Wasser	0,8 µl
Membranen (OD=70)	0,4 µl
Transkript	2 µl

Zur Analyse der translatierten Proteine wurde ein Teil des Translation-Reaktionsgemisches direkt auf ein SDS oder Tricin-SDS-Gel aufgetragen und anschließend analysiert. Wenn die Proteinproben für Coimmunpräzipitation oder Degradationsassays weiterverwendet wurden, wurden die Membranen zunächst vom Reaktionsgemisch getrennt. Besonders das im RRL enthaltene Globin führt sonst zu veränderten Laufeigenschaften bei der SDS-PAGE. Für das Abtrennen der Membranen wurde das Reaktionsgemisch auf einen 0,5 M Sucrosepuffer aufgetragen, in dem alle anderen Reagenzien aufgehalten werden. Daraufhin wurde das Membran-Pellet direkt in SDS-Ladepuffer aufgenommen, wenn die Membranen sofort mittels SDS-PAGE analysiert wurden, oder in 0,1 M Sucrose aufgenommen, wenn Co-IPs oder Degradationsversuche mit den Membranen durchgeführt wurden.

### 2.8.3 *In vitro* Degradation

Um die proteasomale Degradation *in vitro* verfolgen zu können, wurden die Membranen nach der *in vitro* Translation auf einem 0,5 M Sucrosepuffer abzentrifugiert (70.000 rpm, 10 min, 4°C), um sie von dem RRL abzutrennen. Um das Reaktionsgemisch der *in vitro* Translation vollständig von den Membranen zu trennen, wurden diese zweimal mit 0,1 M Sucrosepuffer gewaschen. Um die Membranen für einen Degradations-versuch einzusetzen, wurden mindestens 40 µl Translationsreaktion eingesetzt. Aufgrund der geringen Membranmenge in der Translationsreaktion ist diese Menge nötig, da es sonst nicht möglich ist, die geringe Menge an Membranen effizient zu resuspendieren. Nach der Zentrifugation wurden

die Membranen in 20 µl 0,1 M Sucrosepuffer aufgenommen und für die Degradationsanalyse eingesetzt. Die Zusammensetzung der Proben für die Degradation ist in Tabelle 26 dargestellt.

**Tabelle 26. Reaktionsmix für *in vitro* Degradation (100 µl Endvolumen)**

Reaktionsmix	
Degradationspuffer (10x)	10 µl
RRL#10 (unbehandelt)	72 µl
Membranen in 0,1 M Sucrosepuffer	20 µl
Creatin-Kinase (4 mg/ml)	2 µl

Die Degradationsreaktion wurde für 4 h bei 37°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden jeweils 3 µl von der Reaktion abgenommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Alternativ zu RRL#10 wurde die Degradationsanalyse mit Zell-Lysat aus Raji-Zellen durchgeführt. Das Raji-Lysat wurde hierfür immer frisch präpariert, um eine gute Qualität des Lysates zu gewährleisten. Für die Präparation wurden  $2 \times 10^6$  Raji-Zellen geerntet und mit PBS gewaschen und in 100 µl HEPES-Puffer aufgenommen. Daraufhin wurden die Zellen auf Eis mittels einer 5 ml Spritze mit einer dünnen Kanüle 30 mal hoch- und runterpipettiert, um die Zellen mechanisch aufzubrechen. Danach wurden die Zellen für 20 min bei 100.000x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand nach der Zentrifugation entsprach dem Raji-Lysat und wurde für die Degradationsanalyse analog zu RRL#10 eingesetzt. Aufgrund der geringen Menge des Raji-Lysates wurde das Gesamtvolumen für den Reaktionsmix auf 40 µl reduziert.

## 3 Ergebnisse

### ***3.1 Interaktionsstudien von UL49.5 mit dem TAP-Komplex in Insektenzellen***

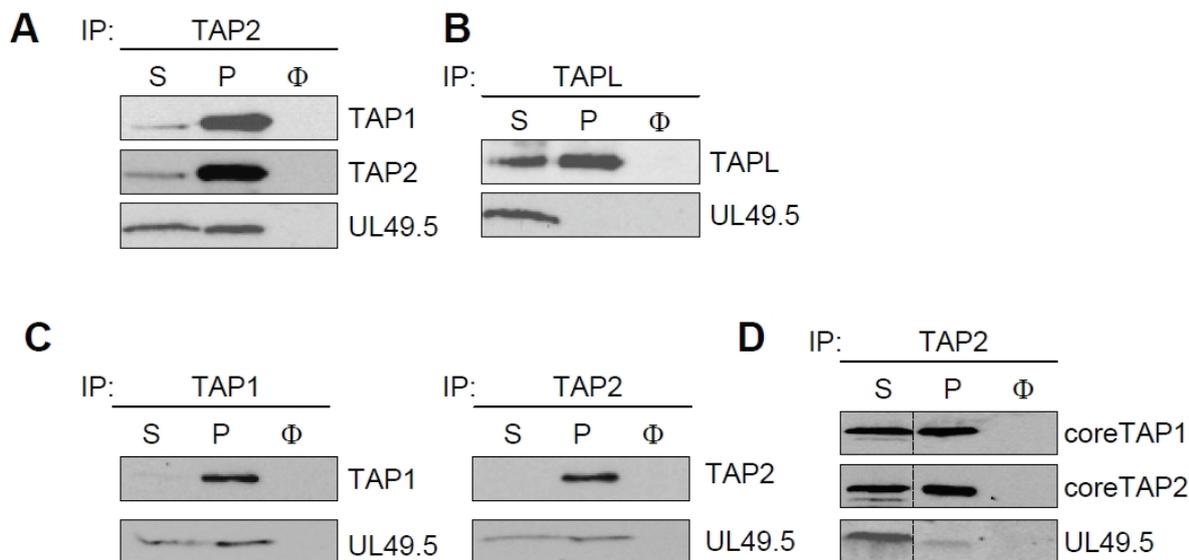
Das virale Genprodukt UL49.5 des Bovinen Herpesvirus-1 (BHV-1) ist in der Lage, in humanen Melanom Zellen (MeJuSo), mit TAP zu interagieren. Die Interaktion führt zur Inhibition des Peptidtransportes und zusätzlich zur proteasomalen Degradation von TAP und anderen Komponenten des PLC. Die ER-luminale Domäne und die Transmembrandomäne vermitteln die Inhibition des TAP-spezifischen Peptid-transportes. Der C-Terminus von UL49.5 ist für die Degradation essenziell (Koppers-Lalic et al, 2005). Der genaue Inhibitionsmechanismus von UL49.5 ist jedoch nicht bekannt. Des Weiteren konnten keine spezifischen Interaktionspartner von UL49.5 innerhalb des PLC identifiziert werden.

Um den molekularen Mechanismus der Inhibition des TAP-Transportkomplexes durch UL49.5 aufzuklären, wurden Proteine des PLC und UL49.5 heterolog in Insektenzellen (Sf9-Zellen) exprimiert. Sf9-Zellen eignen sich für Interaktions- und Funktionsstudien zwischen UL49.5 und Komponenten des PLC, da diese Zellen nicht für UL49.5 kodieren und endogen keine Komponenten des PLC besitzen. Somit kann man gezielt einzelne Komponenten des PLC zusammen mit UL49.5, in Abwesenheit weiterer Faktoren des humanen Immunsystems exprimieren und die Interaktion der Proteine untersuchen. Darüber hinaus sind Insektenzellen in der Lage, große Proteinmengen zu exprimieren und korrekt zu modifizieren, so dass verschiedene funktionelle Untersuchungen mit TAP durchgeführt werden können.

#### **3.1.1 Interaktion von UL49.5 mit dem Peptid-Beladungs-Komplex**

Um Bindungsstellen für UL49.5 innerhalb des PLC zu identifizieren, wurde UL49.5 zusammen mit einzelnen Komponenten des PLC in Sf9-Zellen exprimiert. Insektenzellen wurden bei einer Zelldichte von  $2,0 \times 10^6$  Zellen/ml mit Baculoviren, die für die entsprechenden Proteine (TAP1, TAP2, TSN, UL49.5) kodieren, infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, und die Mikrosomen wurden aufgearbeitet (siehe 2.7.1). Mit Hilfe des TAP2-spezifischen monoklonalen Antikörpers 435.3 wurde der PLC aus Insektenzell-Mikrosomen nach Solubilisierung mit Digitonin

coimmunpräzipitiert und danach mittels Westernblot immunochemisch mit Hilfe spezifischer Antikörper analysiert. Als Kontrolle für die Spezifität dieser Interaktionen wurde UL49.5 zusätzlich mit TAPL coexprimiert, das eine ~ 40%ige Sequenzidentität zu TAP1 und TAP2 aufweist (Demirel et al, 2007). Interessanterweise konnte UL49.5 nicht mit TAPL copräzipitiert werden, was beweist, dass die Interaktionen mit dem TAP-Komplex spezifisch sind.

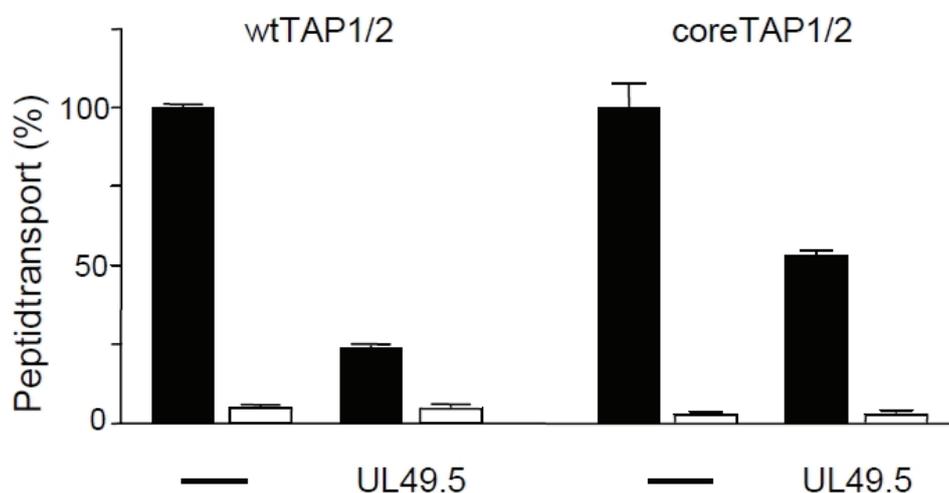


### Abbildung 13. Interaktionsstudien zwischen UL49.5 und dem PLC in Insektenzellen

Solubilisierte *Sf9*-Mikrosomen mit den Proteinen TAP1, TAP2 und UL49.5 wurden mit TAP2 spezifischen mAb435.3 bzw. mit Myc-spezifischen Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Magnetobeads gewaschen und die spezifisch gebundenen Proteine eluiert und mittels Westernblot mit den jeweiligen Antikörpern analysiert. Vom Eluat (P) und Kontroll-Eluat (Φ) wurde die 30 fache Menge des Solubilisats (S) aufgetragen. A: Coexpression von TAP1, TAP2 und UL49.5. B: Coimmunpräzipitation mittels TAPL-Antikörper nach Coexpression von TAPL und UL49.5. C: Coexpression von TAP1 und UL49.5 bzw. TAP2 und UL49.5. D: Coimmunpräzipitation aus Zellen, in denen coreTAP1, coreTAP2 und UL49.5 coexprimiert wurden.

Wie in Abbildung 13 dargestellt, interagiert UL49.5 spezifisch mit dem TAP-Transportkomplex, in Abwesenheit weiterer Faktoren des Immunsystems. Des Weiteren interagiert der virale Faktor spezifisch sowohl mit TAP1 als auch mit TAP2 allein, was zeigt, dass die Bindung unabhängig von einem aktiven Transporter ist. Die Interaktion mit den isolierten TAP-Untereinheiten ist zwar schwächer, aber deutlich nachzuweisen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das UL49.5-Protein mit dem coreTAP-Transportkomplex interagiert, der für die Funktion des Transporters hinreichend ist.

Um zu überprüfen, ob UL49.5 den Peptidtransport von TAP in Insektenzellen beeinträchtigt, wurde die Transporteffizienz des TAP-Komplexes und des coreTAP-Komplexes in An- und Abwesenheit von UL49.5 analysiert. Dazu wurden Insektenzellen bei einer Zelldichte von  $2,0 \times 10^6$  Zellen/ml mit den entsprechenden Baculoviren infiziert und nach 48 Stunden geerntet. Die gleiche Anzahl von Zellen der verschiedenen Infektionen wurden geerntet, mit Saponin semipermeabilisiert und anschließend mit dem Fluorescein-markierten Peptid RRYQNST $\Phi$ L ( $\Phi$ , Fluorescein-markiertes Cystein) für 3 min inkubiert. Dieses Peptid besitzt eine N-core-Glykosylierungsstelle (NST) und wird nach dem Transport durch TAP im ER-Lumen glykosyliert. Nach Zugabe von ConA-beads (Lektin) binden die beads den Zuckerrest an der Glykosylierungsstelle der Peptide. Anschließend wurden die Peptide durch Zugabe von Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid spezifisch von den ConA-beads verdrängt. Um den Peptidtransport quantifizieren zu können, wurde pro Ansatz sowohl eine positive Probe (Zellen mit Peptiden und ATP) als auch eine negative Probe (Zellen mit Peptiden und Apyrase, welche ATP durch Spaltung inaktiviert) mitgeführt. Die Fluoreszenzintensitäten der eluierten Peptide und damit die relative, transportierte Peptidmenge wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers bestimmt.

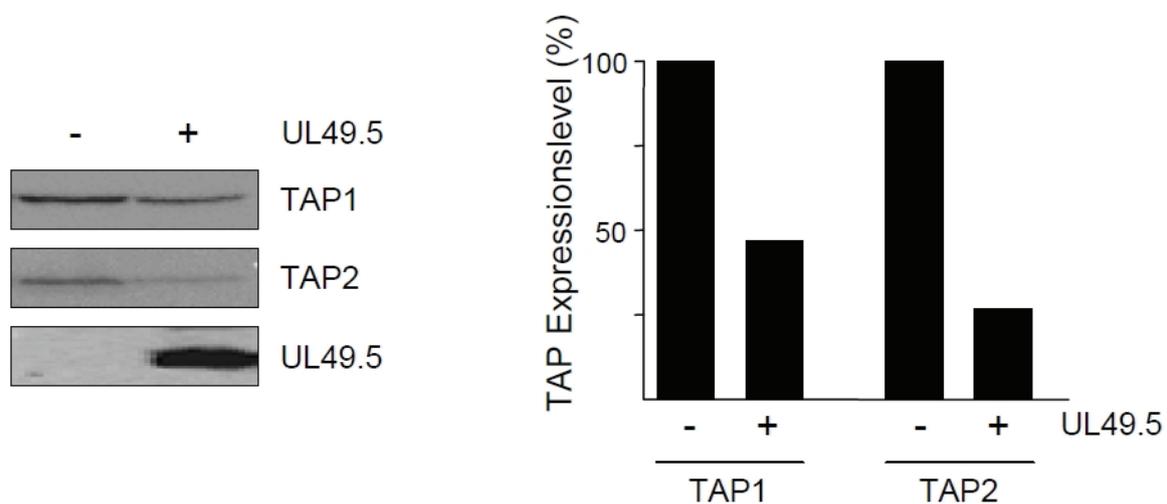


**Abbildung 14. Transport-Inhibition durch UL49.5**

Der Transportassay wurde mit  $1 \mu\text{M}$  Fluorescein-markiertem Peptid RRYQNST $\Phi$ L ( $\Phi$ , Fluorescein-markiertes Cystein) für 3 min bei  $32^\circ\text{C}$  in Anwesenheit (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von  $10 \text{ mM}$  MgATP mit  $30 \mu\text{l}$  Mikrosomen ( $150 \mu\text{g}$  Gesamt-Protein) durchgeführt. Glykosylierte und somit transportierte Peptide, wurden an ConA-Beads gebunden und die Fluoreszenzintensität mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers quantifiziert.

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, inhibiert UL49.5 in Insektenzellen den TAP-abhängigen Peptidtransport um etwa 80%. Interessanterweise wird auch der coreTAP-Transporter inhibiert, aber nur zu etwa 50%. Dies zeigt, dass UL49.5 den TAP-Transportkomplex auch in Abwesenheit sämtlicher Komponenten des Immunsystems inhibiert.

In MJS-Zellen ist eine vollständige Degradation des TAP-Komplexes durch UL49.5 nachzuweisen, welche durch die C-terminale Domäne von UL49.5 verursacht wird. Ein Großteil des Effektes, den man bei der Transportinhibition beobachten kann, ist auf degradiertes TAP zurückzuführen. Somit stellte sich die Frage, ob auch heterolog exprimiertes TAP in Insektenzellen durch das UL49.5-Protein degradiert werden kann. Hierzu wurden die Expressionslevel der verschiedenen Proteine nach Coexpression untersucht. Die Intensitäten der Proteinbanden wurden mit Hilfe des Lumi-Imagers quantifiziert. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, findet auch in Insektenzellen eine gewisse Degradation des TAP-Komplexes statt. Interessanterweise ist die Degradation nicht so stark wie in humanen Zellen, aber TAP1 wird zu etwa 50% und TAP2 zu etwa 25% degradiert. Dies könnte erklären, warum der Gesamteffekt der TAP-Inhibition in Sf9-Zellen schwächer ist.

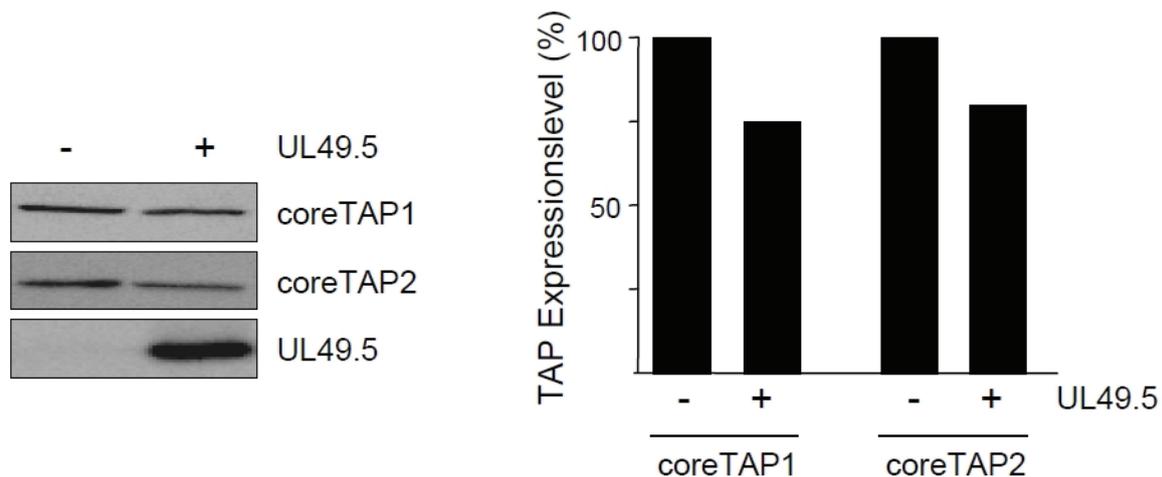


**Abbildung 15. TAP-Degradation in Insektenzellen durch UL49.5**

Es wurden gleiche Mengen Sf9-Mikrosomen aufgetragen und nach Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Die Intensitäten der Westernblot-Signale wurden mit Hilfe des Lumi-Imagers quantifiziert. Das TAP-Signal nach Expression in Abwesenheit des viralen Faktors wurde als 100% definiert.

Des Weiteren wurde untersucht, ob auch eine Degradation des coreTAP-Komplexes stattfindet. Die Transport-Inhibition des coreTAP-Komplexes ist deutlich geringer als

die Inhibition des TAP-Transportkomplexes (etwa 50%). In Abbildung 16 sind die unterschiedlichen Expressionslevel in Insektenzell-Mikrosomen nach Coexpression dargestellt. Interessanterweise, ist nur eine geringe Degradation (~25%) des coreTAP-Komplexes zu beobachten, was auch mit der geringeren Transport-Inhibition korreliert. Dies bestätigt erneut, dass ein Großteil der Transport-Inhibition des TAP-Transporters auf Degradation von TAP zurückzuführen ist.



**Abbildung 16. coreTAP-Degradation in Insektenzellen durch UL49.5**

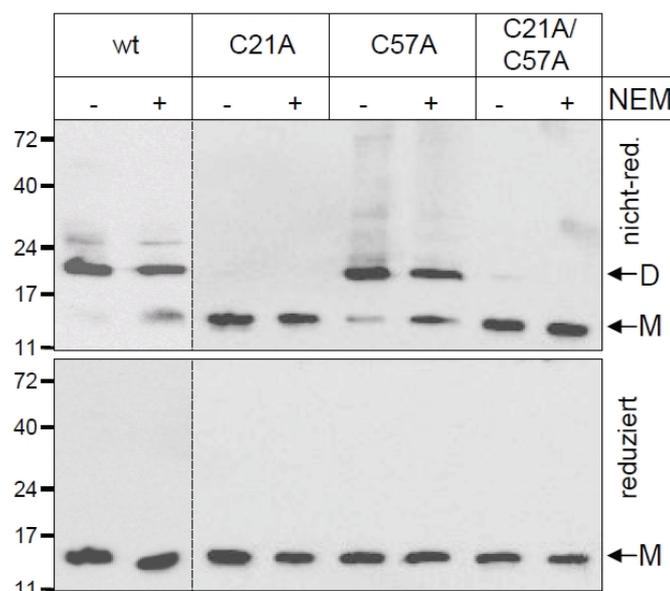
Es wurden gleiche Mengen Sf9-Mikrosomen aufgetragen und nach Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Die Intensitäten der Westernblot-Signale wurden mit Hilfe des Lumi-Imagers quantifiziert. Das TAP Signal nach Expression in Abwesenheit des viralen Faktors wurde als 100% definiert.

### 3.1.2 Untersuchung der aktiven Einheit von UL49.5

Das UL49.5-Protein liegt sowohl in Virus-infizierten Zellen, als auch nach heterologer Expression als Monomer und als Disulfid-verknüpftes Dimer vor. Des Weiteren bildet UL49.5, auch als gN bezeichnet, bei Virusinfektion ein Heterodimer mit dem viralen Glykoprotein gM aus. Die Analyse der Homologie der Sequenzen verschiedener varicelloviraler UL49.5-Proteine zeigt zwei hoch-konservierte Cysteine im UL49.5-Protein. Das erste Cystein (C21) ist in der ER-luminalen Domäne vorzufinden und ist für die Heterodimerisierung mit gM verantwortlich. Ein zweites Cystein ist am zytoplasmatischen Rand der Transmembrandomäne lokalisiert (C57). Um zu untersuchen, welches dieser Cysteine für die Homodimerisierung verantwortlich ist, wurden sowohl Einzel-Cystein-Mutanten (C21A und C57A) und eine Doppel-Cystein-

Mutante hergestellt, bei denen das jeweilige Cystein zu einem Alanin mutiert wurde (C21A/C57A). Die verschiedenen UL49.5-Varianten wurden in Insektenzellen coexprimiert, und anschließend wurden davon Mikrosomen präpariert. Die Mikrosomenpräparation wurde sowohl in An- als auch in Abwesenheit von N-Ethyl-Maleimid (NEM) durchgeführt, wobei der Cavitation-Puffer mit 10 mM NEM supplementiert wurde. NEM ist membranpermeabel, reagiert mit freien Cysteinen und blockiert so die Ausbildung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken nach Zellaufschluss durch Oxidation mit Luftsauerstoff. Die Zugabe von NEM sollte die Neubildung von UL49.5 Dimeren verhindern.

Um zu untersuchen, welches der beiden Cysteine für die Dimerisierung verantwortlich ist, wurden die Proteine mittels SDS-PAGE sowohl unter reduzierten Bedingungen (Zugabe von DTT im SDS-Probenpuffer), als auch unter nicht-reduzierten Bedingungen (keine Zugabe von DTT im SDS-Probenpuffer) analysiert.



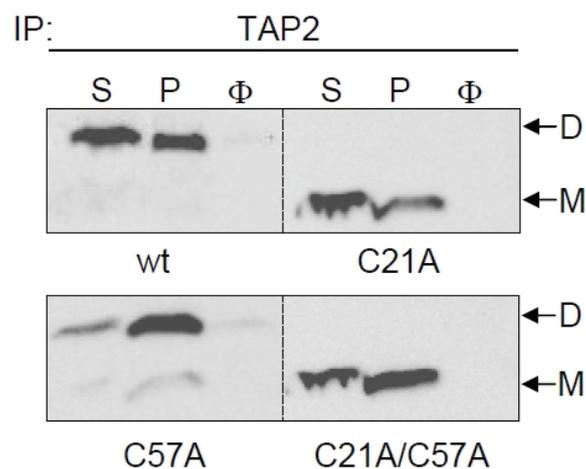
**Abbildung 17. Expression von UL49.5 Cystein-Mutanten in Insektenzellen**

Sf9-Zellen wurden mit TAP1/TAP2wt und den verschiedenen UL49.5-Varianten coinfiziert. Es wurde eine 15% SDS-PAGE unter reduzierten und nicht reduzierten Bedingungen durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit dem  $\alpha$ -UL49.5<sub>C</sub> Antikörper. Es wurden 2,5  $\mu$ g Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. M: Monomer, D: Dimer.

Interessanterweise ist sowohl bei der Cystein-Doppelmutante als auch bei der C21A UL49.5-Mutante unter oxidierenden Bedingungen, keine Dimerbildung mehr zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass das C21 in der ER-luminalen Domäne für die Dimerbildung verantwortlich ist. Bei der C57A Mutante sind sowohl Monomere als

auch Dimere nachzuweisen. Durch die Zugabe von NEM werden artifizielle Dimere verringert. Dieses wird bei dem UL49.5 wt Protein und der C57A Mutante deutlich. Bei diesen UL49.5-Mutanten verändert sich das Verhältnis zwischen Monomer und Dimer bei Zugabe von NEM. Nach Zugabe von NEM ist mehr monomeres UL49.5 vorzufinden, als ohne NEM-Zugabe. Durch Oxidation mit Luftsauerstoff werden in diesem Falle mehr UL49.5-Dimere gebildet.

Um zu untersuchen, ob die Dimerbildung eine Voraussetzung für die inhibitorische Funktion von UL49.5 ist, wurde zunächst die Bindung der UL49.5 Cystein-Mutanten an den TAP-Komplex analysiert. Hierfür wurden Co-IPs mit Sf9-Mikrosomen, sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von NEM durchgeführt. Die Zugabe von NEM brachte dasselbe Ergebnis wie Proben, in denen kein NEM zugegeben wurde. Die Ergebnisse der Proben mit NEM sind in Abbildung 18 dargestellt.

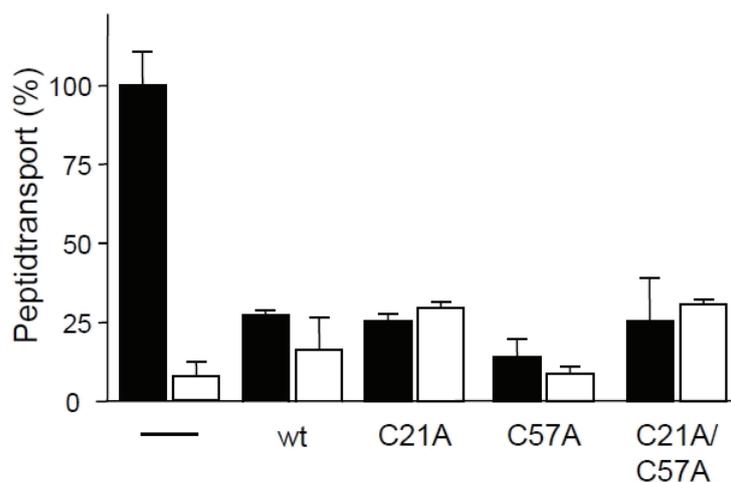


**Abbildung 18. Coimmunpräzipitation von UL49.5 Cystein-Mutanten**

Für die Coimmunpräzipitation wurden  $2,5 \times 10^6$  Sf9-Zellen in PBS resuspendiert und mit 2% Digitonin solubilisiert (S). Der TAP-Komplex wurde mit Hilfe des monoklonalen TAP2-spezifischen Antikörpers 435.2 coimmunpräzipitiert, anschließend im SDS-Gel (12%) aufgetrennt und im Western Blot durch den polyklonalen UL49.5-spezifischen Antikörper analysiert. M: Monomer, D: Dimer.

Es zeigte sich, dass alle Cystein-Mutanten von UL49.5 spezifisch mit dem TAP-Komplex interagieren. Dies bedeutet, dass sowohl monomeres als auch dimeres UL49.5 an den TAP-Transporter binden kann. Wenn im Solubilisat sowohl das Monomer als auch das Dimer von UL49.5 vorhanden sind, ändert sich das Verhältnis zwischen beiden Formen nicht nach der Co-IPs. Daraus folgt, dass das UL49.5 Monomer die aktive Einheit des viralen Proteins ist.

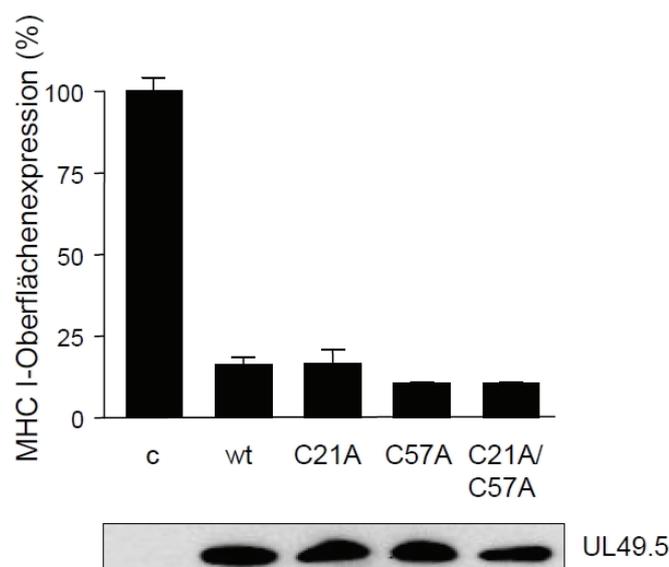
Um zu untersuchen, ob die inhibitorische Aktivität von UL49.5 von einer Dimer-Bildung abhängig ist, wurde zunächst der Effekt der verschiedenen Cystein-Mutanten auf TAP-Transportaktivität analysiert. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, hat die UL49.5 Dimer-Bildung keinen Einfluss auf die Funktionsweise des Proteins. Erstaunlicherweise inhibieren alle UL49.5-Varianten den TAP-abhängigen Peptidtransport in gleichem Maße. Dies bedeutet, dass sowohl das monomere als auch das dimere UL49.5-Protein aktiv sind und dass die Dimerbildung für die inhibitorische Funktion des Proteins nicht zwingend notwendig ist.



#### Abbildung 19. Transport-Inhibition durch UL49.5 Cystein-Mutanten

Der Transportassay wurde mit 1  $\mu$ M Fluorescein-markiertem Peptid RRYQNST $\Phi$ L ( $\Phi$ , Fluorescein-markiertes Cystein) für 3 min bei 32°C in Anwesenheit (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 10 mM MgATP mit 30  $\mu$ l Mikrosomen (150  $\mu$ g Gesamt-Protein) durchgeführt. Glykosylierte und somit transportierte Peptide, wurden an ConA-Beads gebunden. Die Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers quantifiziert.

Als letztes wurde der Effekt der verschiedenen UL49.5 Cystein-Mutanten auf MHC I-Oberflächenexpression in transient transfizierten HeLa-Zellen analysiert. In Abbildung 20 ist zu sehen, dass alle UL49.5-Varianten den gleichen Effekt auf MHC I-Oberflächenexpression haben und zu einer drastischen Suppression führen. Interessanterweise ist die Expression der unterschiedlichen Cystein-Mutanten vergleichbar mit der Expression des Wildtyp-Proteins.



### Abbildung 20. MHC I Suppression durch UL49.5 Cystein-Mutanten

Mit pIRES-EGFP-UL49.5 Konstrukten transient transfizierte HeLa-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Hilfe des Phycoerythrin (PE)-gekoppelten MHC I-Antikörpers W6/32 auf MHC I-Oberflächenpräsentation untersucht. Mock (leerer Vektor) transfizierte Zellen wurden als Kontrolle genommen (c) und auf 100% gesetzt. Die Expression der einzelnen Konstrukte wurde mittels Western-Blot mit dem  $\alpha$ -UL49.5<sub>c</sub>-Antikörper nachgewiesen. Hierfür wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Spur aufgetragen und auf einem 4-20% Acrylamid-Gradientengel (ReadyGel, Biorad) aufgetrennt.

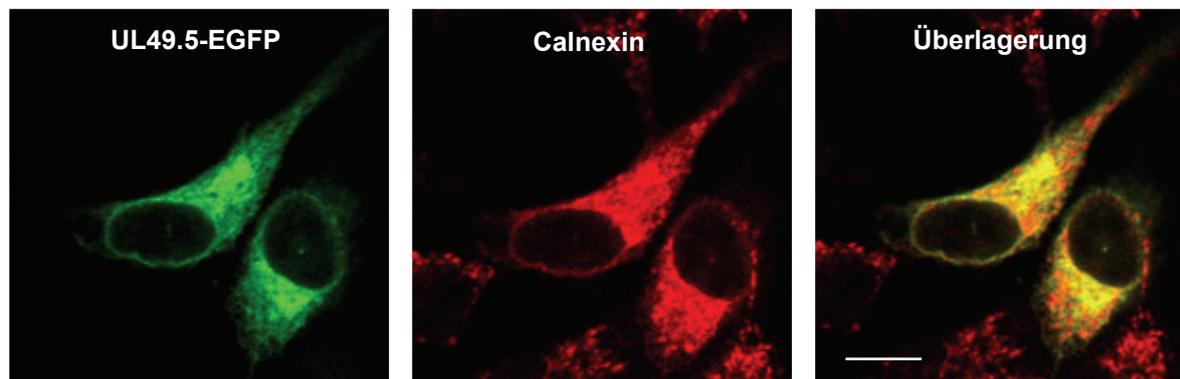
## 3.2 Interaktion von UL49.5 mit TAP in Säugerzellen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das BHV-1 UL49.5-Protein, sowohl in bovinen, als auch in humanen Zellen aktiv ist (Koppers-Lalic et al, 2005). Um die Ergebnisse der Interaktionsstudien in Insektenzellen zu bestätigen, wurde die Interaktion zwischen UL49.5 und dem TAP-Komplex in humanen Zellen untersucht.

### 3.2.1 Colokalisationsstudien von UL49.5-EGFP

Um sicherzustellen, dass das überexprimierte Fusionsprotein im ER von humanen Zellen lokalisiert ist, wurde als erster Schritt die Lokalisation des UL49.5-EGFP Fusionsproteins in transient transfizierten HeLa-Zellen untersucht. Da die N-terminale Signalsequenz des Proteins bei der Prozessierung abgespalten wird, wurde das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) an den C-Terminus von UL49.5 fusioniert. Nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und das ER wurde mittels

eines  $\alpha$ -Calnexin Antikörpers und eines Fluorophor-gekoppelten Zweit-Antikörpers angefärbt.



**Abbildung 21. Colokalisation von UL49.5-EGFP und Calnexin**

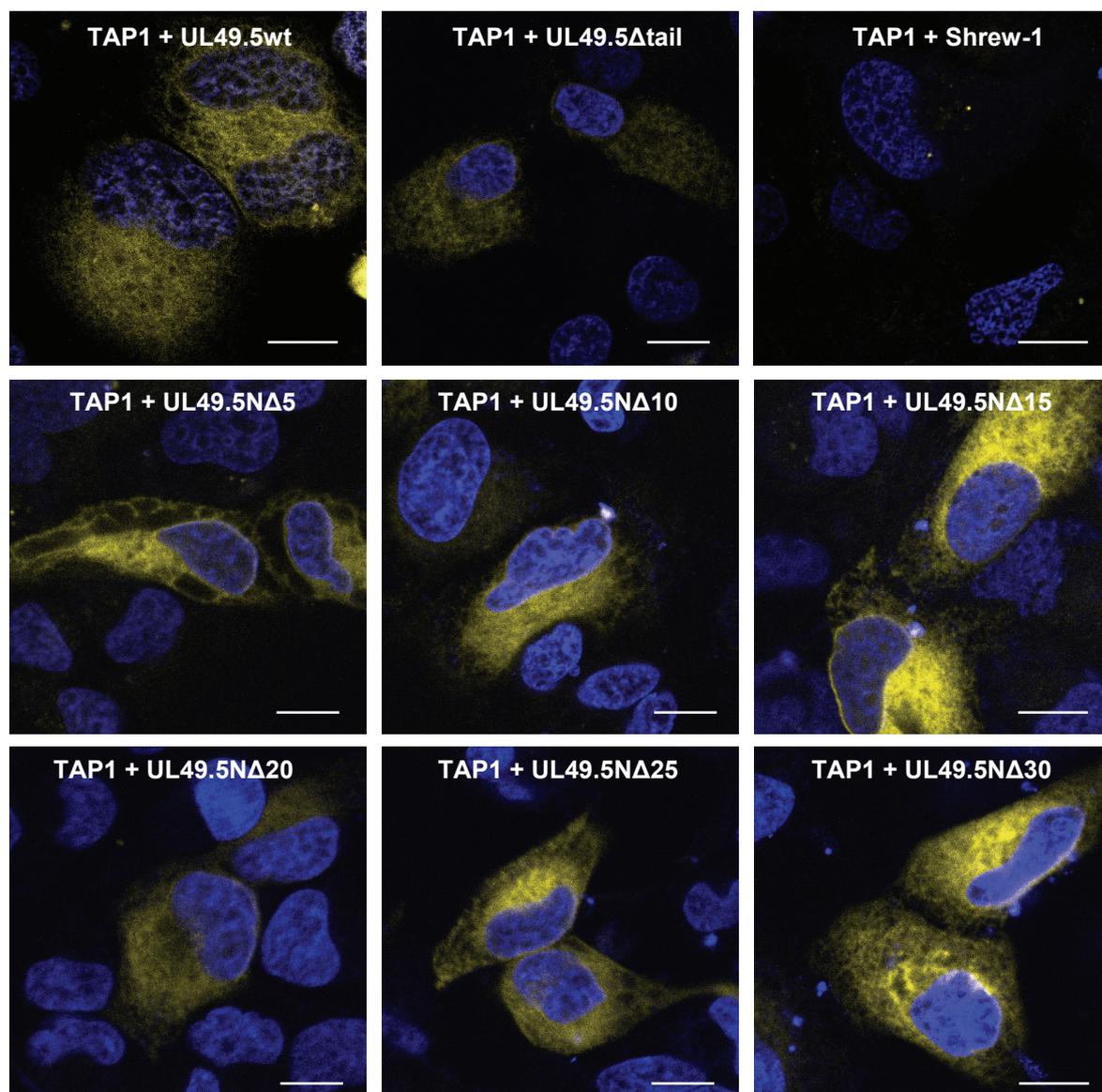
HeLa-Zellen wurden transient mit UL49.5-EGFP transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 2% PFA fixiert und das ER mit  $\alpha$ -CNX und  $\alpha$ -rabbit Cy3 markiert. Im rechten Bild ist die Überlagerung der zwei Farbkanäle dargestellt. Gelbe Bereiche deuten auf Colokalisation der beiden Proteine hin.

In Abbildung 21 ist deutlich zu erkennen, dass UL49.5-EGFP im ER lokalisiert ist. Das Fusionsprotein weist eine perinukleäre Verteilung auf, die dem ER entspricht. Nach Anfärben des ERs mit einem entsprechenden Markerprotein (Calnexin) ist eine deutliche Colokalisation nachzuweisen, die durch gelbe Fluoreszenz in der Überlagerung der zwei Kanäle gekennzeichnet ist.

### 3.2.2 *In vivo* Interaktionsstudien mittels *BiFC*

Um die Interaktionen von UL49.5 mit dem TAP-Komplex zu bestätigen, wurde eine *Split-Yellow fluorescent protein* (YFP) Technik, die sogenannte *Bimolecular Fluorescence Complementation* (BiFC), angewendet. Bei dieser Methode wurde das YFP in zwei Hälften gespalten, die keine intrinsische Affinität zueinander haben und sich nur zusammenlagern, wenn fusionierte Proteine interagieren. In diesem Fall kommt es zu einer Restauration der gelben Fluoreszenz, was einen Hinweis auf eine Protein-Protein-Interaktion gibt (siehe Kapitel 2.5.2). In diesem Fall wurde der YC-Teil des YFP an den N-Terminus von TAP1 bzw. coreTAP1 fusioniert und der YN-Teil des YFP an den C-Terminus von UL49.5, jeweils durch einen Glycin-Serin-Linker separiert. Dieser erlaubt eine gewisse Flexibilität der Proteine.

HeLa Zellen ( $4 \times 10^5$ ) wurden mit jeweils  $0,5 \mu\text{g}$  der entsprechenden DNA transfiziert (siehe Kapitel 2.4.4). Die Komplementation wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Dafür wurde das YFP mit einem Argon-Ionen-Laser bei  $514 \text{ nm}$  angeregt. DAPI, ein Farbstoff der DNA anfärbt und die Lokalisation der Zellkerne ermöglicht, wurde mit Hilfe eines Dioden-Lasers bei  $405 \text{ nm}$  angeregt.



**Abbildung 22. *In vivo* Interaktion zwischen TAP1 und UL49.5 (BiFC)**

HeLa-Zellen wurden transient mit YC-TAP1 und UL49.5-YN-Varianten cotransfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen mit DAPI angefärbt und mikroskopiert. Maßstabsbalken:  $10 \mu\text{m}$ .

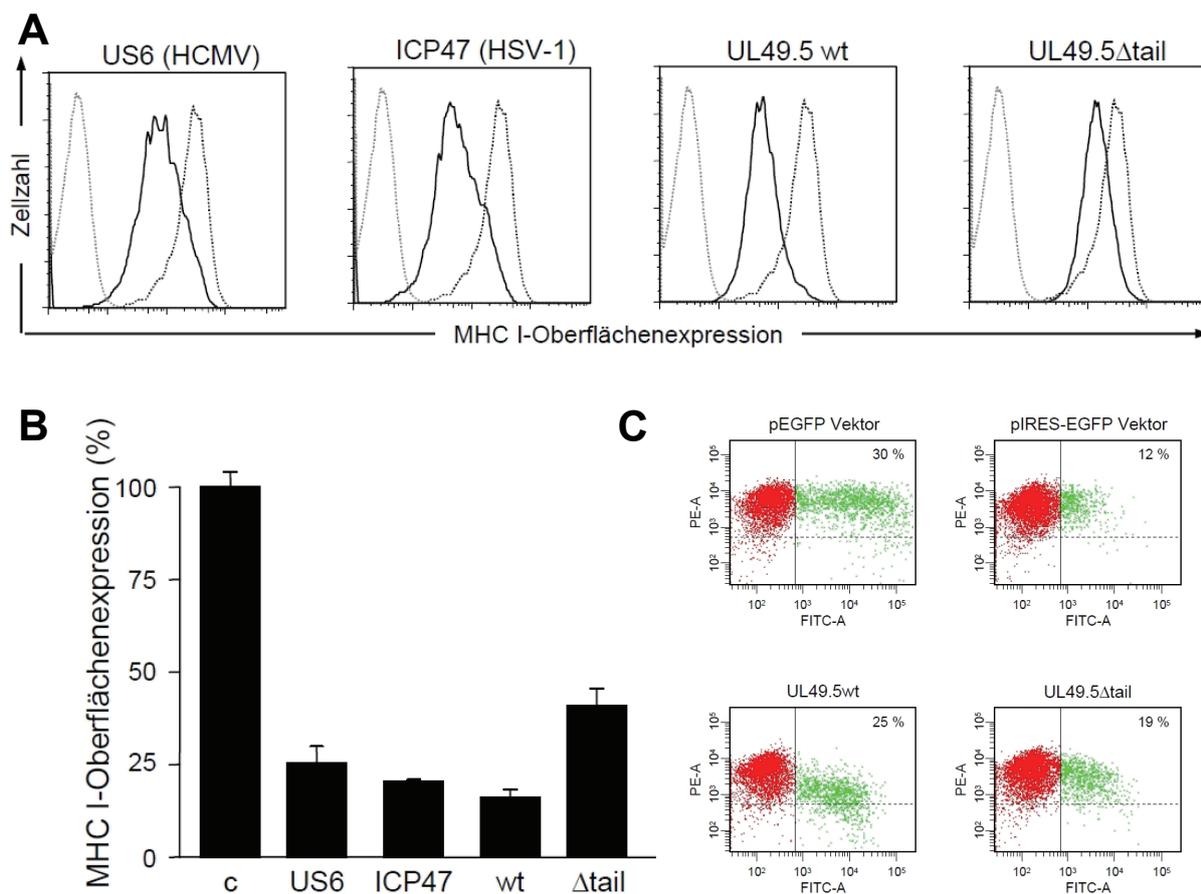
Interessanterweise interagieren alle UL49.5-Varianten (N- und C-terminal verkürzt) sowohl mit TAP1 als auch mit coreTAP1 (nicht gezeigt), was die gelbe Fluoreszenz in einem perinukleären Kompartiment verdeutlicht (siehe Abbildung 22). Diese Ergebnisse unterstützen die Daten der Co-IPs.

### **3.3 Funktionalitätsuntersuchungen von UL49.5 in Säugerzellen**

Um eine schnelle funktionelle Charakterisierung verschiedener UL49.5-Varianten zu ermöglichen, wurde ein transientes System in HeLa-Zellen etabliert. Hierfür wurde das pIRES-EGFP-Plasmid (Invitrogen) verwendet. Die *internal ribosome entry site* erlaubt die gleichzeitige Expression des Virus-Proteins und des Markers EGFP von einer einzigen mRNA. Dies hat den Vorteil, dass man transfizierte Zellen aufgrund der grünen Fluoreszenz selektieren und spezifisch analysieren kann. Im Gegensatz zu Fusionensproteinen hat dies keine Auswirkung auf die Funktionsweise des Proteins.

#### **3.3.1 Funktion der einzelnen Domänen von UL49.5**

Bei dem UL49.5-Protein handelt es sich um ein Typ-I-Membranprotein mit einer ER-luminalen Domäne, einer putativen Transmembranhelix und einem kurzen zytoplasmatischen Abschnitt. Es ist bekannt, dass der zytoplasmatische Teil von UL49.5 für die Induzierung der proteasomalen Degradation verantwortlich ist (Koppers-Lalic et al, 2005). Dies sollte im transienten System nachvollzogen werden. Um die Funktion der einzelnen Domänen im transienten System zu untersuchen, wurde ein Konstrukt hergestellt, bei dem die C-terminale Domäne deletiert ist und ein weiteres Konstrukt, das nur aus der ER-luminalen Domäne des Proteins besteht. Eine Funktionalität der isolierten N-terminalen Domäne konnte bisher noch nicht gezeigt werden. HeLa Zellen wurden transient mit den jeweiligen pIRES-EGFP Konstrukten transfiziert und nach Anfärben mit dem PE-gekoppelten, konformationsspezifischen MHC I-Antikörper W6/32 mittels FACS analysiert. Hierbei wurden zunächst lebende Zellen mittels forward-scatter und sideward-scatter identifiziert (*gaten*) und anschließend, nur transfizierte Zellen (charakterisiert durch grüne Fluoreszenz) auf MHC I-Oberflächenexpression untersucht. Als Kontrolle wurde die MHC I-Suppression durch die bereits beschriebenen TAP-Inhibitoren US6 vom HCMV und ICP47 von HSV-1 analysiert, die ebenfalls im pIRES-EGFP-Vektor exprimiert wurden.



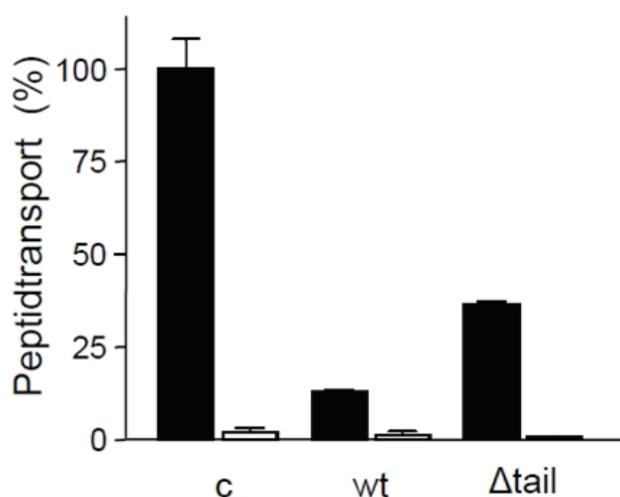
### Abbildung 23. MHC I-Suppression durch C-terminal verkürzte UL49.5-Varianten

Mit pIRES-EGFP-UL49.5 Konstrukten transient transfizierte HeLa-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Hilfe des PE-gekoppelten, gegen MHC I-Moleküle gerichteten Antikörpers (W6/32) auf MHC I-Oberflächenpräsentation hin untersucht. A: Histogramm Überlagerung: grau gestrichelte Linie: Maus-Isotypenkontrolle; schwarz gestrichelte Linie: mit Leervektor transfizierte Zellen; schwarze Linie: Zellen, mit pIRES-EGFP-Virus-Protein transfiziert. B: Statistische Auswertung von jeweils drei Histogrammen, wobei die Kontrolle c mit Leervektor transfizierte Zellen ist. C: Original *dot blots*, wobei rote Punkte untransfizierte Zellen und grüne Punkte transfizierte Zellen darstellen. Die Transfektionseffizienz ist jeweils in % angegeben. Der FITC-A Kanal stellt die EGFP-Fluoreszenz dar, der PE-A Kanal erlaubt eine Aussage über das Maß der MHC I-Oberflächenexpression.

Wie in Abbildung 23 dargestellt, ist die MHC I-Suppression durch das BHV-1 Protein UL49.5 ähnlich stark wie die durch US6 und ICP47 hervorgerufene MHC I-Suppression. Wird der C-terminale Abschnitt von UL49.5 deletiert (UL49.5 $\Delta$ tail), ist die MHC-Suppression schwächer, was durch eine geringere *Peak*-Verschiebung nach links verdeutlicht wird. Der C-terminale Schwanz von UL49.5 ist verantwortlich für die proteasomale Degradation des TAP-Komplexes. Wird dieser Abschnitt deletiert, führt UL49.5 nur noch zu einer TAP-Inhibition ohne proteasomale Degradation (Koppers-Lalic et al, 2005). Die Expression der isolierten ER-luminalen Domäne von UL49.5 führte zu einer geringen MHC I-Suppression von etwa 15%.

Jedoch konnte das Protein weder in den transfizierten Zellen noch im Zell-Überstand nachgewiesen werden. Wahrscheinlich ist diese Domäne instabil.

Um den Effekt der verschiedenen UL49.5-Varianten auf den TAP-Transport zu untersuchen, wurden die transient transfizierten HeLa-Zellen, die zuvor auf MHC I-Oberflächenexpression untersucht wurden, weiter analysiert. Mit Hilfe des FACS-Gerätes wurden die grünen Zellen, die den transfizierten Zellen entsprechen, heraussortiert. Anschließend wurden die sortierten Zellen mit Saponin semi-permeabilisiert und für einen Transportassay eingesetzt. Als Kontrolle wurden Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz heraussortiert und ebenfalls für den Transportassay eingesetzt.



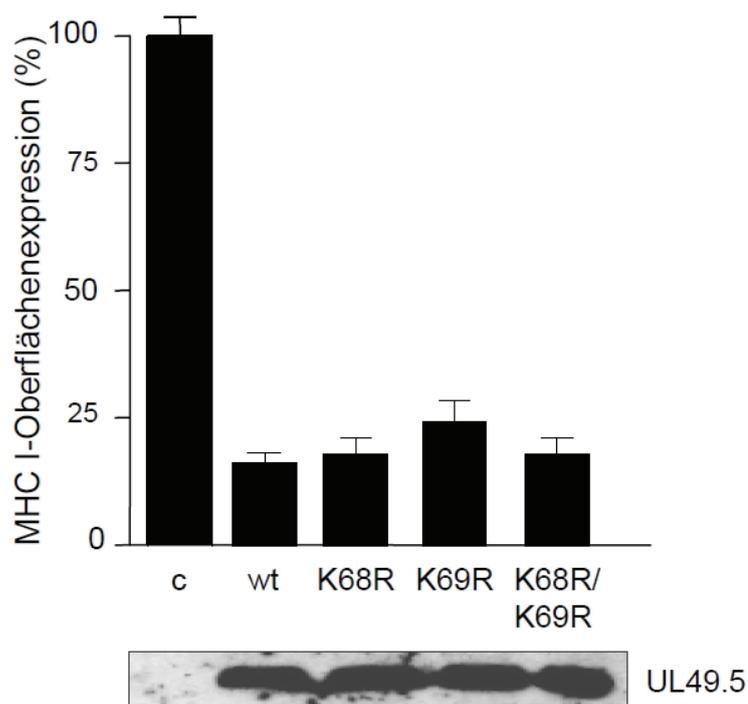
#### Abbildung 24. Transport-Inhibition durch UL49.5

Der Transportassay wurde mit 1  $\mu\text{M}$  Fluorescein-markiertem Peptid RRYQNST $\Phi$ L ( $\Phi$ , Fluorescein-markiertes Cystein) für 3 min bei 32°C in Anwesenheit (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 10 mM MgATP mit jeweils  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen durchgeführt. Glykosylierte Peptide wurden an ConA-Beads gebunden. Die Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers quantifiziert.

Wie in Abbildung 24 deutlich zu erkennen, inhibiert das UL49.5-Protein in transient transfizierten HeLa-Zellen ebenfalls den TAP-abhängigen Peptidtransport. Das UL49.5 $\Delta$ tail Protein führt zu einer Transport-Inhibition von etwa 60%. Dies korreliert mit den Daten aus stabil transduzierten MJS-Zellen (Koppers-Lalic et al, 2005). UL49.5 $\Delta$ tail führt lediglich zu einer Inhibition des TAP-Transporters aber zu keiner proteasomalen Degradation.

### 3.3.2 Detaillierte Analyse der C-terminalen Domäne von UL49.5

Es ist bekannt, dass die C-terminale Domäne von UL49.5 für die proteasomale Degradation des TAP-Transporters verantwortlich ist. Diese Eigenschaft trifft nur auf das BHV-1 UL49.5-Protein zu. Bis jetzt ist nicht bekannt, ob das UL49.5-Protein oder eine (oder beide) TAP-Untereinheiten ubiquityliert werden. Interessanterweise beinhaltet das BHV-1 UL49.5-Protein als einziges zwei Lysine in seiner C-terminalen Domäne, welche potentiellen Ubiquitylierungsstellen entsprechen könnten. Um zu untersuchen, ob die Lysine im zytoplasmatischen Bereich von UL49.5 für die Degradation von TAP verantwortlich sind, wurden diese sowohl einzeln als auch beide gleichzeitig zu Argininen mutiert. Diese Aminosäure wurde gewählt, um keine Änderung in der Ladung der C-terminalen Domäne zu bewirken. Die Lysin-Mutanten wurden daraufhin auf ihren Einfluß auf die MHC I-Oberflächenexpression untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt.

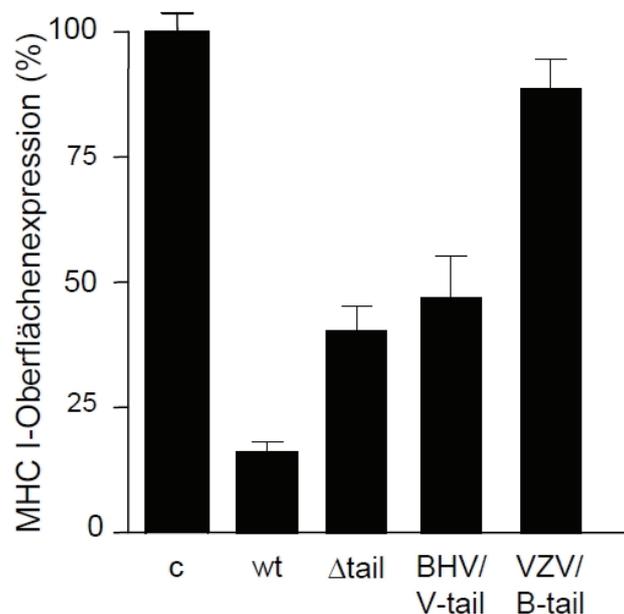


**Abbildung 25. MHC I-Suppression durch UL49.5 Lysin-Mutanten**

Mit pIRES-EGFP-UL49.5 Konstrukten transient transfizierte HeLa-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Hilfe des PE-gekoppelten, gegen MHC I-Moleküle gerichteten Antikörpers (W6/32) auf MHC I-Oberflächenpräsentation hin untersucht. Mock (leerer Vektor) transfizierte Zellen wurden als Kontrolle eingesetzt (c) und auf 100% gesetzt. Die Expression der einzelnen Konstrukte wurde mittels Western Blot mit dem  $\alpha$ -UL49.5<sub>C</sub>-Antikörper nachgewiesen. Hierfür wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Spur aufgetragen und auf einem 12% Acrylamidgel aufgetrennt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Lysin-Mutanten keinen Effekt auf MHC I-Oberflächenexpression haben. Bei allen Mutanten ist eine zum UL49.5 vergleichbare Reduktion der MHC I-Oberflächenexpression zu erkennen. Daraus kann man indirekt schließen, dass die proteasomale Degradation bei allen Konstrukten gleich ist. Ähnliche Experimente mit Lysin → Alanin Mutanten zeigten vergleichbare Ergebnisse (Verweij et al, 2008).

Es stellte sich die Frage, ob der C-terminale Bereich des UL49.5-Proteins, der für die proteasomale Degradation des TAP-Transporters verantwortlich ist, auch die Degradation einleiten kann, wenn dieser an andere Proteine fusioniert ist. Um dieses zu untersuchen, wurde die C-terminale Domäne des BHV-1 UL49.5-Proteins an das Zostervirus (VZV) UL49.5-Protein fusioniert. Dieses Protein bindet zwar an den TAP-Transporter, führt aber zu keiner TAP-Inhibition. Bei einem weiteren Konstrukt wurde der C-terminale Bereich des VZV UL49.5-Proteins an die ER-luminale und Transmembran-Domäne des BHV-1 UL49.5 fusioniert (siehe Abbildung 26).



#### Abbildung 26. MHC I-Suppression durch chimäre UL49.5-Proteine

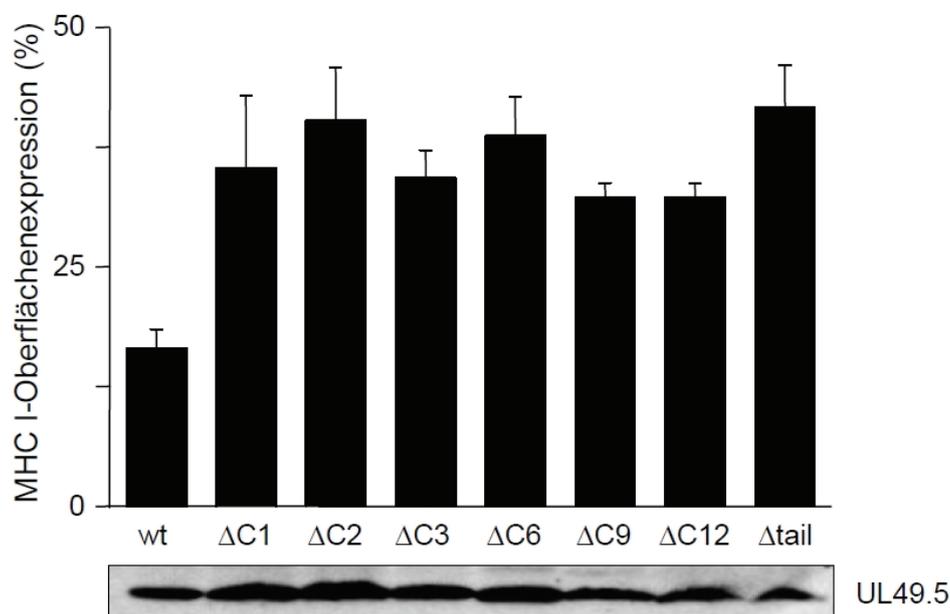
Mit pIRES-EGFP-UL49.5 Konstrukten transient transfizierte HeLa-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Hilfe des PE-gekoppelten, gegen MHC I-Moleküle gerichteten Antikörpers (W6/32) auf MHC I-Oberflächenpräsentation hin untersucht. Es wurden die chimären Proteine untersucht: BHV-1 UL49.5 mit dem VZV-tail (BHV/V-tail) und VZV UL49.5 mit BHV-1-tail (VZV/B-tail). Mock (leerer Vektor) transfizierte Zellen wurden als Kontrolle verwendet (c) und auf 100% gesetzt.

Es zeigte sich, dass die C-terminale Domäne des VZV UL49.5-Proteins nicht in der Lage ist, eine MHC I-Suppression in transient transfizierten HeLa Zellen zu

induzieren. Die MHC I-Suppression, die durch dieses Protein bedingt wurde, entsprach der Suppression durch das UL49.5 $\Delta$ tail Protein. Das bedeutet, dass der C-terminale Bereich von UL49.5 zwingend notwendig ist, um TAP Degradation und daraus folgend MHC I-Suppression einzuleiten. Es stellte sich somit die Frage, ob der C-terminale Bereich des BHV-1 Proteins hinreichend ist, um eine proteasomale Degradation des TAP-Komplexes hervorzurufen. Erstaunlicherweise zeigte das Fusionskonstrukt aus der BHV-1 UL49.5 C-terminalen Domäne und dem VZV Protein keinen Effekt auf die MHC I-Oberflächenexpression. Dies bedeutet, dass die isolierte C-terminale Domäne keine proteasomale Degradation induzieren kann.

### 3.3.3 Analyse C-terminal verkürzter UL49.5-Varianten

Um die Funktion der sehr kurzen (15 Aminosäuren) zytoplasmatischen Domäne von UL49.5 detailliert zu untersuchen und eventuell funktional relevante Bereiche zu identifizieren, wurden systematische C-terminal verkürzte UL49.5-Mutanten generiert. Der Einfluss der verschiedenen Mutanten auf die MHC I-Oberflächenexpression ist in Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27. MHC I-Suppression durch C-terminal verkürztes UL49.5**

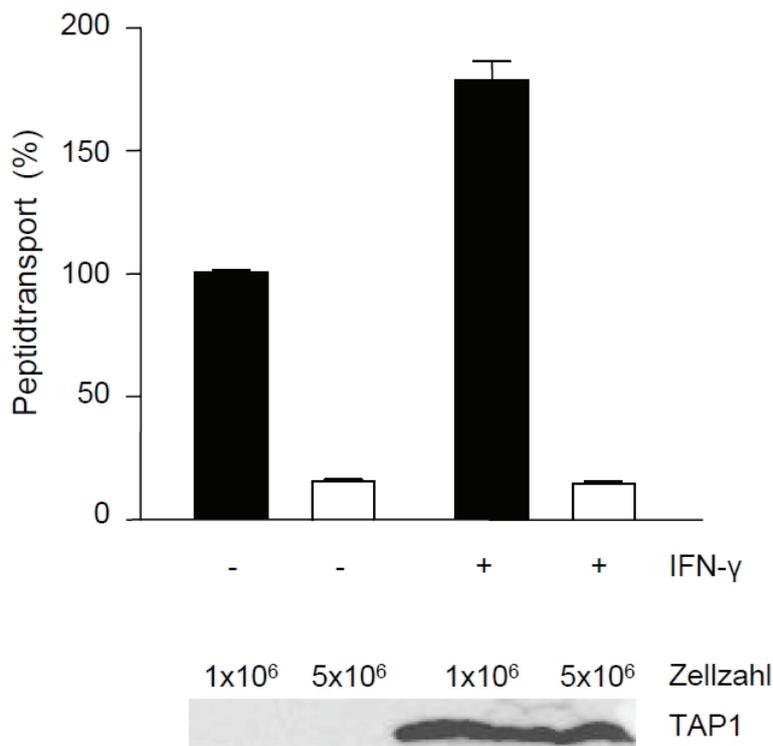
Mit pIRES-EGFP-UL49.5 Konstrukten transient transfizierte HeLa-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Hilfe des PE-gekoppelten, gegen MHC I-Moleküle gerichteten Antikörpers (W6/32) auf MHC I-Oberflächenpräsentation hin untersucht. Mock (leerer Vektor) transfizierte Zellen wurden als Kontrolle verwendet und auf 100% gesetzt. Die Expression der einzelnen Konstrukte wurde mittels Western Blot mit dem  $\alpha$ -UL49.5<sub>N</sub>-Antikörper nachgewiesen. Hierfür wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Spur aufgetragen und auf einem 4-20% Acrylamid-Gradientengel (ReadyGel, Biorad) aufgetrennt.

Bezüglich der MHC I-Suppression zeigten alle C-terminal verkürzten UL49.5-Proteine den gleichen Phänotyp wie das UL49.5-Protein ohne zytoplasmatische Domäne. Schon das Entfernen des C-terminalen Glycins reichte aus, um die MHC I-Suppression drastisch zu reduzieren. Weiterhin konnte mittels Immunoblotting gezeigt werden, dass alle Proteine exprimiert wurden. Der Größenunterschied zwischen den einzelnen Mutanten lässt sich mittels SDS-PAGE nur schwer darstellen. Da das Protein sehr klein ist, läuft es meistens als breite und diffuse Bande, so dass es technisch schwierig ist, sehr geringe Größenunterschiede von einer bzw. drei Aminosäuren sichtbar zu machen.

### **3.3.3.1 Stimulation von HeLa-Zellen mit Interferon- $\gamma$**

Da die C-terminale Domäne des BHV-1 UL49.5 für die proteasomale Degradation des TAP-Komplexes verantwortlich ist, wurde als nächstes untersucht, inwieweit die TAP-Degradation durch C-terminale Verkürzungen von UL49.5 beeinflusst wird. Hierfür wurden mit pIRES-EGFP-UL49.5 Konstrukten transient transfizierte HeLa-Zellen aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz heraussortiert. Diese aussortierten Zellen wurden daraufhin mittels TAP1- und TAP2-spezifischer monoklonaler Antikörper immunochemisch untersucht. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass der endogene TAP-Gehalt in HeLa-Zellen so gering ist, dass weder TAP1 noch TAP2 mit diesen Antikörpern nachgewiesen werden können. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Zellen nach der Transfektion mit Interferon- $\gamma$  behandelt, welches die Expression verschiedener Komponenten des Immunsystems, unter anderem des TAP-Transporters stimuliert. Nach der Stimulation war es möglich, TAP1 und TAP2 mittels Western Blot nachzuweisen.

Zunächst wurde der Effekt von Interferon- $\gamma$  auf nicht-transfizierte HeLa-Zellen untersucht. Hierfür wurde der TAP-abhängige Peptidtransport von nicht-stimulierten Zellen mit dem von mit Interferon- $\gamma$  stimulierten Zellen verglichen. Außerdem wurden die Intensitäten der Western Blot Signale nach Stimulation verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt.



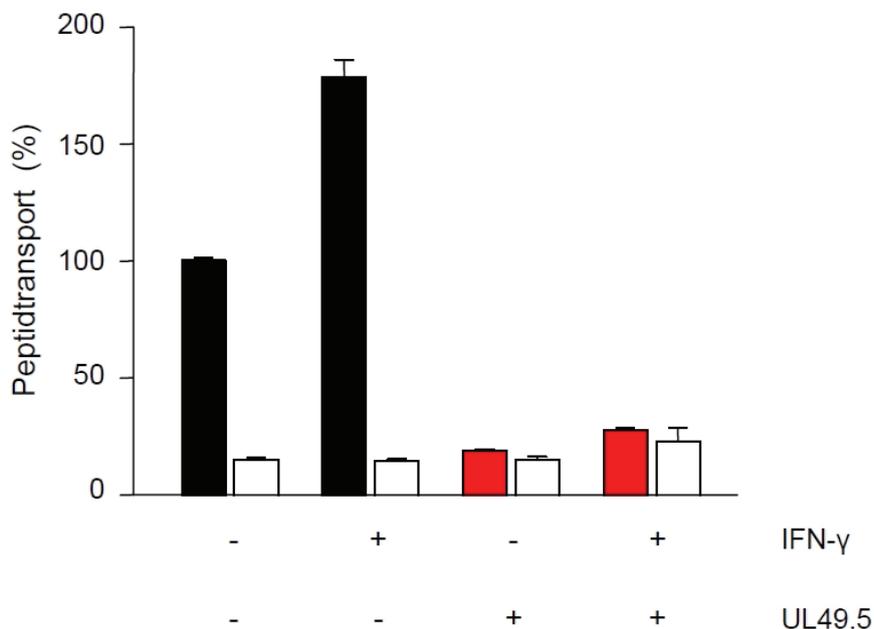
### Abbildung 28. Stimulation von HeLa-Zellen mit IFN- $\gamma$

HeLa-Zellen wurden mit Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ , 500 U/ml) für 48 h stimuliert. Die Zellen wurden mit Saponin semi-permeabilisiert und der Transportassay wurde mit 1  $\mu$ M Fluorescein-markiertem Peptid RRYQNST $\Phi$ L ( $\Phi$ , Fluorescein-markiertes Cystein) für 3 min bei 32°C in Anwesenheit (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 10 mM MgATP mit  $1 \times 10^6$  Zellen durchgeführt. Der TAP1-Gehalt wurde mithilfe eines TAP1-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Hierfür wurden unterschiedliche Zellmengen ( $1 \times 10^6$  bzw.  $5 \times 10^6$  Zellen pro Spur) aufgetragen.

In nicht-stimulierten Zellen ist der TAP-Komplex nicht immunochemisch nachweisbar, da die TAP-Menge in diesen Zellen für die Detektion nicht ausreicht. Nach Stimulation ist ein deutliches Signal für TAP1 detektierbar. Aufgrund dieser Daten wird deutlich, dass durch Interferon- $\gamma$  die Expression des TAP-Transporters erhöht wird. Dies spiegelt sich auch in der Erhöhung der Peptidtransport-Aktivität wieder. Nach Stimulation ist eine Verdopplung der Peptidtransport-Rate zu erkennen, welche durch eine erhöhte Menge an TAP-Transporter zustande kommt.

Da Interferon- $\gamma$  verschiedene Prozesse in der Zelle beeinflusst, wurde als nächstes untersucht, ob die MHC I-Suppression durch UL49.5 in Anwesenheit von Interferon- $\gamma$  noch beobachtet werden konnte. Nach transients Transfektion wurden HeLa-Zellen stimuliert und anschließend die transfizierten Zellen auf Basis der grünen Fluoreszenz aussortiert.

Mit semi-permeabilisierten Zellen wurde der ATP-abhängige Peptidtransport untersucht. Wie in Abbildung 29 dargestellt, findet auch nach Stimulation der Zellen mit Interferon- $\gamma$  eine Transportinhibition von etwa 95% statt.

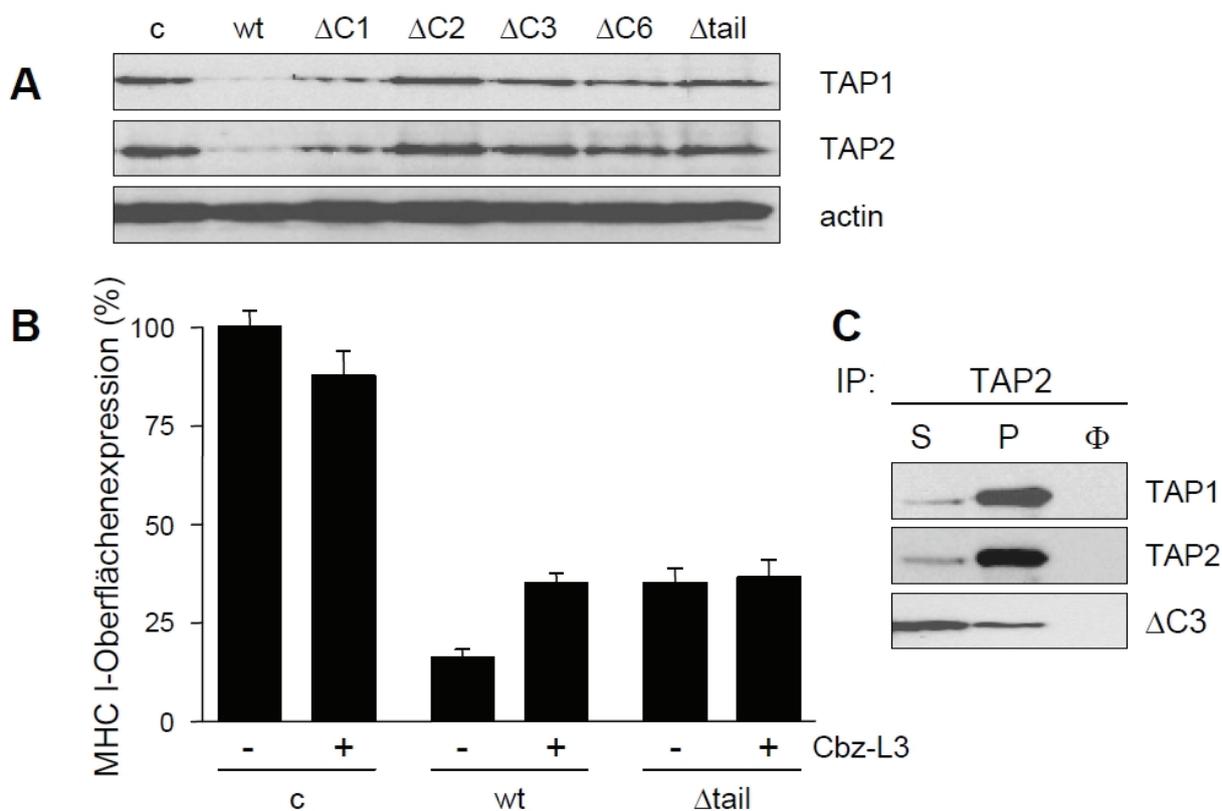


**Abbildung 29. Transport-Inhibition nach Stimulation mit IFN- $\gamma$**

HeLa-Zellen wurden 24 h nach transienter Transfektion mit pIRES-EGFP-UL49.5 oder dem leeren Vektor (Kontrolle) für 48 h mit Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ , 500 U/ml) stimuliert. Die transfizierten Zellen wurden auf Basis ihrer grünen Fluoreszenz heraussortiert und mit Saponin semi-permeabilisiert. Der Transportassay wurde mit 1  $\mu$ M Fluorescein-markiertem Peptid RRYQNST $\Phi$ L ( $\Phi$ , Fluorescein-markiertes Cystein) für 3 min bei 32°C in Anwesenheit (gefüllte Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 10 mM MgATP mit  $1 \times 10^6$  Zellen durchgeführt.

Die Analyse von transient transfizierten, mit Interferon- $\gamma$  stimulierten und schließlich aussortierten Zellen zeigte deutlich, dass sowohl TAP1 als auch TAP2 durch BHV-1 UL49.5 degradiert werden (siehe Abbildung 30 A). Nach Transfektion mit dem UL49.5 Wildtyp-Protein sind weder TAP1 noch TAP2 nachzuweisen. Diese Degradation führt schlussendlich zur MHC I-Suppression, da nicht genügend Peptide in das ER transportiert und an der Zelloberfläche präsentiert werden können. Als Ladekontrolle wurde der Actin-Gehalt bestimmt. Um zu zeigen, dass die MHC I-Suppression auf proteasomale Degradation des PLC zurückzuführen ist, wurden mit pIRES-EGFP-UL49.5 transfizierte Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor Cbz-L3 behandelt. Da der proteasomale Inhibitor in DMSO gelöst ist, starb nach 24 h Inkubation ein Großteil der Zellen (80-90%) ab. Somit waren nicht genügend Zellen vorhanden, um diese zu sortieren und anschließend den TAP-Gehalt analysieren zu

können. Eine Analyse der MHC I-Oberflächenexpression konnte jedoch mit den verbleibenden Zellen durchgeführt werden, da hierfür nur 30.000 Zellen benötigt werden. Diese Analyse zeigte, dass nach Behandlung der Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor, die MHC I-Suppression bis auf das Level des UL49.5 $\Delta$ tail zurückgeht, bei welchem keine proteasomale Degradation zu beobachten ist (siehe Abbildung 30 B). Dies zeigt, dass ein Abbau durch das Proteasom bestimmter Komponenten des MHC I-Weges die Ursache für die MHC I-Suppression ist, die durch UL49.5 hervorgerufen wird.



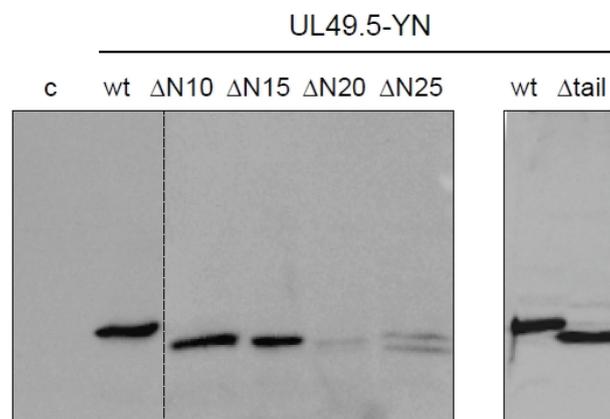
### Abbildung 30. Einfluss von C-terminal verkürztem UL49.5 auf TAP-Degradation

**A:** Nach transienter Transfektion von HeLa-Zellen mit pIRES-EGFP-UL49.5-Konstrukten wurden die Zellen mit IFN- $\gamma$  (500 U/ml) stimuliert und transfizierte Zellen auf Basis der grünen Fluoreszenz herausortiert. TAP1 und TAP2 wurden mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Hierfür wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Spur aufgetragen und auf einem 4-20% Acrylamid-Gradientengel (ReadyGel, Biorad) aufgetrennt. **B:** 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe des PE-gekoppelten, gegen MHC I-Moleküle gerichteten Antikörpers (W6/32) auf MHC I-Oberflächenpräsentation hin untersucht. Die Zellen wurden mit dem proteasomalen Inhibitor Cbz-L3 (20  $\mu$ M) inkubiert. Mock (leerer Vektor) transfizierte Zellen wurden als Kontrolle verwendet (c) und auf 100% gesetzt. **C:** Für Coimmunpräzipitationen mit Hilfe eines TAP2-spezifischen Antikörpers wurden Sf9-Mikrosomen verwendet. S, Solubilisat; P, Immunpräzipitat;  $\Phi$ , mock-Präzipitat (myc-spezifischer Antikörper).

Obwohl C-terminal verkürzte UL49.5-Mutanten keine proteasomale Degradation des TAP-Komplexes mehr einleiten konnten, waren diese Proteine noch an den TAP-Transporter gebunden, was durch Co-IPs mit *Sf9*-Mikrosomen nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 30 C).

### 3.3.4 Charakterisierung N-terminal verkürzter UL49.5-Mutanten

Da die C-terminale Domäne von UL49.5 alleine nicht in der Lage ist, eine proteasomale Degradation des TAP-Komplexes und somit eine vollständige MHC I-Suppression zu bewirken, müssen noch weitere Elemente von UL49.5 bei diesem Prozess eine Rolle spielen. Um den Einfluss der N-terminalen ER-luminalen Domäne zu untersuchen, wurden auch systematisch am N-Terminus verkürzte UL49.5-Mutanten generiert. Bei der Generierung dieser Konstrukte, wurde die N-terminale Signalsequenz, sowie die zwei darauf folgenden Reste ( $^1\text{RD}^2$ ) beibehalten, um eine korrekte Abspaltung der Signalsequenz zu ermöglichen. Danach wurden jeweils fünf Reste deletiert, sodass die Mutante UL49.5 $\Delta$ 5 einer Deletion der Aminosäuren 3-7 entspricht. Die Expression der einzelnen Deletionsmutanten wurde mittels Immunoblot nachgewiesen.



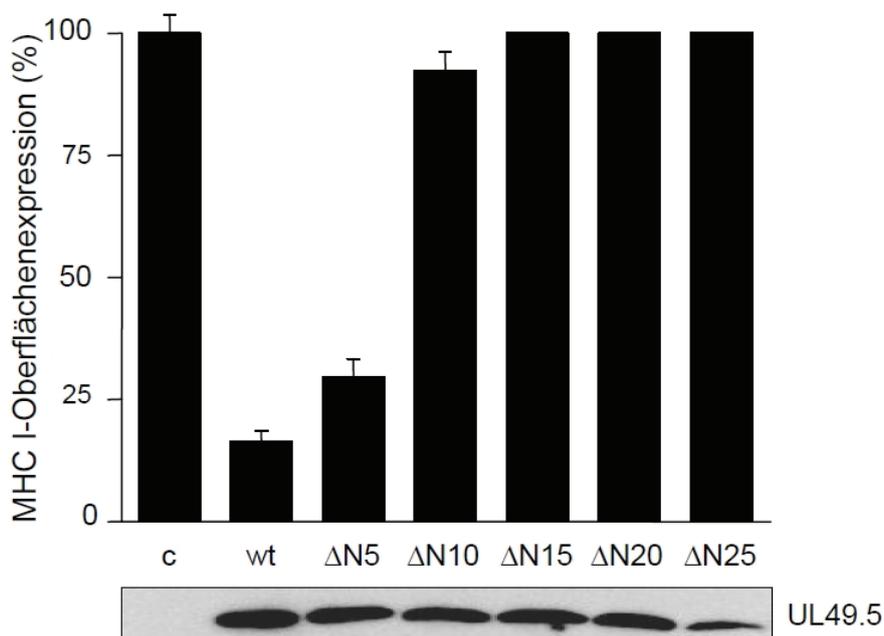
**Abbildung 31. Expression und Prozessierung der UL49.5-YN Fusionsproteine**

HeLa-Zellen wurden transient mit verschiedenen UL49.5-YN-Konstrukten transfiziert. 48h nach der Transfektion wurde die Expression der einzelnen Konstrukte mittels Western Blot mit dem  $\alpha$ -UL49.5<sub>C</sub>-Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle wurden Zellen analysiert, die mit dem leeren pIRES-EGFP-Vektor transfiziert wurden. Hierfür wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Spur aufgetragen und auf einem 4-20% Acrylamid-Gradientengel (ReadyGel, Biorad) aufgetrennt.

Aufgrund der geringen Größe der Proteine und schlechter Auflösung der SDS-PAGE im unteren Molekulargewichtsbereich, sind keine scharfen Banden für UL49.5 zu

erkennen. Um eine bessere Auflösung zu erreichen, wurden die Split-YFP-Fusionen der UL49.5-Mutanten (siehe 3.2.2) immunochemisch untersucht. Wie in Abbildung 31 zu erkennen, lässt sich der Größenunterschied der verkürzten UL49.5-Mutanten dank Fusion des Split-YFP deutlich nachweisen. Zusätzlich erkennt man eine Prozessierung der einzelnen Proteine. Interessanterweise ist das Expressionslevel für UL49.5 $\Delta$ 20 und UL49.5 $\Delta$ 25 schlechter als für die anderen verkürzten UL49.5-Proteine. Des Weiteren ist deutlich erkennbar, dass diese um 20 bzw. 25 Aminosäuren verkürzten Proteine nicht mehr vollständig prozessiert werden können, da bei diesen Konstrukten eine Doppelbande zu sehen ist. Hierbei entspricht die obere Bande der unprozessierten Form des Proteins und die untere Bande der prozessierten Form des Proteins, bei dem die Signalsequenz abgespalten wurde.

Als nächstes wurde der Einfluss der N-terminal verkürzten UL49.5-Proteine auf die MHC I-Oberflächenexpression untersucht. Erstaunlicherweise zeigten Mutanten, bei denen 10 oder mehr Aminosäuren deletiert wurden, keinen Effekt auf die Expression der MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche (siehe Abbildung 32).

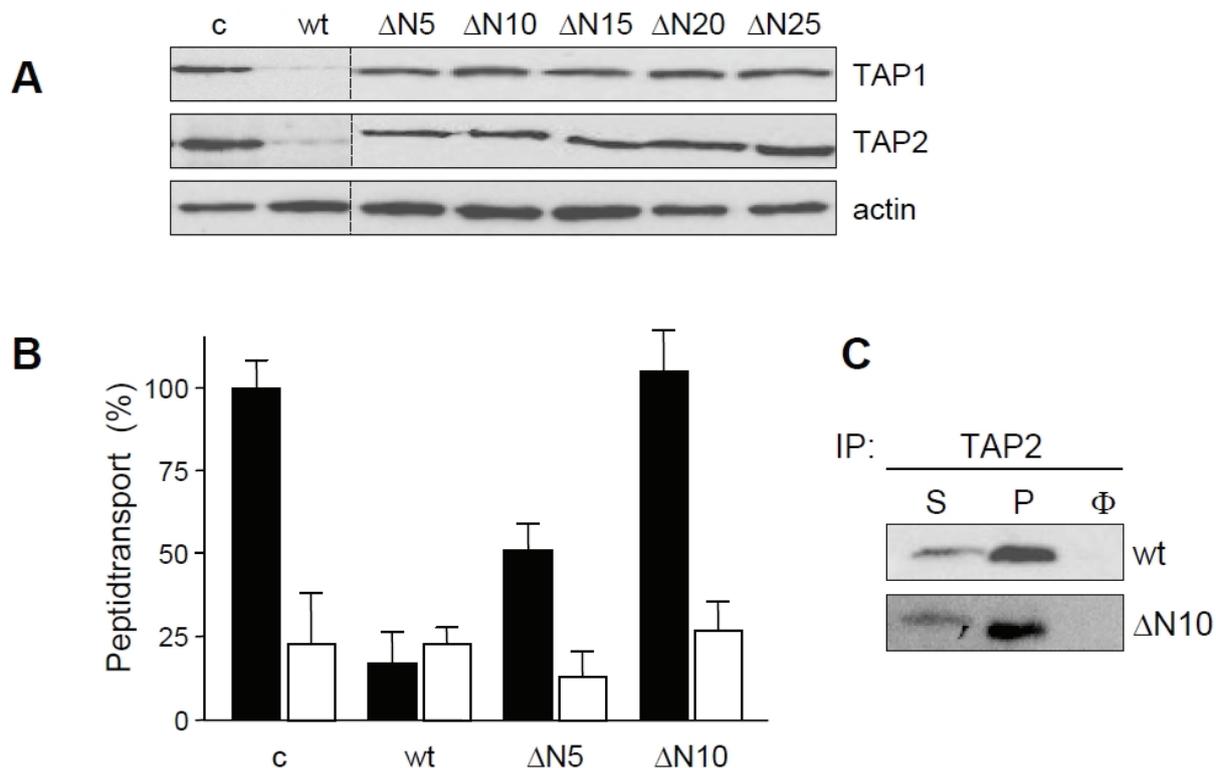


**Abbildung 32. MHC I-Suppression durch N-terminal verkürztes UL49.5**

Mit pIRES-EGFP-UL49.5 Konstrukten transient transfizierte HeLa-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Hilfe des PE-gekoppelten, gegen MHC I-Moleküle gerichteten Antikörpers (W6/32) auf MHC I-Oberflächenpräsentation hin untersucht. Mock (leerer Vektor) transfizierte Zellen wurden als Kontrolle verwendet (c) und auf 100% gesetzt. Die Expression der einzelnen Konstrukte wurde mittels Immunoblotting mit dem  $\alpha$ -UL49.5<sub>c</sub>-Antikörper nachgewiesen. Hierfür wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Spur aufgetragen und auf einem 4-20% Acrylamid-Gradientengel (ReadyGel, Biorad) aufgetrennt.

Die UL49.5-Mutante, die um fünf Aminosäuren N-terminal verkürzt ist, weist einen intermediären Phänotyp auf, der zwischen dem Wildtyp-Protein und der Negativkontrolle liegt. Weiterhin konnte die Expression der einzelnen N-terminalen Verkürzungen mittels Immunoblotting nachgewiesen werden. Die MHC I-Oberflächenexpression entspricht bei diesen Mutanten der MHC I-Expression von Kontrollzellen, die mit dem leeren pIRES-EGFP-Vektor transfiziert wurden.

Die N-terminal verkürzten UL49.5-Mutanten wurden ebenfalls auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die proteasomale Degradation des TAP-Komplexes einzuleiten. Nach transienter Transfektion, Stimulation mit Interferon- $\gamma$  und anschließendem Sortieren der transfizierten Zellen aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz, wurde die Expression von TAP1 und TAP2 immunochemisch untersucht. Interessanterweise ist schon die um fünf Aminosäuren verkürzte UL49.5-Mutante stark in ihrer Fähigkeit eingeschränkt, die proteasomale Degradation des TAP-Komplexes einzuleiten (siehe Abbildung 33 A). Diese Ergebnisse wurden auch mittels eines ATP-abhängigen Peptid-Transportes bestätigt. Für diesen Versuch wurden die Zellen nach transienter Transfektion aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz aussortiert, mit Hilfe von Saponin semi-permeabilisiert und schließlich für die Untersuchung des Peptid-Transportes eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass die Transportinhibition durch UL49.5 bei der um zehn Aminosäuren verkürzten UL49.5-Variante nicht mehr vorhanden war. Die um fünf Aminosäuren verkürzte UL49.5-Mutante zeigte auch hier einen intermediären Phänotyp, da die Transportrate zwischen der des wildtyp-Proteins und der der inaktiven Variante (N $\Delta$ 10) lag (siehe Abbildung 33 B). Um sicherzustellen, dass die N-terminal verkürzten Proteine noch an den TAP-Komplex binden, wurden Co-IPs mit Insektenzell-Mikrosomen durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass sowohl die um fünf Aminosäuren als auch die um zehn N-terminale Aminosäuren verkürzten UL49.5-Proteine noch an den TAP-Komplex binden (siehe Abbildung 33 C). Dieses Ergebnis bestätigt nochmals die Daten, die mit BiFC gewonnen wurden (siehe Abbildung 22). In zwei unterschiedlichen Systemen konnte somit nachgewiesen werden, dass sowohl N-terminal als auch C-terminal verkürzte UL49.5-Varianten noch mit dem TAP-Komplex interagieren.



**Abbildung 33. Einfluss von N-terminal verkürztem UL49.5 auf TAP-Degradation**

**A:** Nach transienter Transfektion von HeLa-Zellen mit pIRES-EGFP-UL49.5-Konstrukten wurden die Zellen mit IFN- $\gamma$  (500 U/ml) stimuliert und aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz herausortiert. TAP1 und TAP2 wurden mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Hierfür wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Spur aufgetragen und auf einem 4-20% Acrylamid-Gradientengel (ReadyGel, Biorad) aufgetrennt. **B:** Transient transfizierte HeLa-Zellen wurden herausortiert und mit Saponin semi-permeabilisiert.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden für einen Transportassay mit  $1 \mu\text{M}$  Fluorescein-markiertem Peptid RRYQNST $\Phi$ L ( $\Phi$ , Fluorescein-markiertes Cystein) für 3 min bei  $32^\circ\text{C}$  in Anwesenheit (gefüllte Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 10 mM MgATP eingesetzt. **C:** Sf9-Mikrosomen wurden für Coimmunpräzitationen mit Hilfe eines TAP2-spezifischen Antikörpers eingesetzt. S, Solubilisat; P, Immunpräzipitat;  $\Phi$ , mock-Präzipitat (myc-spezifischer Antikörper).

### 3.4 Vergleich homologer varicelloviraler UL49.5-Proteine

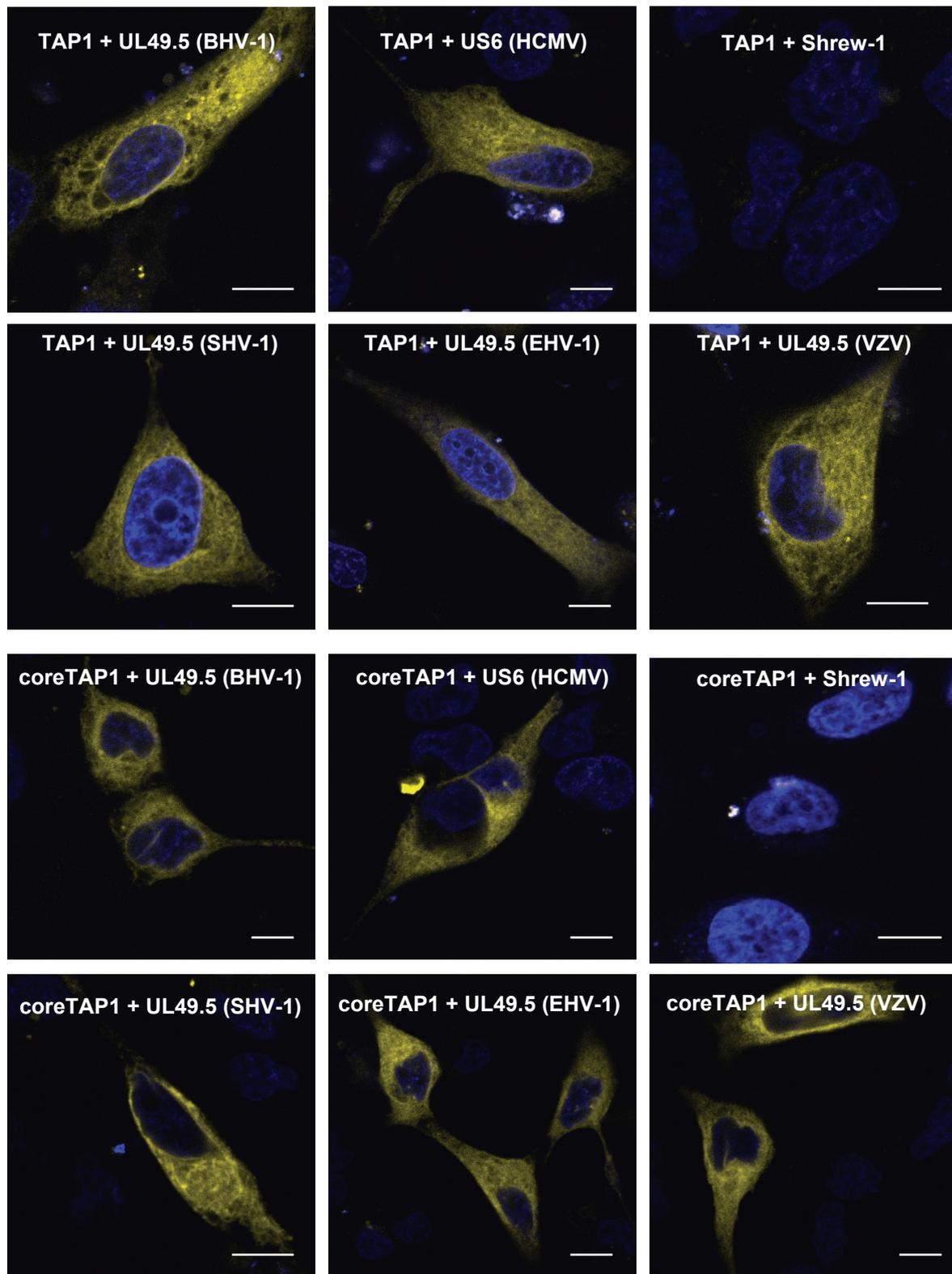
Das UL49.5-Protein ist innerhalb der Herpesviren stark konserviert, wobei interessanterweise nur UL49.5-Homologe von Herpesviren des Genus Varicellovirus einen inhibitorischen Effekt auf den TAP-Transporter haben. Erstaunlicherweise unterscheiden sich auch die Inhibitionsmechanismen der varicelloviralen UL49.5-Homologe. Das BHV-1 UL49.5 ist das einzige Protein, das die proteasomale Degradation des TAP-Komplexes einleitet. Ein Sequenzvergleich homologer UL49.5-Proteine ist in Abbildung 34 dargestellt.

HHV3 (Q6QCP7) [75aa]	.....MQI	LFPCEDSSGE	PNFAER....	.NFWHASC	RGVYIDGSMI	TTLFYASLL	GVCVALISLA
MDV2 (Q89248) [95aa]	MGL SDIHVVCKV	LICVIASLVE	SRATSIDSGR	PIAVAG....	.NFWESTCSA	VGVSIAFSSG	FSVLFYLGIV
MDV2 (Q782P4) [95aa]	MGL SDIHVVCKV	LICVIASLVE	SRATSIDSGR	PIAVAG....	.NFWESTCSA	VGVSIAFSSG	FSVLFYLGIV
MHV1.1 (Q77Q55) [95aa]	MGL MDIHNAVCSL	VIGVAILIAT	SQATFVDWGS	SITSMG....	.DFWESTCSA	VGVSIAFSSG	FSVLFYMLIV
GHV1 (Q69317) [95aa]	MGL MDIHNAVCSL	VIGVAILIAT	SQATFVDWGS	SITSMG....	.DFWESTCSA	VGVSIAFSSG	FSVLFYMLIV
MHV1 (Q9DH60) [94aa]	MGS VGVHHISPSW	SVYVIWICV	HVVLAVDGER	SIAGA....	.DFWSTCSA	VGVSIAFSSG	FSVLFYLGIA
BHV1.1 (Q77CE4) [96aa]	.....MPRS	PLIVAVVAAA	LFAIVRGRDP	LLDAMRREGA	MDFWSAGCYA	RGVPLSEPPQ	ALVVVYVALT
BHV1 (Q89806) [96aa]	.....MPRS	PLIVAVVAAA	LFAIVRGRDP	LLDAMRREGA	MDFWSAGCYA	RGVPLSEPPQ	ALVVVYVALT
BHV5.1 (Q6X261) [95aa]	.....MSRS	LLVVLATAA	LFAMVRLDP	LLDAMRREGA	MDFWSAGCYA	RGVPLSEPPQ	ALVVVYVALT
SHV1 (Q9IF47) [98aa]	MVS SARLSLTLVA	ALCAL..VTP	ALSSIVFSEG	SLPLLEERS	TSFWSAACAA	RGVPLDQPTA	AAVTFYICLL
SHV1.1 (Q87088) [98aa]	MVS SARLSLTLVA	ALCAL..VAP	ALSSIVSTEG	PLPLLEERS	INFWNAACAA	RGVPLDQPTA	AAVTFYICLL
EHV4 (Q66598) [100aa]	MLS ARLVALAILT	CLLVVPLTR	GASGDLEAKQ	RLDVAREER	RDFWHAACSG	HGFPITPST	AATLFYVSL
EHV4.1 (O39252) [100aa]	MLS ARLVTLAILT	CLLVVPLTR	GASGDLEAKQ	RLDVAREER	RDFWHAACSG	HGFPITPST	AATLFYVSL
EHV1 (P28980) [100aa]	MLS TRFVTLAILA	CLLVVPLTR	GAGGDPGVKQ	RIDVAREER	RDFWHAACSG	HGFPITPST	AATLFYVSL
EHV1.1 (P84449) [100aa]	MLS TRFVTLAILA	CLLVVPLTR	GAGGDPGVKQ	RIDVAREER	RDFWHAACSG	HGFPITPST	AATLFYVSL
HHV3 (Q6QCP7) [75aa]	YHACFRLEFR	SVLRSTW...	...	...	...	...	...
MDV2 (Q89248) [95aa]	YHACFRLETA	SMFDDGW...	...	...	...	...	...
MDV2 (Q782P4) [95aa]	YHACFRLETA	SMFDDGW...	...	...	...	...	...
MHV1.1 (Q77Q55) [95aa]	YHACFRLETA	DMFKEEW...	...	...	...	...	...
GHV1 (Q69317) [95aa]	YHACFRLETA	DMFKEEW...	...	...	...	...	...
MHV1 (Q9DH60) [94aa]	YSACFRLETA	DMFKEEW...	...	...	...	...	...
BHV1.1 (Q77CE4) [96aa]	YGLCFRLMGA	SGPNKESRG	RG	...	...	...	...
BHV1 (Q89806) [96aa]	YGLCFRLMGA	SGPNKESRG	RG	...	...	...	...
BHV5.1 (Q6X261) [95aa]	YRLCFRLMSA	GGPNKAVRG	RG	...	...	...	...
SHV1 (Q9IF47) [98aa]	TRTCTRLMHT	SPAGRRV...	...	...	...	...	...
SHV1.1 (Q87088) [98aa]	TRTCTRLMHA	SPAGRRV...	...	...	...	...	...
EHV4 (Q66598) [100aa]	YRAFLRIVTL	EMLRHLH...	...	...	...	...	...
EHV4.1 (O39252) [100aa]	YRAFLRIVTL	EMLRHLH...	...	...	...	...	...
EHV1 (P28980) [100aa]	YRAVLRIVTL	EMLQHLH...	...	...	...	...	...
EHV1.1 (P84449) [100aa]	YRAVLRIVTL	EMLQHLH...	...	...	...	...	...

**Abbildung 34. Sequenzvergleich homologer UL49.5-Proteine**

Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm MultAlign; Version 5.4.1 (Corpet, 1988) erstellt. Die putative Transmembranregion ist grau hinterlegt. Die Hydrophobizitätsdaten für die Vorhersage der TM-Bereiche wurden mit dem Verfahren nach Kyte-Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) bei einer Fenstergröße von 22 Aminosäuren erzeugt. Die Sequenz des BHV-1 UL49.5-Proteins ist blau hervorgehoben. Alle Sequenzen wurden der UniProtKB/TrEMBL Datenbank entnommen (HHV: human herpesvirus, MDV: Marek's disease virus, GHV: gallid herpesvirus, MHV: mouse cytomegalievirus, SHV: suid herpesvirus/ pseudorabiesvirus, EHV: equine herpesvirus).

Um zunächst die Interaktion der homologen UL49.5-Proteine mit dem TAP-Komplex *in vivo* zu untersuchen, wurden die einzelnen Proteine mittels BiFC analysiert. Hierfür wurde erneut der YC-Teil des YFP an den N-Terminus von TAP1 oder coreTAP1 und der YN-Teil des YFP an den C-Terminus von UL49.5 fusioniert, jeweils durch einen flexiblen Glycin-Serin-Linker separiert. Die Ergebnisse der Interaktionsanalyse sind in Abbildung 35 dargestellt.

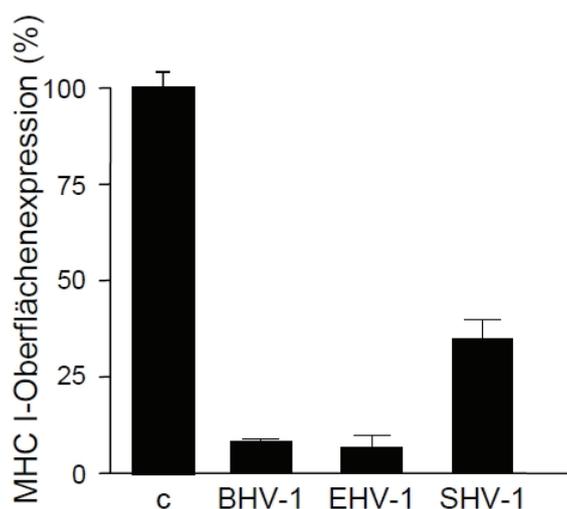


**Abbildung 35. In vivo Interaktion zwischen TAP1 und UL49.5-Homologen (BiFC)**

HeLa-Zellen wurden transient mit YC-TAP1 und UL49.5-YN cotransfiziert. Als Kontrolle wurde auch die Interaktion von US6 (HCMV) analysiert. Shrew-1 wurde als Negativkontrolle genutzt. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen lebend mikroskopiert und der Zellkern mit DAPI angefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Für die Interaktionsstudie wurden UL49.5-Proteine des BHV-1 mit UL49.5 des Schweine-Herpesvirus (SHV-1), des Pferde-Herpesvirus (EHV-1) und des humanen Varicella-Zostervirus (VZV) verglichen. Interessanterweise interagieren alle UL49.5-Homologe sowohl mit dem Wildtyp-TAP1 als auch mit dem N-terminal verkürzten coreTAP1, was durch eine gelbe Fluoreszenz in einem perinukleären Kompartiment nachgewiesen wurde. Als Positivkontrolle wurde jeweils das Typ-I-Membranprotein US6 (HCMV) untersucht, das bekannterweise mit dem TAP-Komplex interagiert. Als Negativkontrolle wurde wieder das Shrew-1-Protein analysiert, ebenfalls ein Typ-I-Membranprotein, das keine Interaktion mit dem TAP-Komplex zeigt. Ähnliche Ergebnisse konnten durch Co-IPs mit retroviral transduzierten MJS-Zellen gewonnen werden (Koppers-Lalic et al, 2008).

Als nächster Schritt wurde der Effekt der verschiedenen UL49.5-Homologe auf die MHC I-Oberflächenpräsentation untersucht. Hierfür wurden retroviral transduzierte humane MJS-Zellen analysiert (von E. Wiertz zur Verfügung gestellt). Im Vorfeld konnte bereits gezeigt werden, dass die UL49.5-Proteine des CHV (*canine herpesvirus*) und VZV zu keiner Herunterregulierung von MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche führen, da diese den TAP-Komplex nicht inhibieren aber trotzdem mit diesem interagieren. Für die UL49.5-Homologen aus dem SHV-1 und EHV-1 konnten inhibitorische Effekte nachgewiesen werden (Koppers-Lalic et al, 2008).

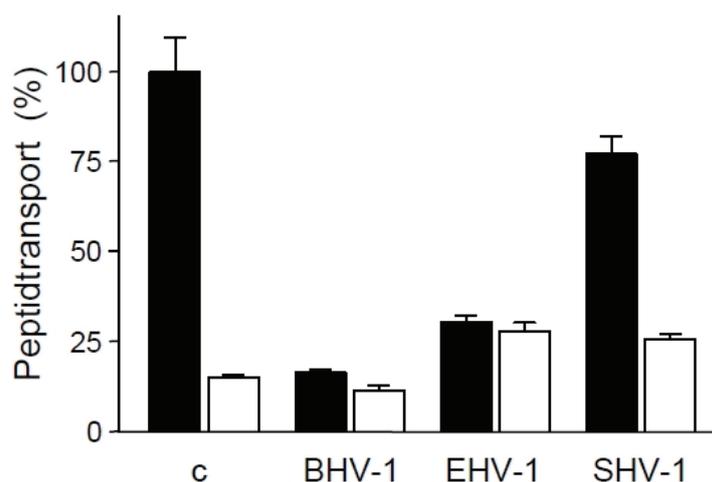


**Abbildung 36. MHC I-Suppression durch varicellovirale UL49.5-Proteine**

Retroviral transduzierte MJS-Zellen wurden mit Hilfe des PE-gekoppelten, gegen MHC I-Moleküle gerichteten Antikörpers (W6/32) auf MHC I-Oberflächenpräsentation hin untersucht. Mock transduzierte Zellen (WOS) wurden als Kontrolle verwendet (c) und auf 100% gesetzt.

Wie in Abbildung 36 dargestellt zeigten alle UL49.5-Homologe einen Effekt auf die MHC I-Oberflächenexpression, da bei allen Proteinen eine mehr oder weniger deutliche Suppression der MHC I-Moleküle nachzuweisen ist. Das SHV-1 UL49.5 hatte den schwächsten Effekt in humanen Zellen. Es konnte aber gezeigt werden, dass das Protein in den Schweine-Zellen eine mit UL49.5 BHV-1 und EHV-1 in bovinene bzw. equinen Zellen vergleichbare Inhibition zeigt.

Um zu analysieren, ob die MHC I-Suppression auf TAP-Inhibition zurückzuführen ist, wurden Transportstudien mit den retroviral transduzierten humanen Zellen durchgeführt. Von den Zellen wurden zunächst Membranen präpariert und anschließend auf eine identische Proteinkonzentration eingestellt. Diese Membranen wurden dann für den Transportassay eingesetzt, als Kontrolle wurden Membranen von Mock-transduzierte Zellen (WOS) analysiert.

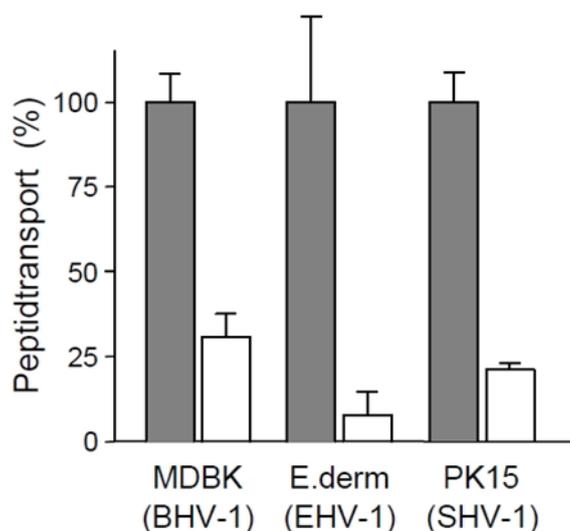


#### Abbildung 37. Transport-Inhibition durch UL49.5-Homologe in MJS-Zellen

Der Transportassay wurde mit 1  $\mu$ M Fluorescein-markiertem Peptid RRYQNST $\Phi$ L ( $\Phi$ , Fluorescein-markiertes Cystein) für 3 min bei 32°C in Anwesenheit (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 10 mM MgATP mit 30  $\mu$ l Membranen (entspricht  $1,7 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz) durchgeführt. Es wurden stabile MJS-Zellen, die mit UL49.5-Proteinen aus BHV-1, EHV-1 oder SHV-1 retroviral transduziert wurden, untersucht. Mock-transduzierte MJS-Zellen wurden als Kontrolle (c) eingesetzt.

In Abbildung 37 sind die Ergebnisse der Transport-Studien dargestellt. Bei allen untersuchten UL49.5-Homologen ist eine Reduktion des TAP-abhängigen Peptidtransports nachzuweisen. Hierbei ist der inhibitorische Effekt des BHV-1 und des EHV-1 Proteins deutlich stärker als der Effekt des SHV-1 Proteins, was die Daten aus der MHC I-Oberflächenanalyse unterstützt. Der Effekt der MHC I-Suppression ist somit höchstwahrscheinlich auf eine TAP-Inhibition zurückzuführen.

Um sicherzustellen, dass das SHV-1 UL49.5 tatsächlich einen Effekt auf den TAP-abhängigen Peptidtransport zeigt, wurden Rinder- (*Madin-Darby bovine kidney cells*, MDBK), Pferde- (*equine epithelial cells*, E.derm) und Schweine-Zellen (*porcine kidney cells*, PK15) mit den dazugehörigen UL49.5-Proteinen retroviral transduziert. Es wurden jeweils von nicht-transduzierten und von mit UL49.5 transduzierten Zellen Membranen präpariert und anschließend für den Transportassay eingesetzt.

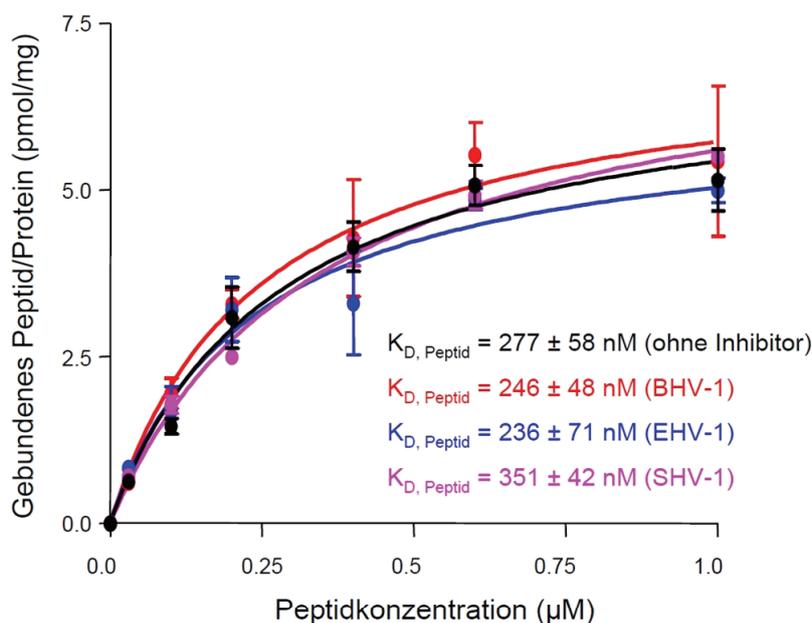


### Abbildung 38. Transport-Inhibition durch UL49.5-Homologe

Der Transportassay wurde mit 1  $\mu\text{M}$  Fluorescein-markiertem Peptid RRYQNST $\Phi$ L ( $\Phi$ , Fluorescein-markiertes Cystein) für 3 min bei 32°C in Zellen ohne Virusprotein (graue Balken) und in Zellen mit dem jeweiligen UL49.5-Protein retroviral transduziert (weiße Balken) mit 30  $\mu\text{l}$  Membranen ( $1,7 \times 10^6$  Zellen) durchgeführt. Die Werte für die Apyrase-Messung wurden bereits von den jeweiligen Messwerten abgezogen. Außerdem wurden die Werte auf nicht-transduzierte Zellen normalisiert.

Wie in Abbildung 38 dargestellt, zeigen alle UL49.5-Proteine eine starke Transport-Inhibition in den jeweiligen Zielzellen. Die Aktivität der einzelnen Proteine lag zwischen 75% Inhibition für das BHV-1 UL49.5 in Rinderzellen und etwa 90% Transportinhibition für das EHV-1 UL49.5 in Pferdezellen. Auch das SHV-1 UL49.5-Protein zeigt in den Schweinezellen eine Transportinhibition von etwa 80%. Hierbei wird nicht wie in MJS-Zellen die Transportaktivität von humanem TAP gemessen, sondern die Transportrate von Rinder-, Pferde- und Schweine-TAP analysiert. Interessanterweise inhibiert das SHV-1 UL49.5 kein humanes TAP, sondern nur Schweine-TAP. Das BHV-1 und das EHV-1 UL49.5 hingegen inhibieren gleichermaßen humanes wie auch Rinder- bzw. Pferde-TAP. Hierbei wird eine vergleichbare Substratspezifität der unterschiedlichen TAP-Proteine für das verwendete Peptid vorausgesetzt.

Bevor Peptide durch den TAP-Komplex in das ER-Lumen transportiert werden können, müssen diese Peptide an den TAP-Transporter binden. Um zu untersuchen, ob der inhibitorische Effekt durch das EHV-1 UL49.5 und das SHV-1 UL49.5 auf eine Beeinträchtigung der Peptidbindung an TAP zustande kommt, wurden Membranen von retroviral transduzierten MJS-Zellen präpariert und für Peptidbindungsanalysen eingesetzt. Hierfür wurden die Membranen mit einem radioaktiv ( $^{125}\text{J}$ )-markierten Peptid inkubiert. Die Ergebnisse der Peptidbindungsstudien sind in Abbildung 39 dargestellt.



**Abbildung 39. Einfluß von UL49.5 auf Peptidbindung an TAP**

Um die Peptidbindung zu analysieren wurden die MJS-Membranen mit steigender Konzentration vom radioaktiv-markierten Peptid  $\text{RR}^{125}\text{IYQKSTEL}$  inkubiert. Die Spezifität der Bindung wurde in Anwesenheit des TAP-Inhibitors ICP47 (HSV-1) in 200-fachem molaren Überschuss nachgewiesen. Die Menge spezifisch gebundenes Peptid pro pmol Protein ist gegen die Peptidkonzentration aufgetragen. Daraufhin wurde der  $K_D$  bestimmt.

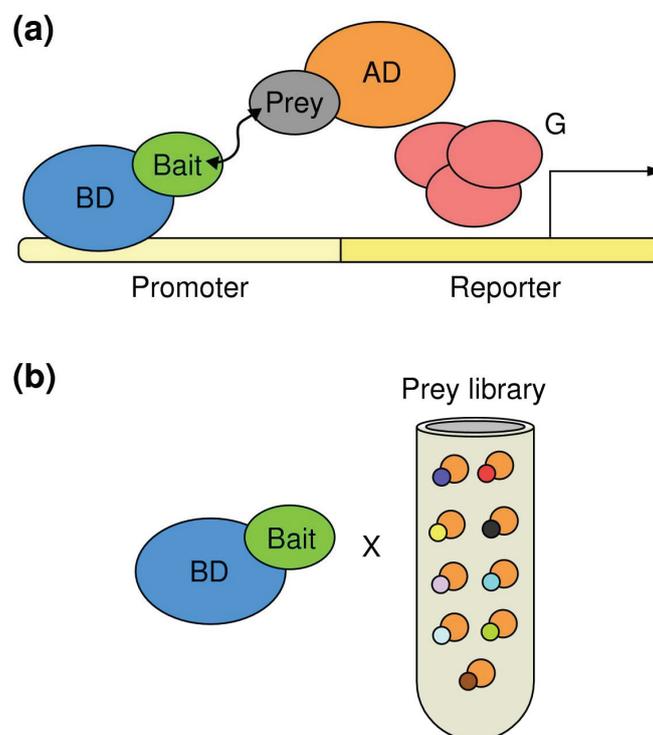
Unter allen gemessenen Bedingungen unterschied sich die Peptidbindungskapazität ( $B_{\text{max}}$ ) für die unterschiedlich retroviral transduzierten MJS-Zellen nicht. Interessanterweise wurde auch die Bindungsaffinität ( $K_D$ -Wert) nicht durch die viralen Proteine beeinflusst. Das bedeutet, dass die Peptidbindungsstelle am TAP-Transporter nicht durch den viralen Faktor besetzt oder modifiziert wird. Die Transportinhibition des TAP-Komplexes durch die unterschiedlichen UL49.5-Proteine ist somit nicht auf eine Beeinträchtigung der Peptidbindung zurückzuführen.

### 3.5 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit UL49.5

Das BHV-1 UL49.5-Protein ist das einzige Protein innerhalb der UL49.5-Homologen, das die proteasomale Degradation des TAP-Komplexes einleitet. Verantwortlich für diese Degradation ist der C-terminale Bereich des Proteins. Vergleicht man die Sequenzen homologer UL49.5-Proteine, fällt auf, dass die zytosolische Domäne des BHV-1 Proteins um fünf Aminosäuren (SRGRG) länger ist, als alle anderen Proteine. Es ist vorstellbar, dass diese Domäne des Proteins für die Rekrutierung von Faktoren zuständig ist, die eine wichtige Rolle in der Ubiquitylierung von Proteinen spielen (wie z.B. Ubiquitin-Ligasen). Um Informationen über die Interaktionen des C-terminalen Schwanzes mit anderen Proteinen zu gewinnen, wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H, *yeast two hybrid*) eingesetzt, eine *in vivo*-Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in *Saccharomyces cerevisiae* (Fields & Song, 1989). Grundlage hierfür ist der Transkriptionsfaktor GAL4, der zwei verschiedene Domänen besitzt, eine zur Bindung an die DNA (Bindedomäne, GAL4-BD) und eine, die die Transkription aktiviert (Aktivierungsdomäne, GAL4-AD). Wenn beide Domänen nach erfolgreicher Interaktion fusionierter Proteine zusammenkommen, ist der Transkriptionsfaktor wieder aktiv. Mit Hilfe dieser Domänen werden Fusionsproteine generiert. Das GAL4-BD wird mit dem Protein verknüpft, für das ein potentieller Bindungspartner gefunden werden soll (*Bait*-Protein, Köderprotein). Die andere Domäne GAL4-AD wird mit einem möglichen Bindepartner verknüpft (*Prey*-Protein, Beuteprotein). Ein Hefestamm, der kein funktionierendes gal4-Gen hat und ein oder mehrere Reportergene trägt, denen eine Bindestelle für den GAL4-Transkriptionsfaktor vorgeschaltet ist, wird mit beiden Konstrukten transformiert. Als Reporter dieser Interaktion fungieren Gene, die entweder bestimmte Aminosäuren bzw. Basen herstellen können (z. B. Histidin, Uracil oder Adenin) oder eine optische Erkennung ermöglichen (z. B. ein Farbumschlag katalysiert durch das lacZ-Gen). Wenn es zwischen beiden Proteinen zu einer Interaktion kommt, resultiert daraus in der Regel eine funktionelle Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors, was eine Expression der Reportergene zur Folge hat. Letzteres kann durch Wachstum auf entsprechenden Selektionsmedien nachgewiesen werden (zusammengefasst in (Cho et al, 2004), zur Übersicht siehe Abbildung 40).

Problematisch beim klassischen Y2H-System ist jedoch, dass die Interaktion der zu untersuchenden Proteine im Zellkern der Hefe stattfinden muss, da die Transkription

nur dort ablaufen kann. Es ist aber möglich, dass sich Proteine dort anders falten als in dem Bereich der Zelle, in dem sie üblicherweise auftreten. Auch die Modifikationen der Hefe unterscheiden sich von den Prozessen in anderen eukaryotischer Organismen. Somit kann es zu falschen Versuchsergebnissen kommen: Proteine, die normalerweise nicht miteinander interagieren, können zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Proteine, die tatsächlich miteinander interagieren, können dies durch die veränderte Faltung im Zellkern nicht (falsch Negativ). Des Weiteren ist es möglich, dass zwei Proteine zwar im Y2H-Versuch interagieren, aber im Zellzyklus, im Zellorganell oder im Zelltyp nicht gleichzeitig auftreten und deshalb nicht tatsächliche Interaktionspartner sein können.



#### Abbildung 40. Übersicht über das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Modell für das Hefe-Zwei-Hybrid-System. Die DNA-Binde-Domäne (BD) und die Transkriptions-Aktivierungsdomäne (AD) eines Transkriptionsfaktors werden jeweils an die zu untersuchenden Proteine fusioniert (*bait / prey*). Wenn beide Proteine interagieren, kann der Transkriptionsfaktor an einen Promotor eines Reportergens binden und dessen Transkription durch Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie (G) aktivieren. (b) *Library*-Hefe-Zwei-Hybrid-Screen. Unterschiedliche *prey*-Proteine werden auf ihre Interaktion mit dem *bait*-Protein hin untersucht. Diese werden in Hefe-Zellen transformiert, um die Interaktionspartner isolieren zu können (Giorgini & Muchowski, 2005).

Das klassische Y2H-System besitzt noch weitere Einschränkungen. So lassen sich bestimmte Proteine nicht in den Zellkern transportieren, wie beispielsweise

membranständige Proteine. Auch Proteinkomplexe, an denen mehr als zwei Proteine beteiligt sind, lassen sich mit klassischen Y2H-Experimenten nicht direkt untersuchen. Um diesen Problemen zu begegnen, wurden inzwischen modifizierte Hefe-Zwei-Hybrid-Systeme entwickelt, bei denen erst weitere Schritte die Rekonstitution des Transkriptionsfaktors ermöglichen. Auch gibt es inzwischen Systeme, die auf anderen Prinzipien beruhen, wie z. B. das Split-Ubiquitin System, das besonders für Interaktionsstudien von Membranproteinen interessant ist.

Der Y2H-Screen wurde im Labor von Prof. Dr. Ivan Dikic (Institut für Biochemie II, Universität Frankfurt) von S. Hecker mit einer humanen cDNA-Bibliothek durchgeführt. Als *bait*-Protein wurde der C-terminale Bereich des BHV-1 UL49.5-Proteins eingesetzt. Die Proteine, die bei dieser Analyse als potentielle Interaktionspartner identifiziert wurden sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

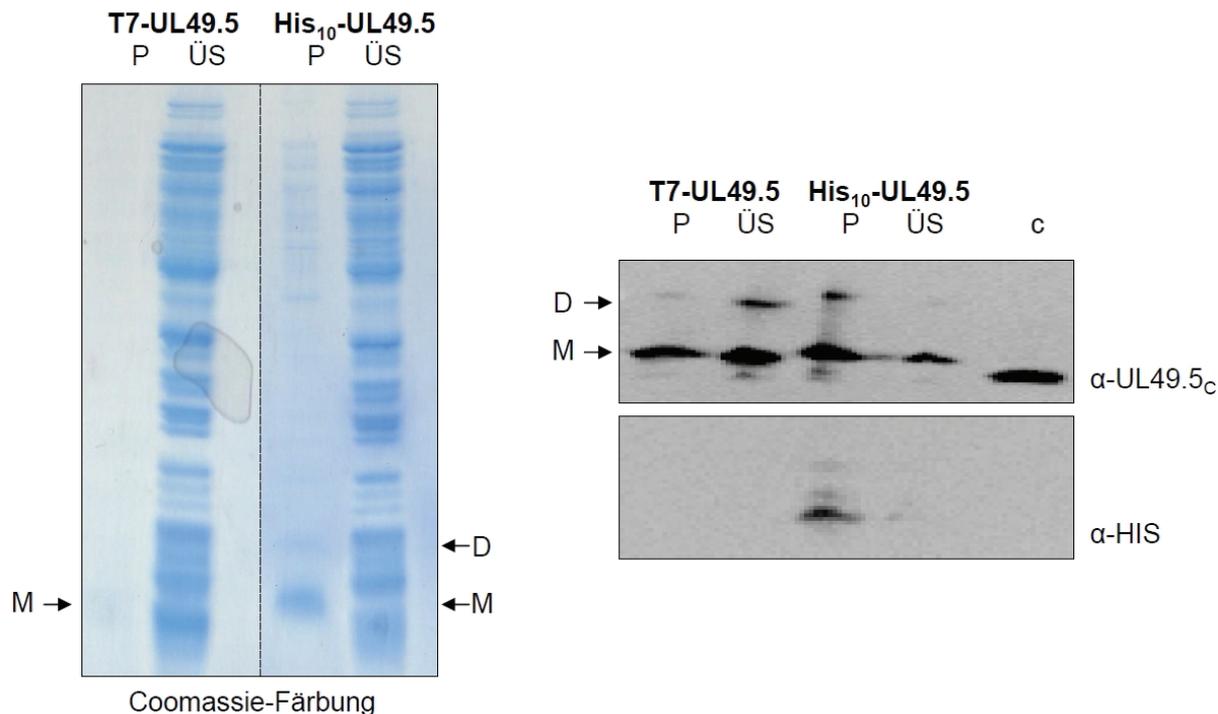
**Tabelle 27. Ergebnisse des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens**

<b>Protein</b>	<b>Zelluläre Lokalisation</b>
DNA replication licensing factor (MCM7)	bekanntes falsch Positiv
CDK inhibitor of cyclin A1 (INCA1)	bekanntes falsch Positiv
Methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2)	Zellkern
Splicing factor, arginine /serine-rich 5	Zellkern
Hypoxia Up-regulated 1 (HYOU1)	ER-Lumen

Neben bekannten Falsch-Positiven Proteinen wurden auch weitere Proteine als potentielle Interaktionspartner für den C-terminalen Bereich des BHV-1 UL49.5-Proteins identifiziert. Die Lokalisation dieser Proteine erlaubt jedoch keine physikalische Interaktion mit der C-terminalen Domäne von UL49.5, die im Zytosol lokalisiert ist. Da die identifizierten Proteine entweder im Zellkern oder im ER-Lumen lokalisiert sind, sind diese keine möglichen Interaktionspartner für UL49.5. Leider konnten mit diesem *Screening* keine Proteine identifiziert werden, die an der Ubiquitylierung/Degradation von Proteinen beteiligt sind. Das Y2H-System beschränkt sich nur auf lösliche Proteine, somit kann die Interaktion mit Membranproteinen nicht nachgewiesen werden. Diese Analyse wurde mit einem größeren Bereich des BHV-1 UL49.5-Proteins wiederholt, lieferte jedoch keine schlüssigen Ergebnisse.

### **3.6 Zellfreie Expression von UL49.5**

Um das UL49.5-Protein reinigen zu können, wurden verschiedene Varianten mit N- oder C-terminalen *tags* generiert. Leider konnten das His-getagte UL49.5-Protein nach der Expression in Insektenzellen nur sehr schwer aufgereinigt werden, da sich das Protein kaum in Detergenzien solubilisieren lässt (C. Schölz Diplomarbeit & J. Funke Diplomarbeit). Um die Aufreinigung von UL49.5 zu erleichtern und auch strukturelle Analysen (z.B. NMR) zu erlauben, wurde das Protein in einem zellfreien System exprimiert. Hierfür wurden sowohl eine T7-getagte als auch eine His<sub>10</sub>-getagte Variante (beides am N-Terminus des Proteins) generiert. In der Gruppe von V. Dötsch und F. Bernhard (Universität Frankfurt) wurde ein zellfreies System für die Expression von Membranproteinen optimiert. Mit Hilfe dieses Systems konnte bereits eine Vielzahl von Membranproteinen, unter anderem auch G-Protein gekoppelte Rezeptoren, exprimiert werden (Klammt et al, 2007a; Klammt et al, 2007b; Schwarz et al, 2008). Es handelt sich bei dieser Methode um ein gekoppeltes Transkriptions-/Translations-System, das auf einem *E. coli* S30-Extrakt basiert. Bei einer zellfreien Expression umgeht man das Problem von zytotoxischen Effekten, die häufig bei einer Überexpression zu beobachten sind. Mittels eines offenen zellfreien Systems lassen sich beliebig Zusätze zur Reaktion zugeben, die das synthetisierte Protein stabilisieren oder schützen können. Es ist so zum Beispiel möglich, Detergenzien oder Lipide direkt zur Reaktion zu geben, so dass das Membranprotein direkt in eine Detergenzien-Micelle hinein synthetisiert wird. Des Weiteren erlaubt das offene System die Zugabe verschiedener (z.B. radioaktiv oder fluoreszenz-) markierter Substanzen, um das Protein besser detektieren zu können (Klammt et al, 2004). Das Experiment wurde im Labor von V. Dötsch durch C. Klammt durchgeführt und das UL49.5-Protein wurde als Präzipitat nach der Translation gewonnen (siehe Abbildung 41). Das präzipitierte Protein kann in einer Detergenz-haltigen Lösung resuspendiert werden. Das UL49.5-Protein konnte in großen Mengen zellfrei exprimiert werden und auch mit verschiedenen Antikörpern immunochemisch detektiert werden. Dies bildet einen wichtigen Ausgangspunkt, um das Protein reinigen zu können und damit strukturelle Analysen durchzuführen (Koglin et al, 2006).



#### Abbildung 41. Zellfreie Expression von UL49.5

T7-UL49.5 und His<sub>10</sub>-UL49.5 wurden jeweils zellfrei exprimiert. Es wurden jeweils gleiche Mengen vom Präzipitat (P) und vom Überstand der Präzipitation (ÜS) aufgetragen (entsprechend 6 µl Reaktion). Die Proteine wurden mittels 12%iger SDS-PAGE getrennt und mit Hilfe von Coomassie-Blau angefärbt. Außerdem wurde UL49.5 mittels verschiedener Antikörper immunochemisch detektiert, die gegen den N-terminalen oder den C-terminalen Bereich des Proteins, oder den Histidintag gerichtet sind. Als Kontrolle (c) wurden UL49.5-haltige Sf9-Mikrosomen aufgetragen. M: Monomer, D: Dimer.

Bei der SDS-PAGE ist für das His<sub>10</sub>-UL49.5 eine deutliche Proteinbande im Präzipitat zu erkennen (siehe Pfeil). Für das T7-UL49.5 ist nur eine ganz schwache Bande im Präzipitat zu erkennen. Im Überstand der Translationsreaktion sind eine Vielzahl von Proteinbanden zu erkennen, die auf die unterschiedlichen Proteine aus dem *E. coli*-Extrakt zurückzuführen sind. Aus diesem Grunde ist es nicht möglich, im Überstand der Reaktion eine Proteinbande in der erwarteten Höhe zu erkennen. Um zu überprüfen, ob es sich bei der detektierten Proteinbande wirklich um das UL49.5-Protein handelt, wurden die Proben immunochemisch mit Antikörpern, die gegen den N-Terminus und C-Terminus von UL49.5, beziehungsweise gegen den Histidintag gerichtet sind, untersucht.

Bei der immunochemischen Untersuchung der *in vitro* translatierten Proteine war zu beobachten, dass das *in vitro* translatierte Protein, im Vergleich zum UL49.5, das in Insektenzellen exprimiert wurde, eine veränderte Laufeigenschaft aufweist. Das Protein läuft in der SDS-PAGE etwas oberhalb des Proteins aus Insektenzellen. Dies wurde auch bei Expression in HeLa-Zellen und nach *in vitro* Translation in RRL nachgewiesen. Bei Detektion mit dem Antikörper, der gegen UL49.5 gerichtet ist, sind zwei Proteinbanden zu erkennen, die wahrscheinlich dem Monomer und Dimer entsprechen (vergleiche Abbildung 17). Obwohl die Proben mit reduzierenden Reagenzien behandelt wurden, ist trotzdem auch dimeres Protein nachzuweisen. Das Dimer ist jedoch stärker vertreten, was auch aus dem Coomassie-Gel ersichtlich wird. Interessanterweise weist das His<sub>10</sub>-UL49.5 veränderte Laufeigenschaften in der SDS-PAGE auf, was auf eine erhöhte Proteinmenge zurückzuführen sein könnte. Der Antikörper, der gegen den Histidin-*tag* gerichtet ist, ist nicht so sensitiv wie der UL49.5-spezifische Antikörper, so dass die Bande für das HIS<sub>10</sub>-UL49.5 bei der Detektion mit dem His-spezifischen Antikörper viel schwächer ist. Aus diesem Grunde kann mit diesem Antikörper nur das Protein aus dem Präzipitat der Reaktion nachgewiesen werden.

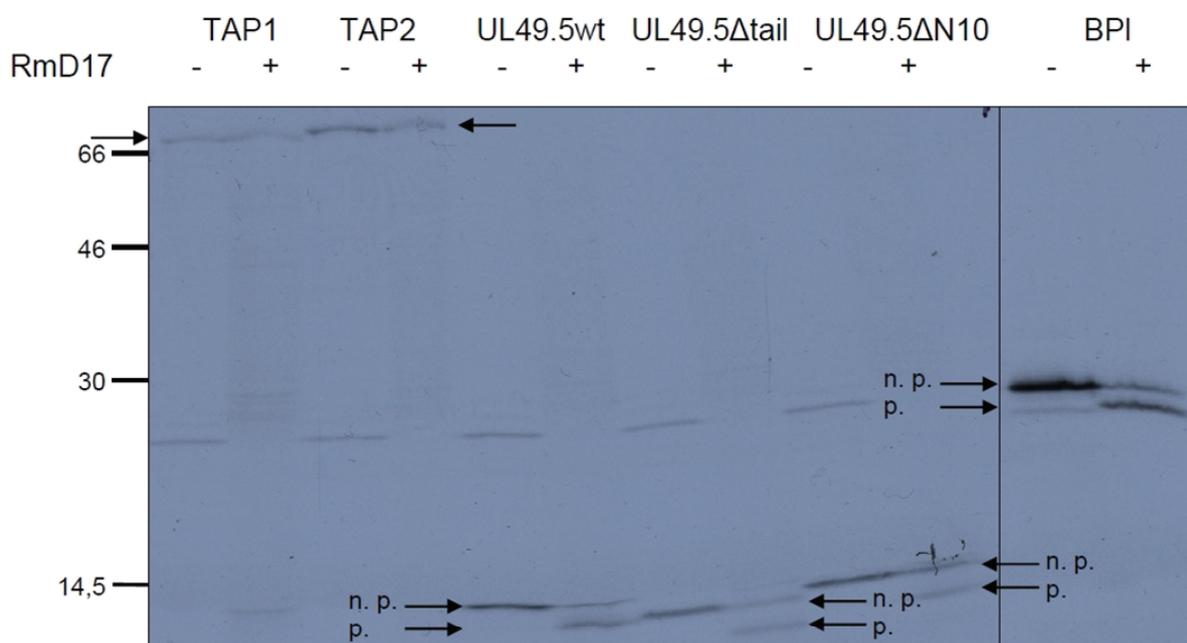
Da bei der Aufreinigung von UL49.5 keine Erfolge erzielt werden konnten, wurde UL49.5-vermittelte proteasomale Degradation näher untersucht. Hierfür wurde eine *in vitro* Translation in Anwesenheit von radioaktivem <sup>35</sup>S-Methionin genutzt, da diese den Vorteil hat, dass das Protein aufgrund eines radioaktiven Signals detektiert wird und keine Fusion eines *tags* an das Protein notwendig ist.

### **3.7 *In vitro* Translation und proteasomale Degradation von UL49.5**

Das UL49.5-Protein leitet die proteasomale Degradation des TAP-Komplexes ein. Wie diese Degradation jedoch initiiert oder kontrolliert wird, wurde noch nicht beschrieben. Um nähere Einblicke in den Prozess der UL49.5-vermittelten TAP-Degradation zu bekommen, wurden die Proteine *in vitro* synthetisiert. Im Labor von W. Skach (OHSU, Portland, USA) wurde die *in vitro* Translation in Kaninchen-Reticulozyten-Lysat (RRL) für Membranproteine, wie den ABC-Transporter CFTR optimiert. Es konnte sogar die proteasomale Degradation von CFTR und verschiedener Mutanten *in vitro* nachgestellt und wichtige Schritte dieses Prozesses aufgeklärt werden (siehe 1.5.3). Das Protein wird in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin synthetisiert und kann in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Membranen produziert werden. Während eines 3-monatigen Forschungsaufenthaltes an der OHSU (Portland, USA) im Labor von W. Skach sollte die *in vitro* Translation für den TAP-Komplex und UL49.5 etabliert werden, um die Funktionsweise des viralen Proteins nachvollziehen zu können. Ziel hierbei war es, eine Cotranslation für den TAP-Komplex und UL49.5 zu etablieren, um den Einfluß des viralen Proteins auf die Stabilität des TAP-Komplexes untersuchen zu können.

Alle Proteine wurden für die Expression in RRL in den pSP64-Vektor kloniert. Als erster Schritt wurden die verschiedenen Proteine *in vitro* translatiert. Zunächst wurde ausgehend von linearisierter Plasmid-DNA mRNA synthetisiert (siehe 2.8.1). Daraufhin wurde die Translation in RRL in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin und in An- und Abwesenheit von Hunde-Pankreas-Mikrosomen (RmD17) durchgeführt (siehe 2.8.2). Die Hunde-Pankreas-Mikrosomen haben sich als besonders geeignet für die *in vitro* Translation erwiesen. Sie erlauben eine hohe Membraninsertionseffizienz, aber auch eine korrekte co- oder post-translationale Prozessierung, wie zum Beispiel Abspaltung der Signalsequenz oder Glykosylierung der Proteine. Solche Protein-Modifikationen lassen sich bei einer SDS-PAGE an deutlich veränderten Migrationseigenschaften des Proteins erkennen. In Abbildung 42 sind die Ergebnisse der ersten *in vitro* Translationen dargestellt. Da nur bei dem *in vitro* translatierten Protein das radioaktive Methionin eingebaut wird, stammen alle radioaktiven Signale von dem translatierten Protein. Man kann deutlich erkennen, dass alle Proteine sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von RmD17-Membranen translatiert werden. Ein bekannter Effekt ist, dass die Zugabe von Membranen die Translations-

effizienz vermindert, was besonders im Fall von TAP1 und TAP2 deutlich wird. Als Kontrolle wurde das Rinder-Prolaktin (BPI, *bovine Prolaktin*) unter den gleichen Bedingungen translatiert. Dieses etwa 25 kDa große Protein wird im ER durch Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz prozessiert, was in Anwesenheit von Membranen als zusätzliche Bande zu sehen ist. Die obere Bande entspricht nicht-prozessiertem und die untere Bande prozessiertem Protein, bei dem die Signalsequenz abgespalten wurde. In Anwesenheit von Membranen sind zwei Banden nachzuweisen, da die Prozessierung nicht vollständig abläuft (etwa 70% Prozessierung, siehe Pfeile).

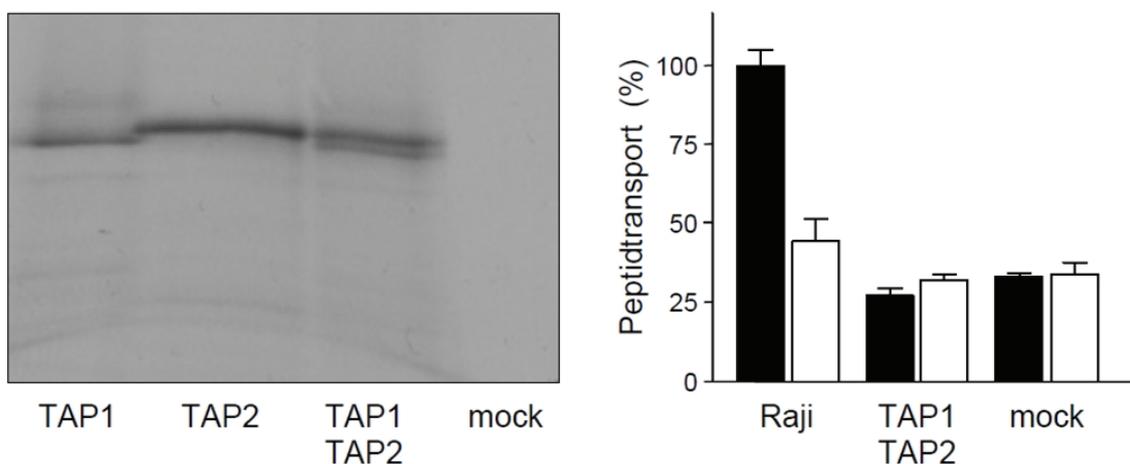


**Abbildung 42. *In vitro* Translation in Anwesenheit/Abwesenheit von Membranen**

Die Transkription erfolgte mit linearisierter Plasmid-DNA für 1 h bei 40°C. Die Translation in Anwesenheit oder Abwesenheit von Hunde-Pankreas Mikrosomen (RmD17) wurde für UL49.5 für 1 h und für die TAP-Proteine für 90 min bei 24°C durchgeführt. Es wurde jeweils 1 µl der Translationsreaktion auf ein SDS-Gradienten-Gel (12-17%) aufgetragen. Das radioaktive Signal wurde auf einem Autoradiographie-Film detektiert. n.p. nicht prozessiertes Protein; p. prozessiertes Protein.

Bei der Translation verschiedener UL49.5-Varianten ist ebenfalls in Abwesenheit von Membranen jeweils eine Bande des unprozessierten Proteins zu erkennen. In Anwesenheit von Membranen sind bei allen Mutanten zwei Banden zu sehen, was bedeutet, dass neben dem Wildtyp-Protein sowohl C-terminal verkürzte als auch N-terminal verkürzte Varianten korrekt im ER prozessiert werden.

Um den Einfluß von UL49.5 auf die Stabilität des TAP-Komplexes zu untersuchen, mussten mehrere Proteine zusammen cotranslatiert werden. Um zunächst einen funktionellen TAP-Transporter *in vitro* zu erhalten, wurden die Proteine TAP1 und TAP2 cotranslatiert. Erstaunlicherweise wurde bei jedem Experiment sowohl bei einzelnen Translationen als auch bei Cotranslationen das TAP2-Protein deutlich stärker translatiert als das TAP1-Protein, obwohl TAP2 in der Abwesenheit von TAP1 normalerweise instabil ist (Keusekotten et al, 2006). Durch das Einsetzen unterschiedlicher mRNA-Konzentrationen für die Translation konnte eine Cotranslation von TAP1 und TAP2 erreicht werden, was durch eine deutliche Doppelbande bei der SDS-PAGE zu erkennen war. Mit diesen Hunde-Pankreas-Mikrosomen wurden anschließend Transport-Studien durchgeführt. Leider konnte kein ATP-abhängiger Peptidtransport gemessen werden (siehe Abbildung 43). Dies könnte entweder auf fehlende Assemblierung der TAP-Untereinheiten oder auf ein zu geringes TAP-Expressionslevel zurückzuführen sein.



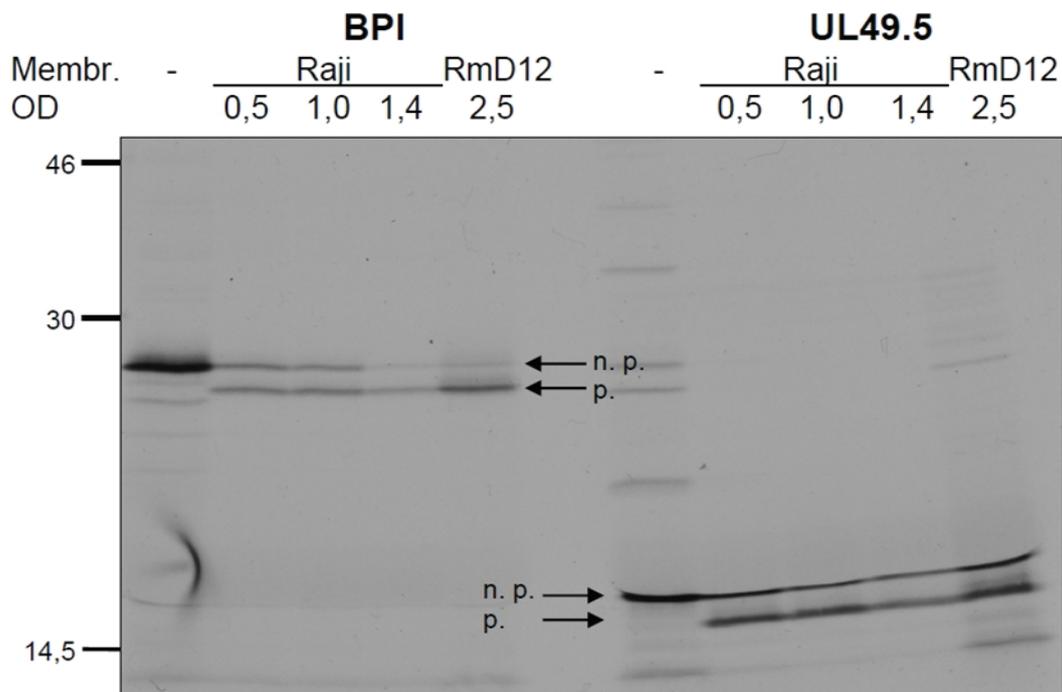
**Abbildung 43. *In vitro* Translation von TAP1 und TAP2**

Die Transkription erfolgte mit linearisierter Plasmid-DNA für 1 h bei 40°C. Die Translation in Anwesenheit von Hunde-Pankreas Mikrosomen (RmD17) wurde für 90 min bei 24°C durchgeführt. Es wurden jeweils 1 µl der Translationsreaktion auf ein SDS-Gradienten-Gel (12-17%) aufgetragen. Das radioaktive Signal wurde auf einem Kodak-Film detektiert. Der Transportassay wurde mit 1 µM Fluorescein-markiertem Peptid RRYQNSTΦL (Φ, Fluorescein-markiertes Cystein) für 3 min bei 32°C in Anwesenheit (schwarze Balken) und Abwesenheit (weiße Balken) von 10 mM MgATP mit Hunde-Pankreas-Mikrosomen nach Cotranslation von TAP1 und TAP2 bzw. Translation von BPI (mock) (entspricht 20 µl Translationsansatz) durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde der Transport in Raji-Mikrosomen (20 µg) gemessen.

Auch mittels Coimmunopräzipitationen konnte keine Interaktion zwischen den Proteinen nachgewiesen werden. Dies galt ebenfalls für weitere Cotranslationen von

TAP und UL49.5. Es wurden darüber hinaus sequentielle Translationen versucht, wobei zunächst ein Protein translatiert und anschließend in dieselben Membranen ein weiteres Protein translatiert wurde. Jedoch konnte selbst durch diese Methode keine Interaktion zwischen cotranslatierten Proteinen nachgewiesen werden. Wahrscheinlich sind die translatierten Proteine nicht in denselben Membranvesikeln lokalisiert, sodass die Proteine nicht in unmittelbarer Nähe zueinander vorzufinden sind und somit auch nicht miteinander interagieren können. Mit dieser Methode war es nicht möglich, die Interaktion zwischen TAP und UL49.5 zu untersuchen.

Da es nicht möglich war, den TAP-Komplex und UL49.5 funktional *in vitro* zusammenzubringen, wurden Raji-Membranen als Membranquelle bei der *in vitro* Translation eingesetzt. Diese Membranen enthalten bereits den humanen TAP-Transporter. Bei einer Translation von UL49.5 in diese Membranen ist zu erwarten, dass jedes UL49.5-Protein auf einen TAP-Komplex trifft. Da die *in vitro* Translation für Hunde-Pankreas-Mikrosomen optimiert wurde, wurden zunächst unterschiedliche Membran-Mengen für die Translation getestet (siehe Abbildung 44).



**Abbildung 44. *In vitro* Translation in Raji- und Hunde-Pankreas-Mikrosomen**

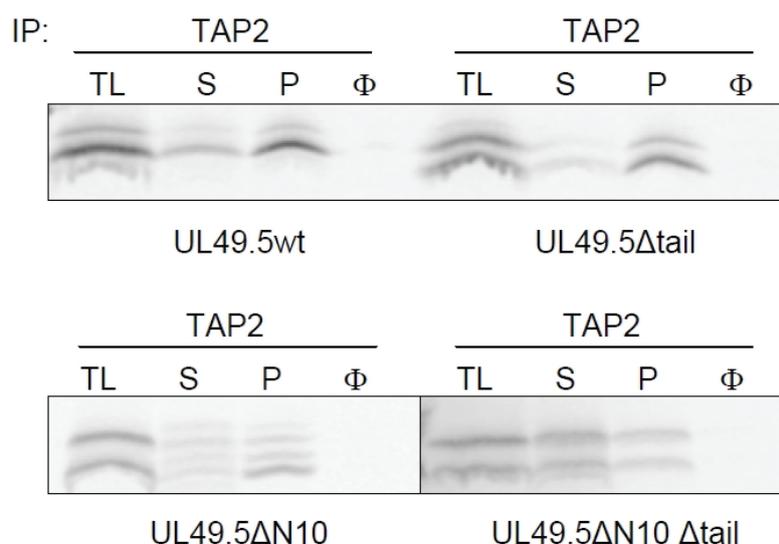
Die Transkription erfolgte mit linearisierter Plasmid-DNA (1 h, 40°C). Die Translation in Anwesenheit von Raji-Mikrosomen verschiedener optischer Dichten (OD) oder Hunde-Pankreas Mikrosomen (RmD12) wurde für 1 h bei 24°C durchgeführt. Es wurde jeweils 1 µl der Translationsreaktion auf ein SDS-Gradienten-Gel (12-17%) aufgetragen. Das Signal wurde auf einem Autoradiographie-Film nachgewiesen. n.p. nicht prozessiertes Protein; p. prozessiertes Protein; BPI bovines Prolaktin.

Hierbei wurden die Translation von BPI und von UL49.5 unter unterschiedlichen Bedingungen verglichen. Bei beiden getesteten Proteinen handelt es sich um Typ-I-Membranproteine, die eine N-terminale Signalsequenz besitzen, die nach korrekter Insertion in das ER abgespalten wird. Somit kann man die richtige Orientierung und Prozessierung der Proteine verfolgen. Wie in Abbildung 44 dargestellt, konnten beide Proteine in Anwesenheit von Raji-Mikrosomen translatiert werden. Jedoch inhibieren die Raji-Mikrosomen mit zunehmender Menge die Translation der Proteine. Des Weiteren ist die Membraninsertion, visualisiert durch die Abspaltung der Signalsequenz, in Raji-Mikrosomen mit etwa 50% schlechter als in Hunde-Pankreas-Mikrosomen mit etwa 70%. Für die weiteren Untersuchungen mit Raji-Mikrosomen wurde die mittlere Menge Mikrosomen eingesetzt (OD: 1,0).

Im nächsten Schritt wurden verschiedene UL49.5-Varianten in Raji-Mikrosomen translatiert. Es wurde sowohl das N-terminal verkürzte UL49.5 $\Delta$ N10, das keine inhibitorische Aktivität mehr auf den TAP-Komplex zeigt als auch das C-terminal verkürzte UL49.5 $\Delta$ tail, das keine proteasomale Degradation des TAP-Komplexes mehr einleitet, untersucht. Zusätzlich wurde zum ersten Mal ein Konstrukt generiert, das sowohl am C-Terminus um 15 Aminosäuren als auch am N-Terminus um zehn Aminosäuren verkürzt ist. Bisherige Interaktionsstudien in Säugerzellen (BiFC) und in Insektenzell-Mikrosomen lassen vermuten, dass die Transmembrandomäne des UL49.5-Proteins für die Bindung an den TAP-Komplex verantwortlich ist. Es konnte jedoch bisher noch kein Konstrukt untersucht werden, das an beiden Enden verkürzt ist, da keine Detektion mit den UL49.5-Antikörpern möglich ist, die gegen den N-Terminus und C-Terminus des Proteins gerichtet sind. Da bei der *in vitro* Translation das Protein mittels eines radioaktiven Signals ( $^{35}\text{S}$ ) detektiert wird, ist es damit auch möglich, solche beidseitig verkürzten UL49.5-Varianten zu untersuchen. Zusätzlich ist für die Detektion des Proteins keine Fusion eines *tags* notwendig, welcher die Funktion von UL49.5 drastisch einschränkt.

Alle UL49.5-Mutanten konnten erfolgreich in Raji-Mikrosomen translatiert werden und wurden korrekt im ER prozessiert, was durch die Anwesenheit einer Doppelbande nachzuweisen ist. Ziel war es nun zu untersuchen, ob diese UL49.5-Mutanten an den humanen TAP-Komplex binden können, der endogen in den Raji-Zellen vorhanden ist. Dafür wurden die Raji-Mikrosomen nach der Translation durch Zentrifugation auf eine Sucrosepuffer (0,5 M) von den restlichen Komponenten der *in vitro* Translation

abgetrennt. Besonders das in den RRL enthaltene Globin führt sonst zu einem starken Hintergrund bei der SDS-PAGE. Daraufhin wurden die Mikrosomen in 2% Digitonin solubilisiert und für eine Co-IP mittels eines TAP2-spezifischen Antikörpers (435.3) eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45 dargestellt. Wie bereits nach Expression in Insektenzellen oder Säugerzellen lässt sich das UL49.5-Protein nur schwer in Digitonin solubilisieren. Erstaunlicherweise lässt sich das UL49.5 jedoch mit dem TAP-Komplex präzipitieren. Dabei ist häufig eine Anreicherung der unteren Bande zu erkennen, die dem prozessierten Protein entspricht. Somit bindet vornehmlich das prozessierte UL49.5-Protein an den TAP-Komplex, aber auch ein Teil des nicht-prozessierten Proteins. Interessanterweise lassen sich alle untersuchten UL49.5-Mutanten mit dem TAP-Komplex copräzipitieren. Dies bestätigt nochmals die Ergebnisse aus der BiFC und der Co-IPs aus Insektenzellen, und verstärkt weiter die Theorie, dass die Transmembranhelix von UL49.5 für die Bindung an TAP verantwortlich ist.



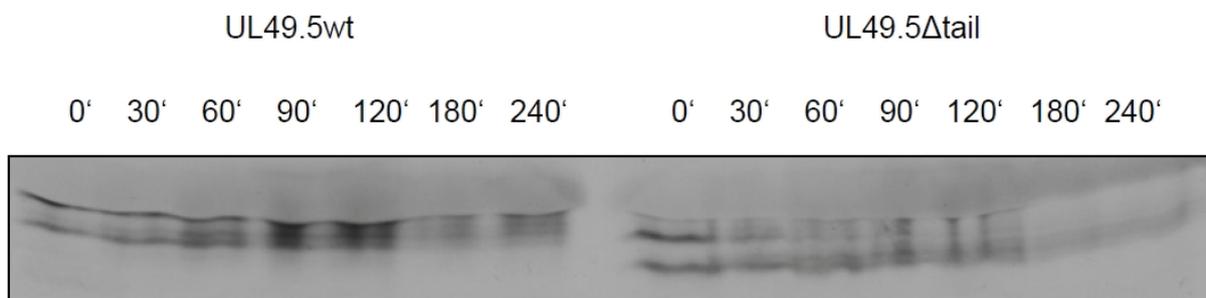
**Abbildung 45. Bindung von *in vitro* translatierten UL49.5-Varianten an TAP**

Nach *in vitro* Translation von UL49.5-Varianten in Raji-Mikrosomen, wurden die Membranen abzentrifugiert und für Coimmunpräzipitationen mit Hilfe eines TAP2-spezifischen Antikörpers eingesetzt. S, Solubilisat; P, Immunpräzipitat;  $\Phi$ , mock-Präzipitat (myc-spezifischer Antikörper). Die Auftrennung erfolgte mittels Tricin-SDS-PAGE (16,5%). Das radioaktive Signal wurde auf einem Phosphor-Screen detektiert.

Als letzter Schritt wurde versucht, eine TAP-Degradation in Raji-Mikrosomen nachzuweisen. Hierzu wurde der TAP-Gehalt nach *in vitro* Translation von UL49.5 in Raji-Mikrosomen untersucht. Aufgrund der geringen Mengen an Mikrosomen, die für die Translationsreaktionen eingesetzt werden konnten, war es jedoch nicht möglich,

den TAP-Gehalt immunochemisch nachzuweisen. Es war zudem nicht möglich, größere Mengen an Mikrosomen während der Translationsreaktion hinzuzugeben, da dies zu einer drastischen Inhibition der Translations- und Membraninsertions-effizienz führt (siehe Abbildung 44). Da es nicht möglich war, die TAP-Degradation direkt zu verfolgen, wurde versucht, einen indirekten Nachweis für die UL49.5-vermittelte proteasomale TAP-Degradation zu etablieren.

Da das UL49.5-Protein zusammen mit TAP codegradiert wird, erlaubt dies indirekt einen Rückschluss auf TAP-Degradation. Hierfür wurde UL49.5 in Raji-Mikrosomen translatiert und nach erfolgter *in vitro* Translation in einem RRL aufgenommen, das nicht mit Hemin behandelt wurde (RRL#10). Dieses RRL ist in der Lage, eine proteasomale Degradation *in vitro* translaterter Proteine einzuleiten. So konnte beispielsweise die proteasomale Degradation verschiedener CFTR-Mutanten *in vitro* verfolgt werden (Carlson et al, 2005; Carlson et al, 2006). Die Membranen wurden in Anwesenheit von einem Energielieferanten (Creatinphosphat / Creatinkinase) für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Als Kontrolle wurde das UL49.5 $\Delta$ tail mit UL49.5 verglichen, da die C-terminal verkürzte UL49.5-Variante keine proteasomale Degradation einleitet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 dargestellt.



#### Abbildung 46. Stabilität von *in vitro* translatiertem UL49.5 in Raji-Mikrosomen

Nach *in vitro* Translation von UL49.5-Varianten in Raji-Mikrosomen, wurden die Membranen abzentrifugiert und für den Degradationsassay in RRL#10 (ohne Hemin, aktiv in proteasomaler Degradation) aufgenommen. Zu bestimmten Zeitpunkten (Zeit in Minuten) wurde jeweils 1  $\mu$ l der Translationsreaktion auf ein SDS-Gradienten-Gel (12-17%) aufgetragen. Das radioaktive Signal wurde auf einem Autoradiographie-Film nachgewiesen.

Nach zahlreichen Versuchen wurde deutlich, dass keine spezifische Degradation von UL49.5 nachgewiesen werden konnte. Im Laufe des Degradationsversuches konnte sowohl für das UL49.5 als auch für das UL49.5 $\Delta$ tail eine Degradation festgestellt

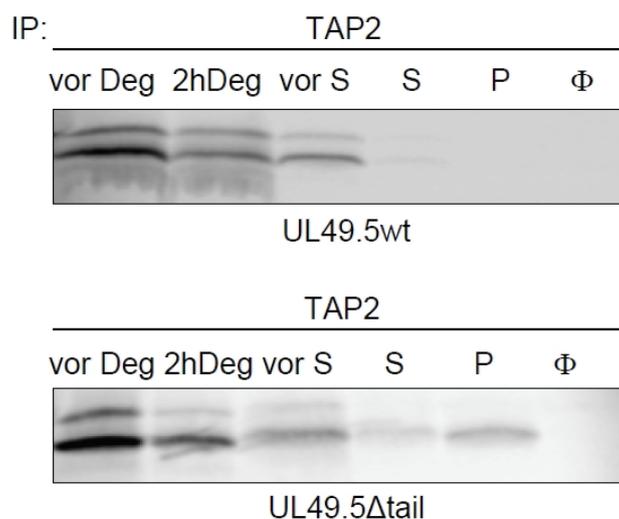
werden. Diese ist somit nicht auf eine Induktion durch das UL49.5 Protein zurückzuführen. Im Laufe der vier Stunden Inkubation bei 37°C kam es meistens zu einem unspezifischen Abbau des *in vitro* translatierten Proteins. Da nach der Translation die Reaktion nicht abgestoppt wurde, wurde das Protein weiter translatiert, wodurch sich die Verstärkung der Bandenintensität für das UL49.5-Protein sowohl in prozessierter (untere Bande) als auch in nicht-prozessierter Form (obere Bande) erklären lässt. Nach drei Stunden bei 37°C war jedoch bei beiden Proteinen eine deutliche Reduktion der Bandenintensität zu erkennen. Da bei der *in vitro* Translation große Mengen an Protein produziert werden, binden wahrscheinlich nicht alle UL49.5-Moleküle an den TAP-Komplex und werden nicht alle degradiert. Dies kann der Grund dafür sein, dass die UL49.5-Degradation nicht nachgewiesen werden kann, wenn die Summe aller UL49.5-Moleküle analysiert wird.

Aus diesem Grunde wurden nur die UL49.5-Moleküle untersucht, die wirklich an den TAP-Komplex gebunden hatten und somit degradiert werden konnten. Hierfür wurden nach *in vitro* Translation und Membraninsertion Co-IPs durchgeführt. Es wurde wieder das UL49.5wt-Protein mit dem UL49.5 $\Delta$ tail verglichen, das keine proteasomale Degradation induziert. Um eine proteasomale Degradation zu ermöglichen, wurden die Mikrosomen mit den *in vitro* translatierten Proteinen nach Zentrifugation auf einem Sucrosepuffer (0,5 M), zum Abtrennen von anderen Komponenten der Translationsreaktion, in RRL#10 aufgenommen. Dies enthält alle Faktoren, die für die proteasomale Degradation notwendig sind. Die Proben wurden unterschiedlich lang (1h bis 4h) bei 37°C in diesem Lysat inkubiert. Danach wurden die Raji-Mikrosomen wieder auf einer Sucrosepuffer (0,5 M) zentrifugiert und für die Co-IP eingesetzt. Das UL49.5-Signal nach Elution von den TAP2-beladenen Magnetobeads wurde nach Degradation in RRL#10 insgesamt schwächer. Dies war wie schon in Abbildung 46 jedoch nicht auf UL49.5-spezifische Degradation zurückzuführen, da sowohl für das UL49.5wt als auch für das UL49.5 $\Delta$ tail das Virus-Protein mit dem TAP-Komplex copräzipitiert werden konnte. Das Signal war jedoch, aufgrund der unspezifischen Protein-Degradation insgesamt sehr schwach, weshalb die SDS-PAGE keine scharfen, präzisen Banden lieferte und hier nicht dargestellt wird.

Der Degradationsassay wird standardmäßig in einem Kaninchen Reticulozyten Lysat durchgeführt. Wie bereits erwähnt, ist dieses Lysat in der Lage, die proteasomale

Degradation von CFTR einzuleiten. Es ist jedoch möglich, dass die UL49.5-vermittelte TAP-Degradation von humanen Faktoren abhängig ist, die in dem Kaninchen Lysat nicht vorzufinden sind. Die UL49.5-vermittelte Degradation scheint in der Tat sehr von der Umgebung abzuhängen. Beispielsweise wird Ratten-TAP in humanen Zellen nicht durch das UL49.5-Protein degradiert, obwohl es in Ratten-Zellen durch UL49.5 degradiert wird (Verweij et al, 2008). Auch hier scheint es eine Inkompatibilität zwischen dem humanen und dem Ratten Ubiquitin-abhängigen Degradationsweg zu geben, weshalb keine UL49.5-vermittelte Degradation zu beobachten ist.

Aus diesem Grunde wurde die Degradationsanalyse in einem humanen Zell-Lysat durchgeführt. Hierfür wurde Raji-Lysat frisch präpariert und für den Degradationsassay eingesetzt. Interessanterweise war es nach Degradation in einem humanen Lysat möglich, eine indirekte Degradation von UL49.5 nachzuweisen, was in Abbildung 47 dargestellt ist.



#### Abbildung 47. Stabilität von UL49.5 nach Degradation in HeLa-Lysat

Nach *in vitro* Translation von UL49.5-Varianten in Raji-Mikrosomen, wurden die Membranen abzentrifugiert und für den Degradationsassay in HeLa Zell-Lysat aufgenommen. Danach wurden die Membranen abzentrifugiert und für Coimmunpräzitationen mit Hilfe eines TAP2-spezifischen Antikörpers eingesetzt. S, Solubilisat; P, Immunpräzipitat; Φ, mock-Präzipitat (myc-spezifischer Antikörper). Die Auftrennung erfolgte mittels Tricin-SDS-PAGE (16,5%). Das radioaktive Signal wurde auf einem Phosphor-Screen detektiert.

Der Vergleich von UL49.5wt und UL49.5Δtail zeigte, dass nur das UL49.5Δtail-Protein mit dem TAP-Komplex copräzipitiert werden konnte. Das UL49.5wt-Protein konnte nicht mehr mit TAP copräzipitiert werden. Dies kann ein Hinweis darauf sein,

dass UL49.5, das an den TAP-Komplex bindet, zusammen mit TAP degradiert wird, und somit nicht mehr im Eluat der Co-IP als radioaktives Signal nachgewiesen werden kann. Da nach erfolgtem Degradationsassay ein Großteil der Proteine abgebaut wird, sind die Signale im Eluat der Co-IP sehr schwach. Aus diesem Grunde war es nicht möglich, diese Daten verlässlich zu reproduzieren.

Es wurden unterschiedliche Kontrollen durchgeführt, um die Daten aus Abbildung 47 zu untermauern. Unter anderem sollte nachgewiesen werden, dass das Fehlen von UL49.5 nach Co-IP auf proteasomale Degradation zurückzuführen ist. Hierfür wurde das Experiment in An- und Abwesenheit von einem proteasomalen Inhibitor (MG132) durchgeführt. Aufgrund der veränderten Reaktionsbedingungen nach Zugabe des proteasomalen Inhibitors, konnten die Proben mit und ohne Proteasominhibitor nicht miteinander verglichen werden. Die Signalstärken des UL49.5-Proteins, das für die Co-IP eingesetzt wurde schwanken zu stark bei den verschiedenen Proben. Zudem war es nicht möglich, die Reaktionsbedingungen so zu etablieren, dass reproduzierbare Ergebnisse erlangt wurden. So lieferten auch diese Co-IPs keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Die Reaktionsbedingungen der *in vitro* Translation in Raji-Zellen müssten noch in Anwesenheit des proteasomalen Inhibitors optimiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bis jetzt keine eindeutige Aussage über eine proteasomale Degradation nach *in vitro* Translation von UL49.5 getroffen werden kann. Hierfür müssten andere Zell-Systeme eingesetzt werden, wie beispielsweise T2-Zellen, die endogen kein TAP exprimieren (Keusekotten et al, 2006) und stabil mit UL49.5 transfiziert bzw. transduziert sind. Nach Generierung solcher Zelllinien könnte nach *in vitro* Translation von TAP die Proteinstabilität sowohl in An- als auch in Abwesenheit von UL49.5 analysiert werden.

## 4 Diskussion

UL49.5-Homologe werden von allen bisher bekannten Herpesviren kodiert, wobei nur die Proteine der Viren des Genus Varicelloviren einen inhibitorischen Effekt auf den PLC zeigen. Interessanterweise benutzt das BHV-1 UL49.5-Protein einen zwei-stufigen Inhibitionsmechanismus. Die molekularen Details dieser Inhibition sind jedoch bisher noch nicht aufgeklärt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten wesentliche Einblicke in die Funktionsweise des BHV-1 UL49.5 gewonnen werden, die die Wirkungsweise des Proteins genauer beschreiben.

### 4.1 Interaktion von UL49.5 mit dem PLC

#### 4.1.1 Charakterisierung von Bindungsstellen innerhalb des PLC

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden angewendet, um die Interaktion des UL49.5-Proteins mit dem PLC zu analysieren. Zunächst wurde die Funktion von UL49.5 in einem Insektenzell-System nachgestellt. In diesem System konnte sowohl eine Reduktion der TAP-abhängigen Peptidtransportaktivität als auch eine Degradation des TAP-Komplexes nachgewiesen werden, die jedoch nicht so stark wie in Säugerzellen war. Des Weiteren wurde zum ersten Mal bewiesen, dass UL49.5 mit dem TAP-Transporter direkt interagiert. Interessanterweise sind keine weiteren Komponenten des PLC oder des humanen Immunsystems notwendig, um eine TAP-Inhibition in Insektenzellen zu erreichen. Coimmunpräzitationsstudien zeigten, dass UL49.5 sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Tapasin mit dem TAP-Komplex assoziiert ist. Es konnte zudem bewiesen werden, dass UL49.5 sowohl an TAP1 als auch an TAP2 unabhängig voneinander bindet. Somit scheinen mindestens zwei unabhängige Bindungsstellen für UL49.5 im PLC zu existieren. Innerhalb der TAP-Untereinheiten konnten die Bindungsstellen näher eingegrenzt werden. Die Bindung erfolgt in der sogenannten coreDomäne des Transporters. Die N-terminalen Helices des TAP-Transporters spielen nur eine untergeordnete Rolle für die Bindung des viralen Proteins. Diese Daten konnten mittels BiFC bestätigt werden. Auch hier konnte eine Interaktion sowohl mit dem TAP-Transporter als auch mit dem Kern-Bereich des Transporters detektiert werden. Da das UL49.5-Protein aus BHV-1 nicht nur Rinder-TAP sondern auch humanes TAP inaktiviert (Koppers-Lalic et al, 2003), müsste es an einen konservierten Bereich des TAP-Transporters binden.

Tatsächlich sind die Kern-Domänen des TAP-Komplexes innerhalb der humanen TAP-Proteine stark konserviert (~ 80% Sequenz-Identität). Die N-terminalen Domänen unterscheiden sich jedoch, sowohl zwischen TAP1 und TAP2 als auch zwischen verschiedenen Spezies (Koch et al, 2004). Die konservierten Aminosäuren innerhalb der Kern-Domänen sind hingegen gleichmäßig im Protein verteilt, so dass hiervon keine Bindungsstellen abgeleitet werden können.

#### 4.1.2 Identifizierung von Bindungsstellen im UL49.5-Protein

Das BHV-1 UL49.5-Protein benutzt einen einmaligen Inhibitionsmechanismus, wobei die unterschiedlichen Domänen dieses Typ-I-Membranproteins unterschiedliche Funktionen ausführen. Um zu analysieren, welche Domänen des BHV-1 UL49.5 für die Bindung an den TAP-Komplex verantwortlich sind, wurden verschiedene verkürzte Varianten des UL49.5-Proteins generiert. Mit unterschiedlichen Methoden wurde die Interaktion der UL49.5-Verkürzungen mit dem TAP-Komplex und mit dem coreTAP-Komplex *in vitro* (Co-IPs) und *in vivo* (BiFC) genauer analysiert. Die Ergebnisse der Co-IPs zeigten erstaunlicherweise, dass sowohl Konstrukte bei denen der komplette C-terminale Schwanz deletiert wurde als auch Mutanten bei denen fast die komplette N-terminale Domäne entfernt wurden, an den TAP-Komplex binden. Diese Ergebnisse wurden von den *in vivo* Untersuchungen mittels BiFC gestützt. Dabei konnte in lebenden Zellen bestätigt werden, dass sowohl C-terminal als auch N-terminal verkürzte Proteine mit dem TAP-Transporter interagieren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Transmembrandomäne von UL49.5 für die Bindung an den PLC verantwortlich ist. Diese Hypothese konnte mittels *in vitro* translatierten UL49.5-Mutanten bestätigt werden. Diese Methode hat den Vorteil, dass keine Antikörper für die Detektion von UL49.5 verwendet werden, die den Nachweis eines beidseitig verkürzten Proteins nicht ermöglichen. Durch die sensitive Detektion des radioaktiv markierten Proteins war es möglich, auch ein solches Konstrukt zu analysieren. Es konnte schließlich *in vitro* gezeigt werden, dass ein an beiden Termini verkürztes UL49.5-Protein noch in der Lage ist, an den TAP-Komplex zu binden. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Transmembrandomäne für die Bindung verantwortlich ist. Um dieses Ergebnis nochmals zu unterstützen, könnten Konstrukte generiert werden, bei denen die Transmembrandomäne in einem ER-Protein, das nachgewiesenermaßen nicht mit dem PLC interagiert, gegen die des BHV-1 UL49.5 ausgetauscht wird.

## 4.2 Charakterisierung der C-terminalen Domäne von UL49.5

Vergleicht man die Sequenzen homologer UL49.5-Proteine, fällt auf, dass die zytosolische C-terminale Domäne des BHV-1 UL49.5 am C-Terminus um fünf Aminosäuren (SRGRG) länger ist als die aller anderen UL49.5-Homologe (vgl.3.4). Dies lässt vermuten, dass der C-terminale Bereich des Proteins eine besondere Funktion einnimmt. Mittels systematischer C-terminaler Verkürzungen wurde nachgewiesen, dass bereits nach Deletion von zwei C-terminalen Aminosäure (Arginin-Glycin) das Protein nicht mehr in der Lage ist, die proteasomale Degradation des TAP-Komplexes einzuleiten. Nach Entfernung dieser Reste verhält sich das Protein ähnlich wie das UL49.5 $\Delta$ tail, dem der komplette zytoplasmatische Bereich fehlt, in Bezug auf MHC I-Suppression. Es konnte zudem gezeigt werden, dass alle C-terminal verkürzten Varianten noch an den TAP-Komplex binden, was beweist, dass die reduzierte Inhibition nicht auf eine unzureichende Interaktion mit dem TAP-Transporter zurückzuführen ist. Dies lässt den Schluss zu, dass dieser C-terminale Bereich des Proteins zwingend für die TAP-Degradation notwendig ist. Es konnte bereits in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass der zytosolische Schwanz von UL49.5 extrem sensitiv auf Veränderungen reagiert. Wurde zum Beispiel ein EGFP oder ein *split*-YFP an dem C-Terminus von UL49.5 fusioniert, war das Protein nicht mehr in der Lage, eine proteasomale Degradation von TAP einzuleiten. Selbst die Fusion mit einem kurzen His<sub>10</sub>-tag führte zu einem inaktiven Protein, obwohl dieses noch mit dem TAP-Komplex interagiert. Es wurden zudem UL49.5-Mutanten generiert, bei denen der C-terminale Schwanz um weitere Arginin-Glycin-Motive (RG, RGRG) verlängert wurde. Auch diese Proteine konnten keine proteasomale TAP-Degradation mehr induzieren. Trotzdem konnte nicht vollständig geklärt werden, wie die kritischen Bereiche in der zytoplasmatischen Domäne von UL49.5 die proteasomale Degradation vermitteln.

### 4.2.1 Rolle des Di-Lysin-Motivs im UL49.5-Protein

Da das UL49.5-Protein zusammen mit dem TAP-Komplex codegradiert wird, besteht die Möglichkeit, dass entweder UL49.5 oder eine (oder beide) Untereinheit des TAP-Transporters durch Ubiquitylierung für die proteasomale Degradation markiert werden. Innerhalb der C-terminalen Domäne von UL49.5 ist ein Di-Lysin Motiv (<sup>68</sup>KK<sup>69</sup>), das in keinem anderen UL49.5-Homologen außer denen der Rinder-

Herpesviren vorzufinden ist und eine potentielle Ubiquitylierungsstelle bilden könnte. Mutation dieser Reste zu Argininen (unter Beibehaltung der Ladung) oder Alanin (Verweij, Wiertz, nicht veröffentlicht) führte jedoch zu keinem Phänotyp, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese Reste nicht ubiquityliert werden. Ob eine Komponente des PLC ubiquityliert wird, wird momentan genauer untersucht. Es ist jedoch schwierig, ubiquitylierte Zwischenprodukte nachzuweisen, da sie zum Einen nicht sehr stabil sind und zum Anderen die Ubiquitin-Antikörper für den Nachweis meist wenig reaktiv sind. Es ist von vielen ER-Proteinen wie zum Beispiel Tapasin bekannt, dass ein Di-Lysin Motiv ein Signal für ER-Retention sein kann (Paulsson et al, 2006). Dies ist jedoch bei UL49.5 nicht der Fall, da UL49.5 $\Delta$ tail immer noch mit dem TAP-Komplex im ER interagiert (siehe BiFC-Daten). Des Weiteren zeigten Colokalisationsstudien, dass dieses Protein im ER lokalisiert ist. Somit konnte dem <sup>68</sup>KK<sup>69</sup>-Motiv keine besondere Funktion zugeordnet werden.

#### **4.2.2 Funktion der isolierten C-terminalen Domäne von UL49.5**

Es stellte sich die Frage, ob die zytosolische Domäne von UL49.5 auch als einzelne Einheit funktionieren könnte. Wurde hingegen die zytoplasmatische Domäne des BHV-1 UL49.5 durch die des VZV-Homologs ausgetauscht, das mit TAP interagiert dieses aber nicht inhibiert, war keine proteasomale Degradation mehr zu beobachten. Das Protein verhielt sich wie das UL49.5 $\Delta$ tail. Zusätzlich wurde die C-terminale Domäne des BHV-1 UL49.5 an das VZV UL49.5-Protein fusioniert. Überraschenderweise war auch dieses Protein nicht in der Lage, eine proteasomale Degradation einzuleiten. Außerdem wurde der C-Terminus des BHV-1 UL49.5 an Tapasin, das bekanntermaßen mit TAP interagiert, und an TAP1 fusioniert. Auch bei diesen Konstrukten konnte kein Effekt auf MHC I-Oberflächenexpression oder TAP-Stabilität in transient transfizierten HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die C-terminale Domäne von UL49.5 nicht alleine für die proteasomale Degradation des TAP-Komplexes verantwortlich ist.

#### **4.3 Einfluss der N-terminalen Domäne auf die TAP-Degradation**

Um die genaue Funktion der N-terminalen Domäne zu untersuchen, wurden systematische N-terminale Verkürzungen von UL49.5, unter Beibehaltung der Signalsequenz und zwei darauffolgender Aminosäuren, generiert. Die Deletion von

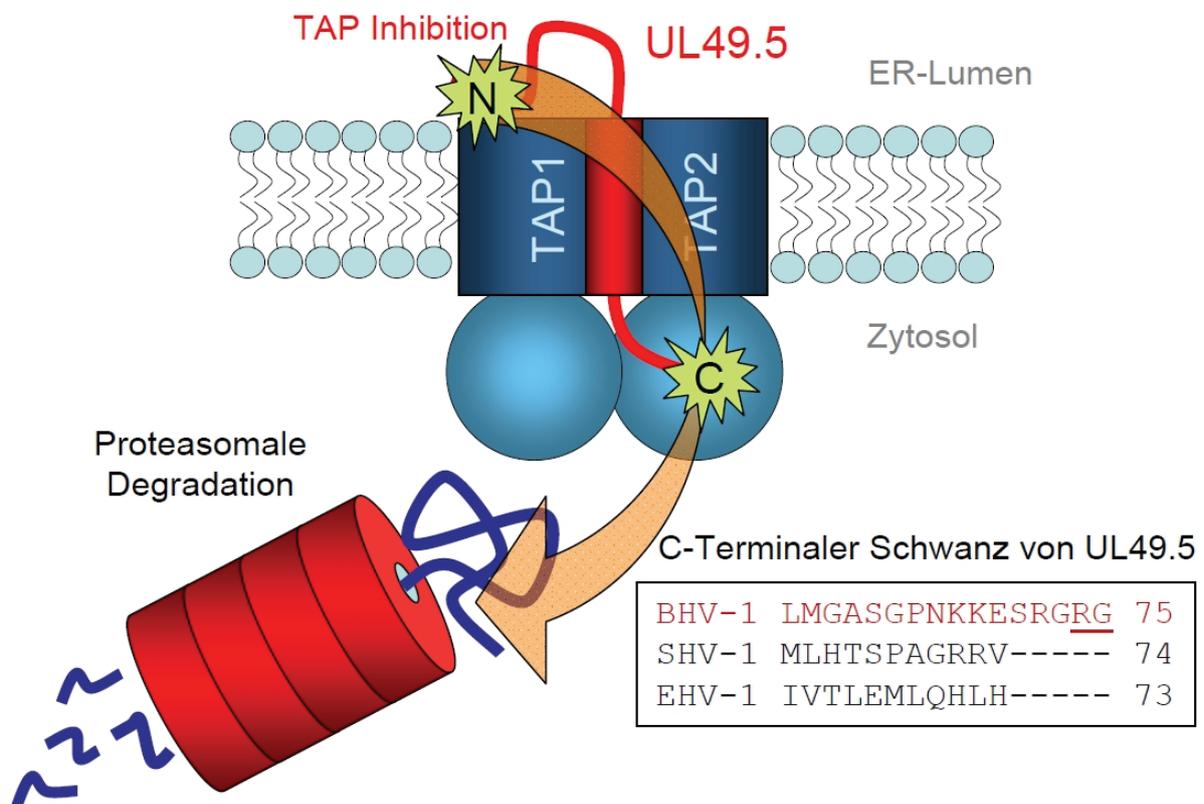
fünf Aminosäuren am N-Terminus führte bereits zu einer Variante, die nur noch einen geringen Effekt auf die MHC I-Oberflächenexpression hatte. Zusätzlich war bei dieser Mutante die UL49.5-vermittelte TAP-Degradation deutlich schwächer. Die Entfernung von zehn Aminosäuren am N-Terminus führte zu einer vollständig inaktiven Variante des UL49.5-Proteins. Mittels Co-IPs konnte gezeigt werden, dass diese verkürzte Variante noch an den TAP-Komplex binden kann, was mit *in vitro* translatiertem UL49.5 bestätigt wurde. Zusätzlich konnte mit Hilfe von Immunoblotting gezeigt werden, dass alle N-terminal verkürzten Varianten noch korrekt prozessiert und in die Membran inseriert wurden. Obwohl das Protein an den TAP-Komplex bindet, kommt es zu keiner Inhibition des TAP-abhängigen Peptidtransports und darauffolgender Antigenpräsentation an der Zelloberfläche. Erstaunlicherweise kann auch keine proteasomale Degradation des TAP-Komplexes mehr über die C-terminale Domäne vermittelt werden. Diese Degradation kann nur eingeleitet werden, wenn sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus von UL49.5 vorhanden sind.

#### **4.4 Funktionsweise von UL49.5**

Aufgrund der vorliegenden Daten kann man die Funktionsweise des UL49.5-Proteins in einem Modell zusammenfassen. Bei der UL49.5-vermittelten TAP-Inhibition und Degradation spielen sowohl der N-Terminus, die Transmembrandomäne, als auch der C-Terminus von UL49.5 eine wichtige Rolle. Für die Funktionsweise von UL49.5 kommen zwei verschiedene Mechanismen in Betracht. Zum Einen ist es vorstellbar, dass die C-terminalen Aminosäuren von einer E2/E3-Ligase oder einer anderen Komponente der Ubiquitylierungsmaschinerie erkannt werden. Jedoch lieferten Untersuchungen mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System ausgehend von einer humanen cDNA-Bibliothek keine eindeutigen Interaktionskandidaten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die ER-luminale Domäne von UL49.5 über die ER-Membran hinweg mit der zytosolischen Domäne kommuniziert, um auf der anderen Seite der Membran eine proteasomale Degradation zu vermitteln. Wahrscheinlich stabilisiert die N-terminale Domäne von UL49.5 eine inaktive Konformation von TAP. Dieses wird über die ER-Membran an die zytosolische Domäne vermittelt, die dann die proteasomale Degradation induziert (Modell für die Funktionsweise siehe Abbildung 48).

## N-Terminus von UL49.5

BHV-1	----RDPLLDAM <u>RREG</u>	12
SHV-1	SIVFSEGLPLL <u>REES</u>	16
EHV-1	-DPGVKQRIDVA <u>REEE</u>	15

**Abbildung 48. Inhibitionsmechanismus von UL49.5**

UL49.5 bindet wahrscheinlich über die Transmembrandomäne an den TAP-Komplex. Die N-terminale Domäne von UL49.5 inaktiviert TAP auf der ER-luminalen Seite und kommuniziert mit der zytosolischen Domäne über die ER-Membran. Am N-Terminus spielen Aminosäuren 8-12 eine wichtige Rolle bei der Inhibition. Die letzten C-terminalen Aminosäuren sind essenziell, um die proteasomale Degradation des TAP-Komplexes einzuleiten.

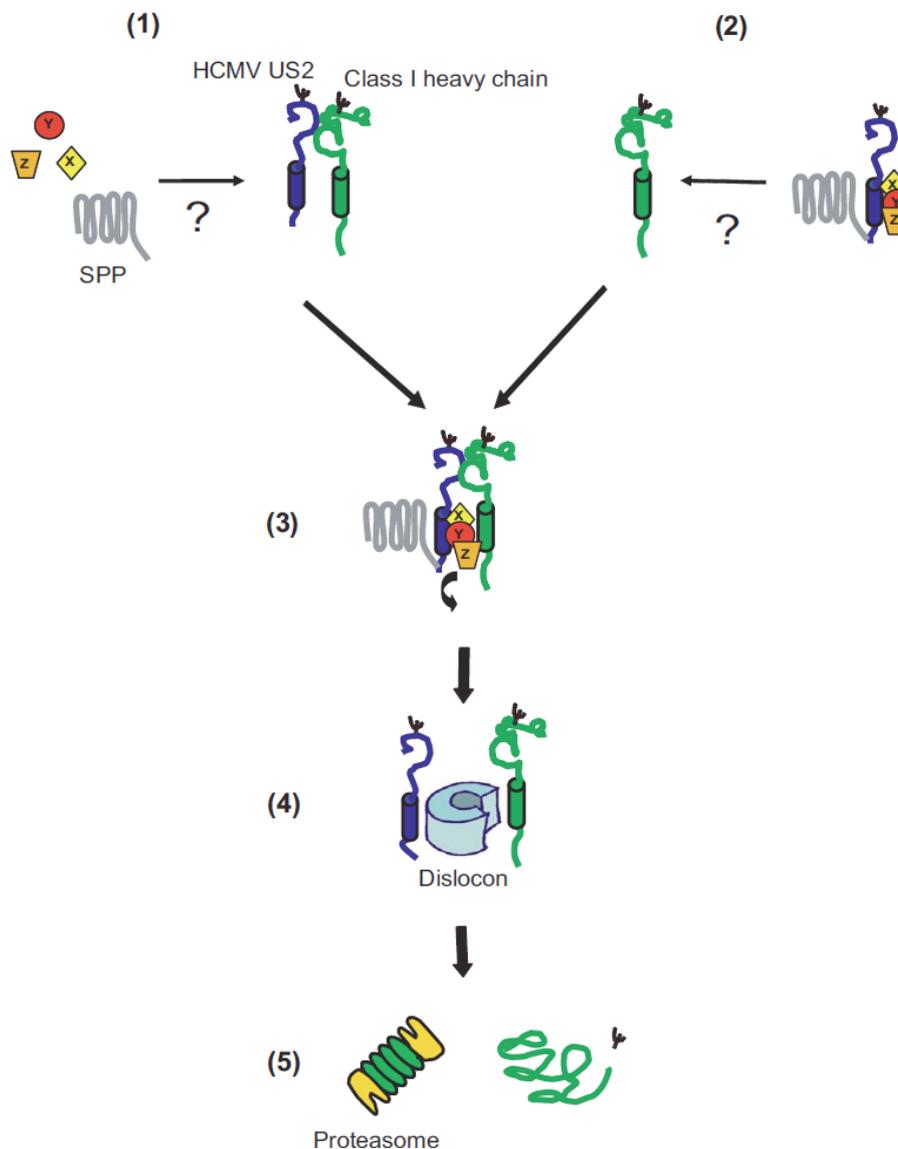
Vergleicht man die Sequenzen aller UL49.5-Homologe, die TAP inhibieren (SHV-1, EHV-1 und BHV-1), zeigen sich drei hoch-konservierte Aminosäure-Reste ( $^9\text{RXE}^{11}$ ), die in der Region liegen, die bei dem UL49.5 $\Delta\text{N}10$ -Konstrukt deletiert wurden. Dieses Motiv könnte eine wichtige Rolle bei der TAP-Inhibition spielen. Daraufhin wurden mehrere UL49.5-Mutanten generiert, bei welchen einzelne oder alle dieser Reste zu Alaninen mutiert wurden. Erstaunlicherweise waren alle dieser UL49.5-Varianten aktiv in TAP-Inhibition und -Degradation. Das bedeutet, dass diese Reste keine spezifische Funktion bei der TAP-Inhibition ausführen. Auch die Ladung dieser Reste scheint keine Rolle bei diesem Inhibitionsprozess zu spielen. Es ist möglich, dass

lediglich die Länge der ER-luminalen Domäne für die TAP-Inhibition von Bedeutung ist. Aufgrund der geringen Größe dieser Domäne ist es unwahrscheinlich, dass dieser Bereich eine Struktur einnimmt, die durch Deletion von 10 N-terminalen Resten zerstört wird. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Bereich durch Interaktion mit TAP eine definierte Struktur ausbildet (*induced fit*).

#### **4.5 Vergleich mit der US2-vermittelten MHC I-Degradation**

Es ist erstaunlich, dass ein sehr kleines virales Typ-I-Protein einen solch komplexen Inhibitionsmechanismus entwickelt hat, bei dem drei verschiedene Bereiche des Proteins unterschiedliche Aufgaben übernehmen und miteinander kommunizieren. Dies erinnert an die MHC I-Degradation, die durch das HCMV US2-Protein vermittelt wird. Bei US2 handelt es sich ebenfalls um ein Typ-I-Membranprotein, deutlich größer als UL49.5 (199 Aminosäuren), bei dem die unterschiedlichen Domänen spezifische Funktionen bei dem Inhibitionsmechanismus übernehmen (siehe 1.6.3). US2 bindet an die neu-synthetisierten MHC I-Moleküle mittels der ER-luminalen Domäne. Ähnlich wie bei UL49.5, ist auch bei US2 die zytoplasmatische Domäne für die Induktion der proteasomalen Degradation verantwortlich. Für die C-terminale Domäne von US2 konnte gezeigt werden, dass jede dritte Aminosäure kritisch für die Induktion der proteasomalen Degradation ist (Oresic et al, 2006), bei UL49.5 jedoch sind die allerletzten C-terminalen Aminosäuren essenziell. Bei der MHC I-Degradation durch US2 sind sowohl die Signalpeptid Peptidase (SPP) als auch das ER-Chaperon BiP bei dem Degradationsmechanismus beteiligt (Hegde et al, 2006; Loureiro et al, 2006). Für die UL49.5-vermittelte TAP-Degradation konnten bisher noch keine Interaktionspartner außerhalb des PLC identifiziert werden. Zusätzlich konnten bei dem US2-Protein kritische Bereiche in der ER-luminalen Domäne des Virusproteins identifiziert werden (Noriega & Tortorella, 2008). Interessanterweise weist die Transmembrandomäne von US2 eine ungewöhnliche Aminosäure-Zusammenstellung auf: Diese Region besteht aus acht hydrophilen, polaren Resten (Histidin, Threonin, Tyrosin, Serin, Asparagin), die selten bei membrangängigen Proteindomänen zu finden sind. Geladene Reste können in einer Transmembrandomäne essenziell für die Interaktion mit anderen Proteinen sein (Call et al, 2002; Cosson et al, 1991). Die Transmembrandomäne von US2 könnte ein Signal aus dem ER-Lumen ins Zytosol übertragen und zusätzlich zelluläre Faktoren rekrutieren. Ähnlich wie bei UL49.5 wird ein Signal von der ER-luminalen Seite über die Membran

auf die zytosolische Seite übertragen, so dass die Degradation eingeleitet werden kann. Ein Modell für die Funktionsweise von US2 ist in Abbildung 49 dargestellt.



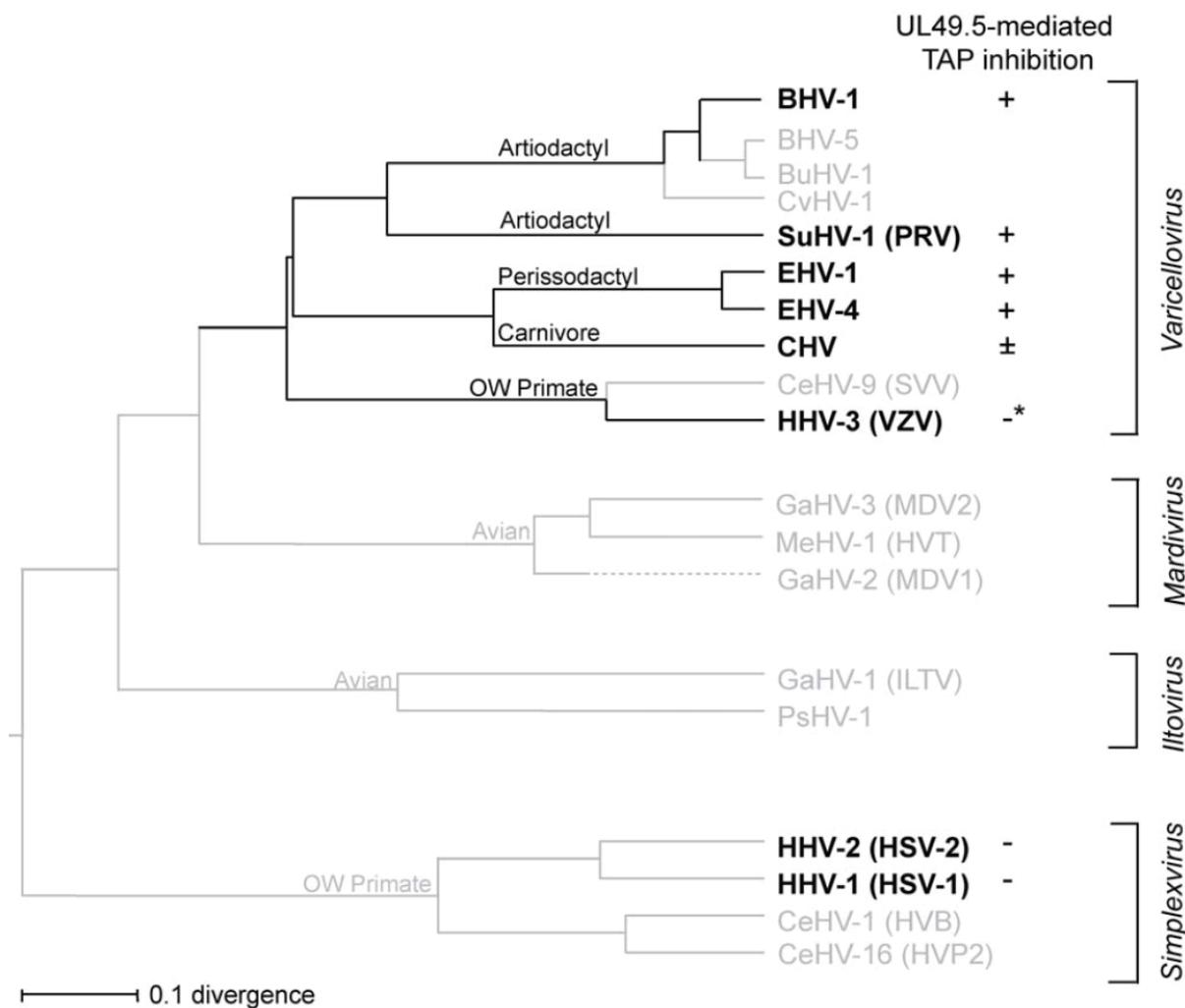
**Abbildung 49. Modell für die Funktionsweise von US2**

Das US2-Protein induziert die proteasomale Degradation von MHC I-Molekülen. Der erste Schritt kann auf zwei Wegen geschehen: (1) Eine US2/MHC I-Interaktion führt zur Rekrutierung zellulärer Faktoren (X, Y, Z) an die Transmembrandomäne unter Mitwirkung des SPP. (2) US2 interagiert mit dem SPP und möglichen Faktoren (X, Y, Z) über die C-terminale Domäne vor der Bindung an MHC I-Moleküle. (3) Das Degradationssignal wird an die zytosolische Domäne übertragen, (4) die US2-zytoplasmatische Domäne orientiert sich in eine  $3_{10}$ -Helix, so dass die kritischen Reste mit der Dislokationsmaschinerie interagieren können. MHC I-Moleküle werden aus der ER-Membran extrahiert und (5) ins Zytosol geleitet, wo sie proteasomal degradiert werden (Noriega & Tortorella, 2008).

## **4.6 Funktionen homologer UL49.5-Proteine**

Homologe von UL49.5 (auch als gN bezeichnet) werden von allen alpha-, beta- und gamma-Herpesviren kodiert (Barnett et al, 1992; Davison, 2002; McGeoch et al, 2006). Alle UL49.5-Homologe sind Typ-I-Membranproteine, die mit einem weiteren Herpesvirusprotein (gM) interagieren und ein Disulfid-verknüpftes Heterodimer über konservierte Reste der ER-luminalen Domäne bilden (Jöns et al, 1998; Lipinska et al, 2006; Mach et al, 2007; Wu et al, 1998). Trotzdem sind die Sequenzen der homologen Proteine, auch innerhalb der Varicelloviren sehr heterogen. Aufgrund der Sequenzen kann jedoch nicht vorhergesagt werden, welche Proteine ähnlich wie das BHV-1 UL49.5 einen inhibitorischen Effekt auf den TAP-Komplex haben. Die UL49.5-Proteine von HSV-1, HSV-2, HCMV und EBV führen zum Beispiel zu keiner TAP-Inhibition oder -Degradation (Barnett et al, 1992; Koppers-Lalic et al, 2005). Es konnte jedoch mittels Deletionsmutanten gezeigt werden, dass UL49.5-Proteine von BHV-1, PRV, EHV-1 und EHV-4 zu einer MHC I-Suppression von der Zelloberfläche führen, was auch in transient transfizierten HeLa-Zellen und stabil transduzierten MJS-Zellen gezeigt werden konnte. Es konnte sowohl in den jeweiligen Wirtszellen als auch in humanen Zellen gezeigt werden, dass es zu einer Inhibition des TAP-Transporters kommt. Die homologen Proteine aus dem Hunde-Herpesvirus (CHV) und VZV hatten keinen Effekt auf die MHC I-Oberflächenexpression, obwohl das VZV-Protein noch an den TAP-Komplex bindet (siehe BiFC-Daten). Das BHV-1 UL49.5-Protein ist das einzige Homolog, dass zu einer Degradation des TAP-Komplexes (sowohl humanes als auch Rinder-TAP) führt. Erstaunlicherweise weisen die EHV-1 und EHV-4 UL49.5-Proteine einen inhibitorischen Effekt auf die ATP-Bindung an TAP auf, was weder beim BHV-1 noch beim PRV UL49.5-Protein beobachtet werden kann. Bei dieser Inhibition spielt die C-terminale Domäne von UL49.5 keine Rolle. Ähnlich wie bei dem BHV-1 UL49.5-Protein, führen auch die Proteine des PRV und EHV-1 zu einem Transport-inkompetenten TAP-Transporter (Koppers-Lalic et al, 2008). Die Funktionsweise des PRV UL49.5-Proteins konnte bisher noch nicht vollständig entschlüsselt werden. Interessanterweise sind die UL49.5-Proteine nicht sehr spezie-spezifisch, wie es zum Beispiel bei den TAP-Inhibitoren ICP47, US6, mK3 oder BNLF2a der Fall ist. Außer dem CHV UL49.5, interagieren alle UL49.5-Homologe mit dem humanen TAP-Transporter. Zusätzlich ist das BHV-1 UL49.5 in der Lage, den TAP-abhängigen Peptidtransport durch Maus- (van Hall et al, 2007), Ratten-, Pferde- und Schweine-TAP in den jeweiligen

Wirtszellen zu inhibieren (Koppers-Lalic, Verweij, nicht veröffentlicht). Dies lässt sich durch die hohe Sequenzhomologie (70-80% Sequenzidentität) der TAP-Proteine erklären (Garcia-Borges et al, 2006). Es ist erstaunlich, dass obwohl die UL49.5-Homologe einen ähnlichen Effekt auf die Zielzellen haben, indem der TAP-abhängige Peptidtransport inhibiert wird, sie sich doch stark in ihrem Mechanismus unterscheiden. Außerdem gibt es auch UL49.5-Homologe, die keine TAP-Inhibition induzieren (siehe Abbildung 50).



**Abbildung 50. Phylogenetischer Stammbaum der UL49.5-Proteine**

Ausgehend von den Sequenzen der UL49.5-Proteine der Alphaherpesviren wurde ein phylogenetischer Stammbaum mit Hilfe des Programms MegAlign<sup>TM</sup>500 erstellt. Hierbei wurde die ClustalV Methode (PAM250) benutzt. Die UL49.5-Proteine, die auf ihre Funktion hin untersucht wurden, sind in Fettdruck dargestellt. \* Das VZV UL49.5-Protein bindet an TAP, führt aber zu keiner TAP-Inhibition (Koppers-Lalic et al, 2008). *Artiodactyla*: Paarhufer, *Perissodactyla*: Unpaarhufer.

### **4.7 UL49.5-vermittelten TAP-Degradation *in vitro***

Um die BHV-1 UL49.5-vermittelte proteasomale Degradation des TAP-Komplex näher zu charakterisieren, sollte die Degradation *in vitro* nachgestellt werden, ähnlich wie es für das CFTR in der Gruppe von W. Skach erstmals gezeigt werden konnte (Carlson et al, 2005; Oberdorf & Skach, 2002). Hierzu mussten die einzelnen Untereinheiten des TAP-Transporters zusammen mit UL49.5 *in vitro* cotranslatiert und in die gleichen Membranvesikel inseriert werden. Mit Hilfe verschiedener N-terminal und C-terminal verkürzter UL49.5-Varianten sollten nähere Einblicke in den Mechanismus der TAP-Degradation gewonnen werden. Die Schwierigkeit bei dieser Methode bestand darin, mehrere Proteine (TAP1, TAP2 und UL49.5) zusammen zu translatieren und auch funktionell zusammenzubringen. Dies konnte bisher weltweit noch nicht zufriedenstellend etabliert werden. Im ersten Schritt musste zunächst ein funktioneller TAP-Transporter *in vitro* synthetisiert werden. Dies konnte bereits in der Gruppe von M. Knittler etabliert werden. Hingegen wurden bei diesem Experiment Membranen menschlichen Ursprungs eingesetzt, die weder TAP1 noch TAP2 exprimieren (T2-Zellen). Ausgehend von T2-Zellen, die jeweils TAP1 oder TAP2 exprimieren, konnte die fehlende Untereinheit *in vitro* in diese Membranen synthetisiert werden und es konnte ein funktionaler TAP-Transporter hergestellt werden. Es konnte sowohl mittels Co-IP-Studien als auch mit Hilfe von Peptidtransport-Studien nachgewiesen werden, dass ein funktionaler TAP1/TAP2-Komplex *in vitro* synthetisiert wurde. Es stellte sich bei weiteren Untersuchungen heraus, dass einzeln synthetisiertes TAP1 deutlich stabiler war als einzeln synthetisiertes TAP2 (Keusekotten et al, 2006). Dies konnte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Leider war es jedoch nicht möglich, einen funktionalen TAP-Transporter *in vitro* in Hunde-Pankreas-Mikrosomen herzustellen. Einzeln konnten TAP1 und TAP2 *in vitro* synthetisiert werden. Auch eine Coexpression beider TAP-Untereinheiten war möglich. Jedoch zeigten sowohl Co-IP-Analysen als auch Peptidtransport-Studien, dass kein funktionaler Transporter gebildet werden konnte. Das Problem scheint hierbei zu sein, dass die *in vitro* hergestellten Proteine nicht in den gleichen Membranvesikeln lokalisiert sind und statistisch gesehen, in nur wenigen Membranvesikeln beide TAP-Untereinheiten vorzufinden sind. Um den Effekt von UL49.5 auf die TAP-Stabilität untersuchen zu können, müssten demnach Membranen eingesetzt werden, in denen bereits eine TAP-Untereinheit und das Virusprotein UL49.5 stabil exprimiert werden. Hierzu

würden sich am besten die T2-Zellen eignen, da diese weder TAP1 noch TAP2 endogen exprimieren. Daraufhin könnte man den fehlenden TAP-Partner *in vitro* translatieren und analysieren ob es einen Unterschied in der TAP-Stabilität in der Anwesenheit oder Abwesenheit von UL49.5 gibt. Um ähnliche Bedingungen zu erreichen, wurden vergleichbare Experimente mit Sf9-Insektenzell-Mikrosomen durchgeführt. Hierfür wurden Sf9-Mikrosomen, die nur TAP1 oder TAP und UL49.5 bzw. TAP2 oder TAP2 und UL49.5 für die *in vitro* Translation des fehlenden TAP-Partners eingesetzt. Leider konnte mit diesen Membranen nur eine sehr stark reduzierte Translations- und Membraninsertionseffizienz erreicht werden, so dass mit diesen Membranen keine *in vitro* Translation möglich war. Weiterhin bleibt auch fraglich, ob in Insektenzellen die proteasomale Degradation nachgestellt werden könnte, da vielleicht wichtige humane zelluläre Faktoren fehlen (z.B. E2-E3-Ligasen). Untersuchungen in Insektenzellen zeigten bereits, dass die UL49.5-vermittelte proteasomale TAP-Degradation deutlich reduziert ist. Zusätzlich ergibt sich auch hier das Problem, dass bei Coexpressionen die unterschiedlichen Proteine nicht immer in denselben Zellen vorzufinden sind.

Mit Hilfe von in Raji-Mikrosomen translatiertem UL49.5 wurde ebenfalls versucht, eine proteasomale Degradation indirekt über UL49.5-Degradation zu verfolgen. Im Vergleich zur inaktiven UL49.5-Variante UL49.5 $\Delta$ tail, zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Protein-Stabilität. Bei der *in vitro* Translation wird zunächst die Degradation durch die Zugabe von Hemin inhibiert. Danach kann der Translationsansatz in ein aktives Lysat überführt werden, in dem eine proteasomale Degradation möglich ist. Bei der Überführung in ein RRL-Lysat konnte keine proteasomale Degradation nachgewiesen werden. Erste Untersuchungen mit einem Raji-Lysat für die Degradation zeigten, dass nach Inkubation mit diesem Lysat UL49.5 nicht mehr über den TAP-Komplex präzipitiert werden konnte. Es bleibt unklar, ob das BHV-1 UL49.5 *in vitro* keine proteasomale TAP-Degradation vermitteln kann, oder ob diese Degradation nicht verfolgt werden kann. Es ist möglich, dass bei einer Translation in RRL humane zelluläre Faktoren fehlen, die für die UL49.5-vermittelte TAP-Degradation essenziell sind. Da bisher jedoch noch keine Faktoren identifiziert werden konnten, die für diese Degradation verantwortlich sind, kann diese Frage noch nicht beantwortet werden.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abele R, Tampé R (1999) Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim Biophys Acta* **1461**: 405-419
- Abele R, Tampé R (2004) The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology* **19**: 216-224
- Ackerman AL, Cresswell P (2004) Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* **5**: 678-684
- Ackerman AL, Kyritsis C, Tampé R, Cresswell P (2003) Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12889-12894
- Ackerman AL, Kyritsis C, Tampé R, Cresswell P (2005) Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat Immunol* **6**: 107-113
- Ahn K, Gruhler A, Galocha B, Jones TR, Wiertz EJ, Ploegh HL, Peterson PA, Yang Y, Früh K (1997) The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* **6**: 613-621
- Ahn K, Meyer TH, Uebel S, Sempé P, Djaballah H, Yang Y, Peterson PA, Früh K, Tampé R (1996) Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47. *EMBO J* **15**: 3247-3255
- Aisenbrey C, Sizun C, Koch J, Herget M, Abele R, Bechinger B, Tampé R (2006) Structure and dynamics of membrane-associated ICP47, a viral inhibitor of the MHC I antigen-processing machinery. *J Biol Chem* **281**: 30365-30372
- Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter (2004) *Molekularbiologie der Zelle* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim.
- Alexander M, Bor Y-c, Ravichandran KS, Hammarskjold M-L, Rekosh D (2004) Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef associates with lipid rafts to downmodulate cell surface CD4 and class I major histocompatibility complex expression and to increase viral infectivity. *J Virol* **78**: 1685-1696
- Ambagala AP, Gopinath RS, Srikumaran S (2003) Inhibition of TAP by pseudorabies virus is independent of its vhs activity. *Virus Res* **96**: 37-48
- Ambagala AP, Gopinath RS, Srikumaran S (2004) Peptide transport activity of the transporter associated with antigen processing (TAP) is inhibited by an early protein of equine herpesvirus-1. *J Gen Virol* **85**: 349-353
- Ambagala AP, Hinkley S, Srikumaran S (2000) An early pseudorabies virus protein down-regulates porcine MHC class I expression by inhibition of transporter associated with antigen processing (TAP). *J Immunol* **164**: 93-99
- Androlewicz MJ, Ortmann B, van Endert PM, Spies T, Cresswell P (1994) Characteristics of peptide and major histocompatibility complex class I/beta 2-microglobulin binding to the transporters associated with antigen processing (TAP1 and TAP2). *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12716-12720
- Arendt CS, Hochstrasser M (1997) Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7156-7161
- Bar-Nun S (2005) The role of p97/Cdc48p in endoplasmic reticulum-associated degradation: from the immune system to yeast. *Curr Top Microbiol Immunol* **300**: 95-125

- Barel MT, Hassink GC, van Voorden S, Wiertz EJ (2006) Human cytomegalovirus-encoded US2 and US11 target unassembled MHC class I heavy chains for degradation. *Mol Immunol* **43**: 1258-1266
- Barker DE, Roizman B (1992) The unique sequence of the herpes simplex virus 1 L component contains an additional translated open reading frame designated UL49.5. *J Virol* **66**: 562-566
- Barnett BC, Dolan A, Telford EA, Davison AJ, McGeoch DJ (1992) A novel herpes simplex virus gene (UL49A) encodes a putative membrane protein with counterparts in other herpesviruses. *J Gen Virol* **73**: 2167-2171
- Beinert D, Neumann L, Uebel S, Tampé R (1997) Structure of the viral TAP-inhibitor ICP47 induced by membrane association. *Biochemistry* **36**: 4694-4600
- Bigger JE, Martin DW (2004) Identification of an ICP47 homologue in simian agent 8 (SA8). *Virus Genes* **28**: 223-225
- Boname JM, de Lima BD, Lehner PJ, Stevenson PG (2004a) Viral degradation of the MHC class I peptide loading complex. *Immunity* **20**: 305-317
- Boname JM, May JS, Stevenson PG (2004b) The murine gamma-herpesvirus-68 MK3 protein causes TAP degradation independent of MHC class I heavy chain degradation. *Eur J Immunol* **35**: 171-179
- Boname JM, Stevenson PG (2001) MHC class I ubiquitination by a viral PHD/LAP finger protein. *Immunity* **15**: 627-636
- Brodsky JL, McCracken AA (1997) ER-associated and proteasomemediated protein degradation: how two topologically restricted events came together. *Trends Cell Biol* **7**: 151-156
- Burgdorf S, Schölz C, Kautz A, Tampé R, Kurts C (2008) Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol* **9**: 558-566
- Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW (2002) The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* **111**: 967-979
- Campbell NA (1997) *Biologie*: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Carlson E, Bays N, David L, Skach WR (2005) Reticulocyte lysate as a model system to study endoplasmic reticulum membrane protein degradation. *Methods Mol Biol* **301**: 185-205
- Carlson EJ, Pironzo D, Skach WR (2006) p97 functions as an auxiliary factor to facilitate TM domain extraction during CFTR ER-associated degradation. *EMBO J* **25**: 4557-4566
- Chicz RM, Urban RG, Lane WS, Gorga JC, Stern LJ, Vignali DA, Strominger JL (1992) Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* **358**: 764-768
- Cho S, Park SG, Lee DH, Park BC (2004) Protein-protein interaction networks: from interactions to networks. *J Biochem Mol Biol* **37**: 45-52
- Ciechanover A (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 79-87
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**: 10881-10890
- Coscoy L, Ganem D (2000) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8051-8056
- Cosson P, Lankford SP, Bonifacino JS, Klausner RD (1991) Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs. *Nature* **351**: 414-416

- Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, Wearsch PA (2005) Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* **207**: 145-157
- Davison AJ (2002) Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol* **86**: 69-88
- Dean M, Annilo T (2005) Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**: 123-142
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **11**: 1156-1166
- Demirel O, Waibler Z, Kalinke U, Grunebach F, Appel S, Brossart P, Hasilik A, Tampé R, Abele R (2007) Identification of a lysosomal peptide transport system induced during dendritic cell development. *J Biol Chem*
- Dick TP, Nussbaum AK, Deeg M, Heinemeyer W, Groll M, Schirle M, Keilholz W, Stevanovic S, Wolf DH, Huber R, Rammensee HG, Schild H (1998) Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J Biol Chem* **273**: 25637-25646
- Dong G, Wearsch PA, Peaper DR, Cresswell P, Reinisch KM (2009) Insights into MHC class I peptide loading from the structure of the tapasin-ERp57 thiol oxidoreductase heterodimer. *Immunity* **30**: 21-32
- Duncan LM, Piper S, Dodd RB, Saville MK, Sanderson CM, Luzio JP, Lehner PJ (2006) Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *EMBO J* **25**: 1635-1645
- Farrell H, Degli-Esposti M, Densley E, Cretney E, Smyth M, Davis-Poynter N (2000) Cytomegalovirus MHC class I homologues and natural killer cells: an overview. *Microbes Infect* **2**: 521-532
- Farrell HE, Vally H, Lynch DM, Fleming P, Shellam GR, Scalzo AA, Davis-Poynter NJ (1997) Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature* **386**: 510-514
- Ferrell K, Wilkinson CR, Dubiel W, Gordon C (2000) Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci* **25**: 83-88
- Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246
- Früh K, Ahn K, Djaballah H, Sempé P, van Endert PM, Tampé R, Peterson PA, Yang Y (1995) A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* **375**: 415-418
- Fuchs W, Mettenleiter TC (2005) The nonessential UL49.5 gene of infectious laryngotracheitis virus encodes an O-glycosylated protein which forms a complex with the non-glycosylated UL10 gene product. *Virus Res* **112**: 108-114
- Furman MH, Dey N, Tortorella D, Ploegh HL (2002a) The human cytomegalovirus US10 gene product delays trafficking of major histocompatibility complex class I molecules. *J Virol* **76**: 11753-11756
- Furman MH, Ploegh HL, Tortorella D (2002b) Membrane-specific, host-derived factors are required for US2- and US11-mediated degradation of major histocompatibility complex class I molecules. *J Biol Chem* **277**: 3258-3267
- Garcia-Borges CN, Phanavanh B, Crew MD (2006) Characterization of porcine TAP genes: alternative splicing of TAP1. *Immunogenetics* **58**: 374-382
- Giorgini F, Muchowski PJ (2005) Connecting the dots in Huntington's disease with protein interaction networks. *Genome Biol* **6**: 210
- Glosson NL, Hudson AW (2007) Human herpesvirus-6A and -6B encode viral immunoevasins that downregulate class I MHC molecules. *Virology* **365**: 125-135

Gorbulev S, Abele R, Tampé R (2001) Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3732-3737

Grande AG, 3rd, Golovina TN, Hamilton SE, Sriram V, Spies T, Brutkiewicz RR, Harty JT, Eisenlohr LC, Van Kaer L (2000) Impaired assembly yet normal trafficking of MHC class I molecules in tapasin mutant mice. *Immunity* **13**: 213-222

Gruhler A, Peterson PA, Früh K (2000) Human cytomegalovirus immediate early glycoprotein US3 retains MHC class I molecules by transient association. *Traffic* **1**: 318-325

Hassink GC, Barel MT, Van Voorden SB, Kikkert M, Wiertz EJ (2006) Ubiquitination of MHC class I heavy chains is essential for dislocation by human cytomegalovirus-encoded US2 but not US11. *J Biol Chem* **281**: 30063-30071

Hecker C-M, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, Dikic I (2006) Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* **281**: 16117-16127

Hegde NR, Chevalier MS, Wisner TW, Denton MC, Shire K, Frappier L, Johnson DC (2006) The role of BiP in endoplasmic reticulum-associated degradation of major histocompatibility complex class I heavy chain induced by cytomegalovirus proteins. *J Biol Chem* **281**: 20910-20919

Hengel H, Brune W, Koszinowski UH (1998) Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol* **6**: 190-197

Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**: 425-479

Hewitt EW, Duncan L, Mufti D, Baker J, Stevenson PG, Lehner PJ (2002) Ubiquitylation of MHC class I by the K3 viral protein signals internalization and TSG101-dependent degradation. *EMBO J* **21**: 2418-2429

Hewitt EW, Gupta SS, Lehner PJ (2001) The human cytomegalovirus gene product US6 inhibits ATP binding by TAP. *EMBO J* **20**: 387-396

Hill A, Jugovic P, York I, Russ G, Bennink J, Yewdell J, Ploegh H, Johnson D (1995) Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* **375**: 411-415

Hislop AD, Rensing ME, van Leeuwen D, Pudney VA, Horst D, Koppers-Lalic D, Croft NP, Neefjes JJ, Rickinson AB, Wiertz EJ (2007) A CD8<sup>+</sup> T cell immune evasion protein specific to Epstein-Barr virus and its close relatives in Old World primates. *J Exp Med* **204**: 1863-1873

Horst D, van Leeuwen D, Croft NP, Garstka MA, Hislop AD, Kremmer E, Rickinson AB, Wiertz EJ, Rensing ME (2009) Specific targeting of the EBV lytic phase protein BNLF2a to the transporter associated with antigen processing results in impairment of HLA class I-restricted antigen presentation. *J Immunol* **182**: 2313-2324

Hosokawa N, Wada I, Hasegawa K, Yorihuzi T, Tremblay LO, Herscovics A, Nagata K (2001) A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* **2**: 415-422

Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**: 789-798

Hu CD, Kerppola TK (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol* **21**: 539-545

Hudson AW, Blom D, Howley PM, Ploegh HL (2003) The ER-luminal domain of the HHV-7 immunoevasin U21 directs class I MHC molecules to lysosomes. *Traffic* **4**: 824-837

Hudson AW, Howley PM, Ploegh HL (2001) A human herpesvirus 7 glycoprotein, U21, diverts major histocompatibility complex class I molecules to lysosomes. *J Virol* **75**: 12347-12358

Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**: 362-365

Ishido S, Wang C, Lee BS, Cohen GB, Jung JU (2000) Downregulation of major histocompatibility complex class I molecules by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5 proteins. *J Virol* **74**: 5300-5309

Janeway CA, Travers P (1997) *Immuologie*: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, Riordan JR (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* **83**: 129-135

Jöns A, Dijkstra JM, Mettenleiter TC (1998) Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex. *J Virol* **72**: 550-557

Jöns A, Granzow H, Kuchling R, Mettenleiter TC (1996) The UL49.5 gene of pseudorabies virus codes for an O-glycosylated structural protein of the viral envelope. *J Virol* **70**: 1237-1241

Jugovic P, Hill AM, Tomazin R, Ploegh H, Johnson DC (1998) Inhibition of Major Histocompatibility Complex Class I Antigen Presentation in Pig and Primate Cells by Herpes Simplex Virus Type 1 and 2 ICP47. *J Virol* **72**: 5076-5084

Kasper MR, Roeth JF, Williams M, Filzen TM, Fleis RI, Collins KL (2005) HIV-1 Nef disrupts antigen presentation early in the secretory pathway. *J Biol Chem* **280**: 13538-13544

Kavanagh DG, Gold MC, Wagner M, Koszinowski UH, Hill AB (2001) The multiple immune-evasion genes of murine cytomegalovirus are not redundant: m4 and m152 inhibit antigen presentation in a complementary and cooperative fashion. *J Exp Med* **194**: 967-978

Keusekotten K, Leonhardt RM, Ehses S, Knittler MR (2006) Biogenesis of functional antigenic peptide transporter TAP requires assembly of pre-existing TAP1 with newly synthesized TAP2. *J Biol Chem* **281**: 17545-17551

Kienast A, Preuss M, Winkler M, Dick TP (2007) Redox regulation of peptide receptivity of major histocompatibility complex class I molecules by ERp57 and tapasin. *Nat Immunol* **8**: 864-872

Kim Y, Park B, Cho S, Shin J, Cho K, Jun Y, Ahn K (2008) Human cytomegalovirus UL18 utilizes US6 for evading the NK and T-cell responses. *PLoS Pathog* **4**: e1000123

Klammt C, Lohr F, Schäfer B, Haase W, Dötsch V, Ruterjans H, Glaubitz C, Bernhard F (2004) High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur J Biochem* **271**: 568-580

Klammt C, Schwarz D, Eifler N, Engel A, Piehler J, Haase W, Hahn S, Dötsch V, Bernhard F (2007a) Cell-free production of G protein-coupled receptors for functional and structural studies. *J Struct Biol* **158**: 482-493

Klammt C, Schwarz D, Eifler N, Engel A, Piehler J, Haase W, Hahn S, Dötsch V, Bernhard F (2007b) Reprint of "Cell-free production of G protein-coupled receptors for functional and structural studies" [J. Struct. Biol. 158 (2007) 482-493]. *J Struct Biol* **159**: 194-205

Knop M, Finger A, Braun T, Hellmuth K, Wolf DH (1996) Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *EMBO J* **15**: 753-763

Koch J, Guntrum R, Heintke S, Kyritsis C, Tampé R (2004) Functional dissection of the transmembrane domains of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Biol Chem* **279**: 10142-10147

Koch J, Guntrum R, Tampé R (2006) The first N-terminal transmembrane helix of each subunit of the antigenic peptide transporter TAP is essential for independent tapasin binding. *FEBS Lett* **580**: 4091-4096

Koch J, Tampé R (2006) The macromolecular peptide-loading complex in MHC class I-dependent antigen presentation. *Cell Mol Life Sci* **63**: 653-662

Koglin A, Klammt C, Trbovic N, Schwarz D, Schneider B, Schäfer B, Lohr F, Bernhard F, Dötsch V (2006) Combination of cell-free expression and NMR spectroscopy as a new approach for structural investigation of membrane proteins. *Magn Reson Chem* **44 Spec No**: S17-23

Kopito RR (1997) ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* **88**: 427-430

Koppers-Lalic D, Reits EAD, Rensing ME, Lipinska AD, Abele R, Koch J, Rezende MM, Admiraal P, van Leeuwen D, Bienkowska-Szewczyk K, Mettenleiter TC, Rijsewijk FA, Tampé R, Neeffjes JJ, Wiertz E. J. (2005) Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing (TAP). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 5144-5149

Koppers-Lalic D, Rychlowski M, van Leeuwen D, Rijsewijk FA, Rensing ME, Neeffjes JJ, Bienkowska-Szewczyk K, Wiertz EJ (2003) Bovine herpesvirus 1 interferes with TAP-dependent peptide transport and intracellular trafficking of MHC class I molecules in human cells. *Arch Virol* **148**: 2023-2037

Koppers-Lalic D, Verweij MC, Lipinska AD, Wang Y, Quinten E, Reits EA, Koch J, Loch S, Rezende MM, Daus F, Bienkowska-Szewczyk K, Osterrieder N, Mettenleiter TC, Heemskerk MH, Tampé R, Neeffjes JJ, Chowdhury SI, Rensing ME, Rijsewijk FA, Wiertz EJ (2008) Varicellovirus UL 49.5 proteins differentially affect the function of the transporter associated with antigen processing, TAP. *PLoS Pathog* **4**: e1000080

Krmpotic A, Messerle M, Crnkovic-Mertens I, Polic B, Jonjic S, Koszinowski UH (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

Kyritsis C, Gorbulev S, Hutschenreiter S, Pawlitschko K, Abele R, Tampé R (2001) Molecular mechanism and structural aspects of transporter associated with antigen processing inhibition by the cytomegalovirus protein US6. *J Biol Chem* **276**: 48031-48039

Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132

Lake CM, Hutt-Fletcher LM (2000) Epstein-Barr virus that lacks glycoprotein gN is impaired in assembly and infection. *J Virol* **74**: 11162-11172

Le Gall S, Buseyne F, Trocha A, Walker BD, Heard JM, Schwartz O (2000) Distinct trafficking pathways mediate Nef-induced and clathrin-dependent major histocompatibility complex class I down-regulation. *J Virol* **74**: 9256-9266

Le Gall S, Erdtmann L, Benichou S, Berlioz-Torrent C, Liu L, Benarous R, Heard JM, Schwartz O (1998) Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity* **8**: 483-495

Lee S, Yoon J, Park B, Jun Y, Jin M, Sung HC, Kim I-H, Kang S, Choi E-J, Ahn BY, Ahn K (2000) Structural and functional dissection of human cytomegalovirus US3 in binding major histocompatibility complex class I molecules. *J Virol* **74**: 11262-11269

Lehner PJ, Karttunen JT, Wilkinson GW, Cresswell P (1997) The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6904-6909

Levitskaya J, Sharipo A, Leonchiks A, Ciechanover A, Masucci MG (1997) Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12616-12621

- Liang X, Chow B, Li Y, Raggo C, Yoo D, Attah-Poku S, Babiuk LA (1995) Characterization of bovine herpesvirus 1 UL49 homolog gene and product: bovine herpesvirus 1 UL49 homolog is dispensable for virus growth. *J Virol* **69**: 3863-3867
- Liang X, Chow B, Raggo C, Babiuk L (1996) Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfide-linked complex with a second virion structural protein. *J Virol* **70**: 1448-1454
- Lilley BN, Ploegh HL (2004) A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* **429**: 834-840
- Lilley BN, Ploegh HL (2005) Viral modulation of antigen presentation: manipulation of cellular targets in the ER and beyond. *Immunol Rev* **207**: 126-144
- Lilley BN, Tortorella D, Ploegh HL (2003) Dislocation of a type I membrane protein requires interactions between membrane-spanning segments within the lipid bilayer. *Mol Biol Cell* **14**: 3690-3698
- Lipinska AD, Koppers-Lalic D, Rychlowski M, Admiraal P, Rijsewijk FA, Bienkowska-Szewczyk K, Wiertz EJ (2006) Bovine herpesvirus 1 UL49.5 protein inhibits the transporter associated with antigen processing despite complex formation with glycoprotein M. *J Virol* **80**: 5822-5832
- Liu Z, Winkler M, Biegalka B (2008) Human cytomegalovirus: Host immune modulation by the viral US3 gene. *Int J Biochem Cell Biol*
- Loch S, Tampé R (2005) Viral evasion of the MHC class I antigen-processing machinery. *Pflugers Arch* **451**: 409-417
- Loo MA, Jensen TJ, Cui L, Hou Y, Chang XB, Riordan JR (1998) Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J* **17**: 6879-6887
- Loureiro J, Lilley BN, Spooner E, Noriega V, Tortorella D, Ploegh HL (2006) Signal peptide peptidase is required for dislocation from the endoplasmic reticulum. *Nature* **441**: 894-897
- Lybarger L, Wang X, Harris MR, Virgin HWt, Hansen TH (2003) Virus subversion of the MHC class I peptide-loading complex. *Immunity* **18**: 121-130
- Mach M, Kropff B, Dal Monte P, Britt W (2000) Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J Virol* **74**: 11881-11892
- Mach M, Osinski K, Kropff B, Schloetzer-Schrehardt U, Krzyzaniak M, Britt W (2007) The carboxy-terminal domain of glycoprotein N of human cytomegalovirus is required for virion morphogenesis. *J Virol* **81**: 5212-5224
- McCracken AA, Brodsky JL (2005) Recognition and delivery of ERAD substrates to the proteasome and alternative paths for cell survival. *Curr Top Microbiol Immunol* **300**: 17-40
- McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ (2006) Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* **117**: 90-104
- Meacham GC, Patterson C, Zhang W, Younger JM, Cyr DM (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* **3**: 100-105
- Means RE, Lang SM, Jung JU (2007) The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 E3 ubiquitin ligase modulates targets by multiple molecular mechanisms. *J Virol* **81**: 6573-6583
- Misaghi S, Sun Z-YJ, Stern P, Gaudet R, Wagner G, Ploegh H (2004) Structural and functional analysis of human cytomegalovirus US3 protein. *J Virol* **78**: 413-423

- Molinari M, Calanca V, Galli C, Lucca P, Paganetti P (2003) Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* **299**: 1397-1400
- Nathan JA, Lehner PJ (2008) The trafficking and regulation of membrane receptors by the RING-CH ubiquitin E3 ligases. *Exp Cell Res* Epub Nov 5
- Neumann L, Kraas W, Uebel S, Jung G, Tampé R (1997) The active domain of the herpes simplex virus protein ICP47: a potent inhibitor of the transporter associated with antigen processing. *J Mol Biol* **272**: 484-492
- Nikles D, Tampé R (2007) Targeted degradation of ABC transporters in health and disease. *J Bioenerg Biomembr* **39**: 489-497
- Noriega VM, Tortorella D (2008) Human cytomegalovirus-encoded immune modulators partner to down-regulate MHC class I molecules. *J Virol*
- Oberdorf J, Skach WR (2002) In vitro reconstitution of CFTR biogenesis and degradation. *Methods in molecular medicine* **70**: 295-310
- Oresic K, Noriega V, Andrews L, Tortorella D (2006) A structural determinant of human cytomegalovirus US2 dictates the down-regulation of class I major histocompatibility molecules. *J Biol Chem* **281**: 19395-19406
- Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, Sadasivan B, Herberg JA, Grandea AG, Riddell SR, Tampé R, Spies T, Trowsdale J, Cresswell P (1997) A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* **277**: 1306-1309
- Park B, Lee S, Kim E, Cho K, Riddell SR, Cho S, Ahn K (2006) Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing. *Cell* **127**: 369-382
- Park B, Oh H, Lee S, Song Y, Shin J, Sung YC, Hwang SY, Ahn K (2002) The MHC class I homolog of human cytomegalovirus is resistant to down-regulation mediated by the unique short region protein (US)2, US3, US6, and US11 gene products. *J Immunol* **168**: 3464-3469
- Paulsson KM, Jevon M, Wang JW, Li S, Wang P (2006) The double lysine motif of tapasin is a retrieval signal for retention of unstable MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *J Immunol* **176**: 7482-7488
- Peaper DR, Wearsch PA, Cresswell P (2005) Tapasin and ERp57 form a stable disulfide-linked dimer within the MHC class I peptide-loading complex. *EMBO J* **24**: 3613-3623
- Pfänder R, Neumann L, Zweckstetter M, Seger C, Holak TA, Tampé R (1999) Structure of the active domain of the herpes simplex virus protein ICP47 in water/sodium dodecyl sulfate solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **38**: 13692-13698
- Procko E, Raghuraman G, Wiley DC, Raghavan M, Gaudet R (2005) Identification of domain boundaries within the N-termini of TAP1 and TAP2 and their importance in tapasin binding and tapasin-mediated increase in peptide loading of MHC class I. *Immunol Cell Biol* **83**: 475-482
- Purcell AW, Elliott T (2008) Molecular machinations of the MHC-I peptide loading complex. *Curr Opin Immunol* **20**: 75-81
- Qu BH, Strickland EH, Thomas PJ (1997) Localization and suppression of a kinetic defect in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator folding. *J Biol Chem* **272**: 15739-15744
- Qu BH, Thomas PJ (1996) Alteration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator folding pathway. *J Biol Chem* **271**: 7261-7264
- Rabinovich E, Kerem A, Frohlich KU, Diamant N, Bar-Nun S (2002) AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Cell Biol* **22**: 626-634

- Rehm A, Engelsberg A, Tortorella D, Korner IJ, Lehmann I, Ploegh HL, Hopken UE (2002) Human cytomegalovirus gene products US2 and US11 differ in their ability to attack major histocompatibility class I heavy chains in dendritic cells. *J Virol* **76**: 5043-5050
- Reusch U, Muranyi W, Lucin P, Burgert HG, Hengel H, Koszinowski UH (1999) A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J* **18**: 1081-1091
- Reyburn HT, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis DM, Pazmany L, Strominger JL (1997) The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* **386**: 514-517
- Rocha N, Neefjes J (2008) MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. *EMBO J* **27**: 1-5
- Rudolph J, Seyboldt C, Granzow H, Osterrieder N (2002) The gene 10 (UL49.5) product of equine herpesvirus 1 is necessary and sufficient for functional processing of glycoprotein M. *J Virol* **76**: 2952-2963
- Rufer E, Leonhardt RM, Knittler MR (2007) Molecular architecture of the TAP-associated MHC class I peptide-loading complex. *J Immunol* **179**: 5717-5727
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467
- Saric T, Chang SC, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, Tsujimoto M, Goldberg AL (2002) An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* **3**: 1169-1176
- Schaefer MR, Wonderlich ER, Roeth JF, Leonard JA, Collins KL (2008) HIV-1 Nef targets MHC-I and CD4 for degradation via a final common beta-COP-dependent pathway in T cells. *PLoS Pathog* **4**: e1000131
- Schoenhals GJ, Krishna RM, Grandea AG, 3rd, Spies T, Peterson PA, Yang Y, Früh K (1999) Retention of empty MHC class I molecules by tapasin is essential to reconstitute antigen presentation in invertebrate cells. *Embo J* **18**: 743-753
- Schrodt S, Koch J, Tampé R (2006) Membrane topology of the transporter associated with antigen processing (TAP1) within an assembled functional peptide-loading complex. *J Biol Chem* **281**: 6455-6462
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**: 770-774
- Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM (1996) Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* **2**: 338-342
- Schwarz D, Dotsch V, Bernhard F (2008) Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *Proteomics* **8**: 3933-3946
- Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N (2002) ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**: 480-483
- Shamu CE, Flierman D, Ploegh HL, Rapoport TA, Chau V (2001) Polyubiquitination is required for US11-dependent movement of MHC class I heavy chain from endoplasmic reticulum into cytosol. *Mol Biol Cell* **12**: 2546-2555
- Sharipo A, Imreh M, Leonchiks A, Imreh S, Masucci MG (1998) A minimal glycine-alanine repeat prevents the interaction of ubiquitinated I kappaB alpha with the proteasome: a new mechanism for selective inhibition of proteolysis. *Nat Med* **4**: 939-944

- Shin J, Park B, Lee S, Kim Y, Biegelke BJ, Kang S, Ahn K (2006) A short isoform of human cytomegalovirus US3 functions as a dominant negative inhibitor of the full-length form. *J Virol* **80**: 5397-5404
- Stefanovic S, Hegde RS (2007) Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* **128**: 1147-1159
- Stevenson PG, Efstathiou S, Doherty PC, Lehner PJ (2000) Inhibition of MHC class I-restricted antigen presentation by gamma 2-herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8455-8460
- Tellam J, Connolly G, Green KJ, Miles JJ, Moss DJ, Burrows SR, Khanna R (2004) Endogenous presentation of CD8<sup>+</sup> T cell epitopes from Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1. *J Exp Med* **199**: 1421-1431
- Tischer BK, Schumacher D, Messerle M, Wagner M, Osterrieder N (2002) The products of the UL10 (gM) and the UL49.5 genes of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. *J Gen Virol* **83**: 997-1003
- Tomazin R, van Schoot NEG, Goldsmith K, Jugovic P, Sempe P, Früh K, Johnson DC (1998) Herpes simplex virus type 2 ICP47 inhibits human TAP but not mouse TAP. *J Virol* **72**: 2560-2563
- Trombetta ES, Mellman I (2005) Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* **23**: 975-1028
- Tsai B, Ye Y, Rapoport TA (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 246-255
- van Endert PM, Tampé R, Meyer TH, Tisch R, Bach JF, McDevitt HO (1994) A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity* **1**: 491-500
- van Hall T, Laban S, Koppers-Lalic D, Koch J, Precup C, Asmawidjaja P, Offringa R, Wiertz EJ (2007) The varicellovirus-encoded TAP inhibitor UL49.5 regulates the presentation of CTL epitopes by Qa-1b1. *J Immunol* **178**: 657-662
- Verweij MC, Koppers-Lalic D, Loch S, Klauschies F, de la Salle H, Quinten E, Lehner PJ, Mulder A, Knittler MR, Tampé R, Koch J, Rensing ME, Wiertz EJ (2008) The Varicellovirus UL49.5 protein blocks the transporter associated with antigen processing (TAP) by inhibiting essential conformational transitions in the 6+6 transmembrane TAP core complex. *J Immunol* **181**: 4894-4907
- Villadangos JA, Ploegh HL (2000) Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity* **12**: 233-239
- Wang R, Chait BT, Wolf I, Kohanski RA, Cardozo C (1999) Lysozyme degradation by the bovine multicatalytic proteinase complex (proteasome): evidence for a nonprocessive mode of degradation. *Biochemistry* **38**: 14573-14581
- Wang X, Herr RA, Chua WJ, Lybarger L, Wiertz EJ, Hansen TH (2007) Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *J Cell Biol* **177**: 613-624
- Wang X, Lybarger L, Connors R, Harris MR, Hansen TH (2004) Model for the interaction of gammaherpesvirus 68 RING-CH finger protein mK3 with major histocompatibility complex class I and the peptide-loading complex. *J Virol* **78**: 8673-8686
- Ward CL, Omura S, Kopito RR (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**: 121-127
- Watts C (2001) Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol* **13**: 26-31

- Wearsch PA, Cresswell P (2007) Selective loading of high-affinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer. *Nat Immunol* **8**: 873-881
- Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL (1996) The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* **84**: 769-779
- Wonderlich ER, Williams M, Collins KL (2008) The tyrosine binding pocket in the adaptor protein 1 (AP-1) mu1 subunit is necessary for Nef to recruit AP-1 to the major histocompatibility complex class I cytoplasmic tail. *J Biol Chem* **283**: 3011-3022
- Wu H, Kapoor P, Frappier L (2002) Separation of the DNA replication, segregation, and transcriptional activation functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J Virol* **76**: 2480-2490
- Wu SX, Zhu XP, Letchworth GJ (1998) Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein. *J Virol* **72**: 3029-3036
- Xiong X, Chong E, Skach WR (1999) Evidence that endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is linked to retrograde translocation from the ER membrane. *J Biol Chem* **274**: 2616-2624
- Yang Z, Bjorkman PJ (2008) Structure of UL18, a peptide-binding viral MHC mimic, bound to a host inhibitory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 10095-10100
- Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA (2001) The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* **414**: 652-656
- Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA (2004) A membrane protein complex mediates retrotranslocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* **429**: 841-847
- Yewdell JW, Hill AB (2002) Viral interference with antigen presentation. *Nat Immunol* **3**: 1019-1025
- Yin Y, Manoury B, Fahraeus R (2003) Self-inhibition of synthesis and antigen presentation by Epstein-Barr virus-encoded EBNA1. *Science* **301**: 1371-1374
- York IA, Chang SC, Saric T, Keys JA, Favreau JM, Goldberg AL, Rock KL (2002) The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol* **3**: 1177-1184
- Yu YY, Harris MR, Lybarger L, Kimpler LA, Myers NB, Virgin HWt, Hansen TH (2002) Physical association of the K3 protein of gamma-2 herpesvirus 68 with major histocompatibility complex class I molecules with impaired peptide and beta(2)-microglobulin assembly. *J Virol* **76**: 2796-2803

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AAA-ATPase	<i>ATPase associated with various cellular activities</i>
ABC	ATP Bindekassette ( <i>ATP binding cassette</i> )
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BHV	Rinderherpesvirus ( <i>bovine herpesvirus</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CLIP	Klasse II assoziierte invariante Kette-Peptid ( <i>class II associated invariant chain peptide</i> )
CMV	Zytomeglievirus
CNX	Calnexin
Co-IP	Coimmunpräzipitation
CRT	Calreticulin
CTL	Zytotoxische T-Zelle ( <i>cytotoxic T-cell</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DRiPs	Defekte Ribosomale Produkte ( <i>defective ribosomal products</i> )
DTT	Dithiothreithol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBNA	<i>Epstein-Barr virus nuclear antigen</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDEM	<i>ER degradation-enhancing <math>\alpha</math>-mannosidase-like protien</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EHV	Pferdeherpesvirus ( <i>equine herpesvirus</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-associated proteasomal degradation</i>
ERGIC	<i>Endoplasmatic reticulum golgi intermediate compartment</i>
FCSi	inaktiviertes, fötales Kälberserum
FHV	Katzenherpesvirus ( <i>feline herpesvirus</i> )
GHV	<i>gallid herpesvirus</i>
HC	Schwere Kette ( <i>heavy chain</i> )
HHV	Humanes Herpesvirus
His <sub>10</sub>	Deca-Histidin
HIV	Humanes Immundefizienzvirus ( <i>human immunodeficiency virus</i> )
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen ( <i>human leucocyte antigen</i> )
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horse raddish peroxidase</i> )
HSV	Herpes simplexvirus
HVZV	Humanes Varicella-Zoster-Virus ( <i>human varicella zoster virus</i> )

ICP	<i>infected cell protein</i>
KSHV	Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus
LB	Luria broth
MDV	<i>marek's disease virus</i>
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MOI	Multiplizität der Infektion ( <i>multiplicity of infection</i> )
NBD	Nukleotidbindedomäne
NK	Natürliche Killerzelle
NMR	Kern(spin)resonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAPC	Professionell antigenpräsentierende Zelle ( <i>professional antigen presenting cell</i> )
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pfu	Plaque-formende Einheit ( <i>plaque forming unit</i> )
PHD	<i>plant homeodomain</i>
PI-Mix	Proteaseinhibitor-Mix
PLC	Peptidbeladungskomplex ( <i>peptide loading complex</i> )
PrV	Pseudorabiesvirus
RNA	Ribonucleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RRL	Kaninchen-Reticulozyten-Lysat ( <i>rabbit reticulocyte lysate</i> )
SDS	Natrium Dodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SHV	Schweineherpesvirus ( <i>suid herpesvirus</i> )
SPP	Signalpeptid-Peptidase
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
TAP	Transporter der Antigenprozessierung ( <i>Transporter associated with antigen processing</i> )
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline – Tween20</i>
TCA	Trichloracetat
TCR	T-Zell Rezeptor ( <i>T-cell receptor</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans <i>Golgi</i> Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
TPN	Tapasin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
UL	<i>unique long region</i>
US	<i>unique short region</i>
UV	Ultraviolett
VCP	<i>valosin-containing protein</i>
VIMP	<i>VCP-interacting membrane protein</i>
wt	Wildtyp

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Überblick über den MHC Klasse II-Weg der Antigenpräsentation.....	8
Abbildung 2.	Überblick über den MHC Klasse I-Weg der Antigenpräsentation.....	10
Abbildung 3.	Assemblierung des Peptidbeladungskomplexes (PLC) .....	12
Abbildung 4.	Schematische Darstellung des heterodimeren TAP-Transporters.....	13
Abbildung 5.	Übersicht über den Ubiquitin-Proteasom-Weg.....	15
Abbildung 6.	Degradation von Proteinen im ER über den ERAD-Weg .....	17
Abbildung 7.	Virale Inhibitoren des heterodimeren TAP-Transporters .....	24
Abbildung 8.	Virale Proteine, die mit MHC I-Molekülen interagieren .....	30
Abbildung 9.	Schematische Darstellung des BHV-1 UL49.5-Proteins .....	33
Abbildung 10.	Konstrukt für Hefe-Zwei-Hybrid-System .....	58
Abbildung 11.	Schema des BiFC am Beispiel von bFos und bJun .....	70
Abbildung 12.	Schema des BiFC von TAP und UL49.5 .....	70
Abbildung 13.	Interaktionsstudien zwischen UL49.5 und dem PLC in Insektenzellen .....	83
Abbildung 14.	Transport-Inhibition durch UL49.5.....	84
Abbildung 15.	TAP-Degradation in Insektenzellen durch UL49.5.....	85
Abbildung 16.	coreTAP-Degradation in Insektenzellen durch UL49.5.....	86
Abbildung 17.	Expression von UL49.5 Cystein-Mutanten in Insektenzellen .....	87
Abbildung 18.	Coimmunpräzipitation von UL49.5 Cystein-Mutanten .....	88
Abbildung 19.	Transport-Inhibition durch UL49.5 Cystein-Mutanten .....	89
Abbildung 20.	MHC I Suppression durch UL49.5 Cystein-Mutanten.....	90
Abbildung 21.	Colokalisation von UL49.5-EGFP und Calnexin .....	91
Abbildung 22.	<i>In vivo</i> Interaktion zwischen TAP1 und UL49.5 (BiFC) .....	92
Abbildung 23.	MHC I-Suppression durch C-terminal verkürzte UL49.5-Varianten .....	94
Abbildung 24.	Transport-Inhibition durch UL49.5.....	95
Abbildung 25.	MHC I-Suppression durch UL49.5 Lysin-Mutanten .....	96
Abbildung 26.	MHC I-Suppression durch chimäre UL49.5-Proteine .....	97
Abbildung 27.	MHC I-Suppression durch C-terminal verkürztes UL49.5.....	98
Abbildung 28.	Stimulation von HeLa-Zellen mit IFN- $\gamma$ .....	100

Abbildung 29.	Transport-Inhibition nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ .....	101
Abbildung 30.	Einfluss von C-terminal verkürztem UL49.5 auf TAP-Degradation.....	102
Abbildung 31.	Expression und Prozessierung der UL49.5-YN Fusionsproteine .....	103
Abbildung 32.	MHC I-Suppression durch N-terminal verkürztes UL49.5.....	104
Abbildung 33.	Einfluss von N-terminal verkürztem UL49.5 auf TAP-Degradation.....	106
Abbildung 34.	Sequenzvergleich homologer UL49.5-Proteine .....	107
Abbildung 35.	In vivo Interaktion zwischen TAP1 und UL49.5-Homologen (BiFC) .....	108
Abbildung 36.	MHC I-Suppression durch varicellovirale UL49.5-Proteine .....	109
Abbildung 37.	Transport-Inhibition durch UL49.5-Homologe in MJS-Zellen.....	110
Abbildung 38.	Transport-Inhibition durch UL49.5-Homologe .....	111
Abbildung 39.	Einfluß von UL49.5 auf Peptidbindung an TAP .....	112
Abbildung 40.	Übersicht über das Hefe-Zwei-Hybrid-System .....	114
Abbildung 41.	Zellfreie Expression von UL49.5.....	117
Abbildung 42.	<i>In vitro</i> Translation in Anwesenheit/Abwesenheit von Membranen.....	120
Abbildung 43.	<i>In vitro</i> Translation von TAP1 und TAP2 .....	121
Abbildung 44.	<i>In vitro</i> Translation in Raji- und Hunde-Pankreas-Mikrosomen.....	122
Abbildung 45.	Bindung von <i>in vitro</i> translatierten UL49.5-Varianten an TAP .....	124
Abbildung 46.	Stabilität von <i>in vitro</i> translatiertem UL49.5 in Raji-Mikrosomen .....	125
Abbildung 47.	Stabilität von UL49.5 nach Degradation in HeLa-Lysat .....	127
Abbildung 48.	Inhibitionsmechanismus von UL49.5.....	134
Abbildung 49.	Modell für die Funktionsweise von US2 .....	136
Abbildung 50.	Phylogenetischer Stammbaum der UL49.5-Proteine .....	138

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Übersicht über humanpathogene Herpesviren .....	20
Tabelle 2.	Übersicht über die wirtschaftlich bedeutendsten Tier-Herpesviren .....	32
Tabelle 3.	Reaktionsmix und Bedingungen einer PCR .....	48
Tabelle 4.	Reaktionsansatz für Phosphorylierung der LCR-Primer .....	49
Tabelle 5.	Reaktionsmix und Bedingungen für die LCR .....	49
Tabelle 6.	Reaktionsmix für die Ligation .....	50
Tabelle 7.	Primer für Klonierung von UL49.5 –EGFP Fusionsproteinen .....	54
Tabelle 8.	Primer für Klonierung von UL49.5 –Split-YFP Fusionsproteinen.....	55
Tabelle 9.	Primer für Klonierung von coreTAP1 –Split-YFP Fusionsproteinen.....	55
Tabelle 10.	Primer für Klonierung von UL49.5 in den pIRES2-EGFP-Vektor .....	56
Tabelle 11.	Primer für Klonierung von C-terminal verkürzten UL49.5-Varianten .....	56
Tabelle 12.	Primer für Klonierung chimärer UL49.5-Varianten .....	57
Tabelle 13.	Primer für Klonierung von UL49.5-Varianten in den pFastBac1-Vektor.....	57
Tabelle 14.	Primer für Klonierung für das Hefe-Zwei-Hybrid-System .....	58
Tabelle 15.	Primer für Klonierung von UL49.5 für zellfreie Expression .....	59
Tabelle 16.	Primer für Klonierung von UL49.5 für <i>in vitro</i> Transkription.....	59
Tabelle 17.	Primer für Punktmutationen in UL49.5.....	60
Tabelle 18.	Sequenzierprimer .....	60
Tabelle 19.	Konzentration der Zusätze in LB-Agar-Platten .....	61
Tabelle 20.	Reaktionsmix und PCR zum Test auf doppelt-positive Klone.....	63
Tabelle 21.	Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenz. ....	72
Tabelle 22.	Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele nach Laemmli (2 Gele).....	74
Tabelle 23.	Verwendete Antikörper für Immunoblots. ....	75
Tabelle 24.	Reaktionsmix für <i>in vitro</i> Transkription (10 µl Endvolumen).....	79
Tabelle 25.	Reaktionsmix für <i>in vitro</i> Translation (10 µl Endvolumen) .....	80
Tabelle 26.	Reaktionsmix für <i>in vitro</i> Degradation (100 µl Endvolumen).....	81
Tabelle 27.	Ergebnisse des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens.....	115

## 9 Anhang

### 9.1 Klassifizierung von Herpesviren

nach <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

#### Virusfamilie Herpesviridae (Herpesviren)

##### Unterfamilie Alphaherpesvirinae

- Iltovirus
  - Gallid herpesvirus 1
  - unclassified Iltovirus
- Mardivirus
  - Gallid herpesvirus 2 (Marek's disease virus type 1)
  - Gallid herpesvirus 3 (Marek's disease virus type 2)
  - Meleagrid herpesvirus 1 (Turkey herpesvirus)
- Simplexvirus
  - Ateline herpesvirus 1
  - Bovine herpesvirus 2
  - Cercopithecine herpesvirus 1 (B virus)
  - Cercopithecine herpesvirus 16
  - Cercopithecine herpesvirus 2 (SA8)
  - Human herpesvirus 1 (Herpes simplex virus type 1)
  - Human herpesvirus 2 (Herpes simplex virus type 2)
  - Macropodid herpesvirus 1 (parma wallaby herpesvirus)
  - Macropodid herpesvirus 2 (dorcopsis wallaby herpesvirus)
  - Saimiriine herpesvirus 1
  - unclassified Simplexvirus
- **Varicellovirus**
  - Bovine herpesvirus 1
  - Bovine herpesvirus 5
  - Bubaline herpesvirus 1
  - Canid herpesvirus 1
  - Caprine herpesvirus 1 (goat herpesvirus)
  - Cercopithecine herpesvirus 9 (Simian varicella virus)
  - Cervid herpesvirus 1
  - Cervid herpesvirus 2
  - Equid herpesvirus 1 (Equine herpesvirus 1)
  - Equid herpesvirus 3
  - Equid herpesvirus 4 (Equine herpesvirus 4)
  - Equid herpesvirus 8
  - Equid herpesvirus 9
  - Felid herpesvirus 1
  - Human herpesvirus 3 (Varicella-zoster virus)
  - Phocid herpesvirus 1
  - Suid herpesvirus 1 (Pseudorabies virus)
  - unclassified Varicellovirus
- unclassified Alphaherpesvirinae
  - Bottlenose dolphin herpesvirus
  - Bovine herpesvirus 3
  - Chimpanzee alpha-1 herpesvirus
  - Gerrhosaurid herpesvirus 1
  - Gerrhosaurid herpesvirus 2
  - Gerrhosaurid herpesvirus 3
  - Iguanid herpesvirus 2

- Psittacid herpesvirus 1
- Rangiferine herpesvirus 1
- Tursiops truncatus alphaherpesvirus 1
- Tursiops truncatus alphaherpesvirus 2
- Tursiops truncatus alphaherpesvirus 3
- Vulture herpesvirus

### **Unterfamilie Betaherpesvirinae**

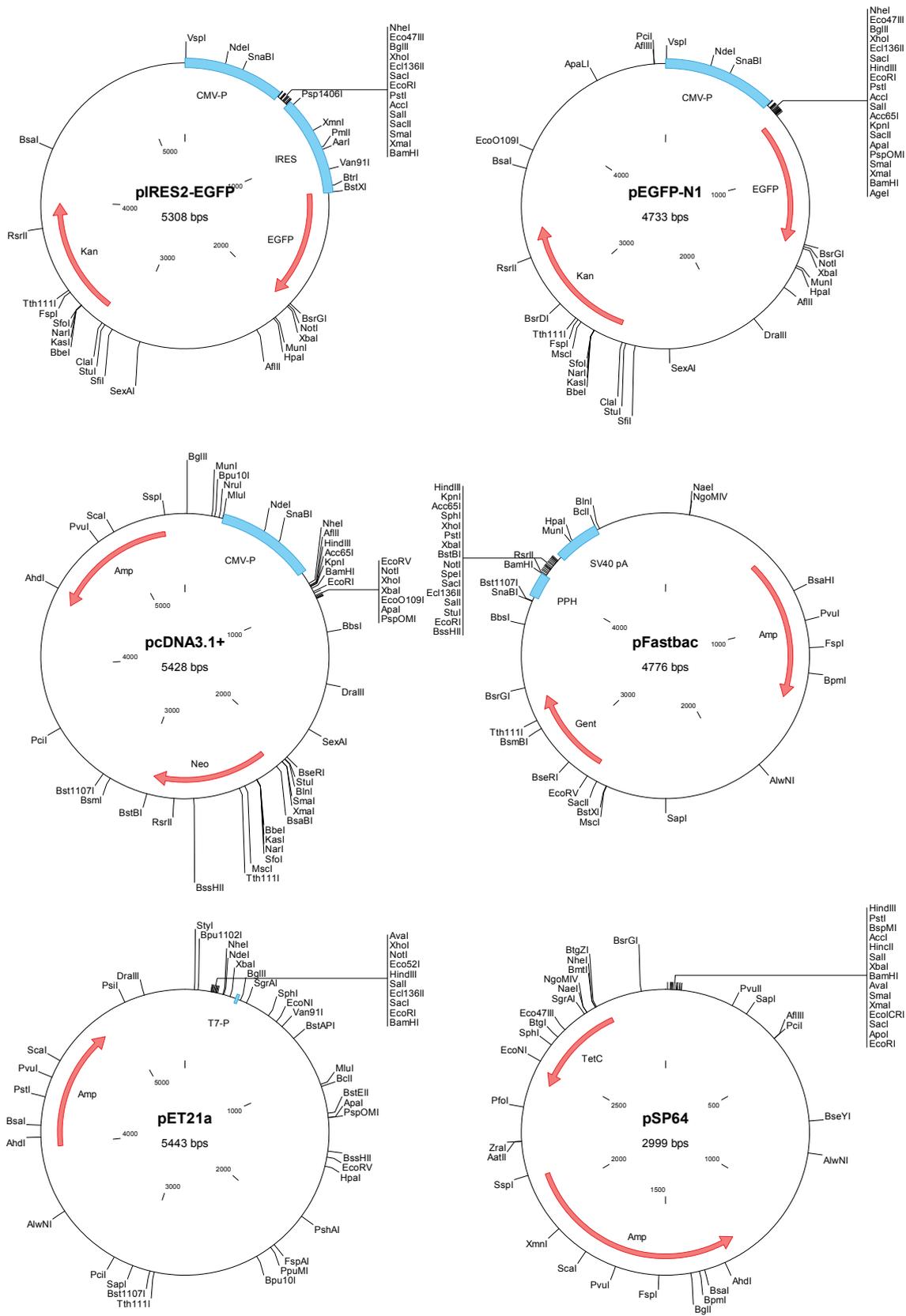
- Cytomegalovirus
  - Cercopithecine herpesvirus 5
  - Cercopithecine herpesvirus 8 (Rhesus cytomegalovirus)
  - Human herpesvirus 5 (Human cytomegalovirus)
    - Pongine herpesvirus 4 (Chimpanzee cytomegalovirus)
    - unclassified Cytomegalovirus
- Muromegalovirus
  - Murid herpesvirus 1 (Murine cytomegalovirus)
  - Murid herpesvirus 2 (Rat cytomegalovirus)
- Roseolovirus
  - Human herpesvirus 6
  - Human herpesvirus 7
  - unclassified Roseolovirus
- unclassified Betaherpesvirinae
  - Atypical cytopathic virus
  - Elephantid herpesvirus 1
  - Macaca mulatta cytomegalovirus
  - Mandrillus herpesvirus beta
  - Miniopterus schreibersii betaherpesvirus 1a
  - Miniopterus schreibersii betaherpesvirus 1b
  - Myotis blythii betaherpesvirus
  - Myotis myotis betaherpesvirus
  - Myotis nattereri betaherpesvirus
  - Nycticebus coucang betaherpesvirus 1
  - Porcine cytomegalovirus B6
  - Porcine cytomegalovirus OF-1
  - Tupaiid herpesvirus 1
  - Tupaiid herpesvirus 2

### **Unterfamilie Gammaherpesvirinae**

- Lymphocryptovirus
  - Callitrichine herpesvirus 3 (Marmoset lymphocryptovirus)
  - Cercopithecine herpesvirus 12
  - Cercopithecine herpesvirus 15 (Rhesus lymphocryptovirus)
  - Human herpesvirus 4 (Epstein-Barr virus)
  - Pongine herpesvirus 1
  - Pongine herpesvirus 2
  - Pongine herpesvirus 3
  - unclassified Lymphocryptovirus
- Rhadinovirus
  - Alcelaphine herpesvirus 1 (wildebeest herpesvirus)
  - Alcelaphine herpesvirus 2
  - Ateline herpesvirus 2 (Herpesvirus ateles)
  - Bovine herpesvirus 4
  - Cercopithecine herpesvirus 17 (Rhesus rhadinovirus)
  - Equid herpesvirus 2 (Equine herpesvirus 2)
  - Equid herpesvirus 5
  - Equid herpesvirus 7

- Hippotragine herpesvirus 1
- Human herpesvirus 8
- Murid herpesvirus 4 (Murine herpesvirus 68)
- Mustelid herpesvirus 1
- Ovine herpesvirus 2
- Pan troglodytes rhadinovirus 2
- Saimiriine herpesvirus 2 (Herpesvirus saimiri)
- unclassified Rhadinovirus
- unclassified Gammaherpesvirinae
  - American bison gammaherpesvirus
  - Artiodactyla gammaherpesvirus genogroup 1
  - Asinine herpesvirus 4
  - Asinine herpesvirus 5
  - Asinine herpesvirus 6
  - Asinine herpesvirus AHV5
  - California sea lion herpesvirus
  - Deer malignant catarrhal fever virus
  - Elephantid herpesvirus 3
  - Elephantid herpesvirus 4
  - Elephantid herpesvirus 6
  - Elephas maximus gammaherpesvirus 1
  - Hawaiian monk seal herpesvirus
  - Hexaprotodon liberiensis lymphotropic herpesvirus 1
  - Impala herpesvirus 1
  - Macropodid herpesvirus 3
  - Murine herpesvirus 72
  - Northern elephant seal herpesvirus
  - Porcine gamma-herpesvirus
  - Sorex araneus gammaherpesvirus 1
  - Springbok herpesvirus 1
  - Springbok herpesvirus 2
  - Tapir herpesvirus
  - Trichechid herpesvirus 1
  - Vaal rhebok herpesvirus MMN-2004
  - Wild ass herpesvirus
  - Zebra herpesvirus

### 9.2 Plasmidkarten



## Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Robert Tampé für das interessante und spannende Thema sowie die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Sein reges Interesse am Fortgang meiner Arbeit waren Motivation und Herausforderung zugleich.

Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit und die Zusammenarbeit bei dem BiFC-System.

Insbesondere möchte ich Dr. Joachim Koch für die ausgezeichnete Betreuung meines Projekts und die Diskussions- und Hilfsbereitschaft beim Schreiben/Korrigieren der Publikationen und dieser Arbeit danken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Praktikanten und Diplomanten bedanken, die mich bei der Durchführung meiner Experimente tatkräftig unterstützt haben: Laura Wilk, Michael Fiolka, Florian Klauschies, Elena Grabski, Irina Bangert, Kathleen Hobohm, und insbesondere Jessica Funke, die die Arbeit an diesem Projekt während ihrer Zeit als wissenschaftliche Hilfskraft und ihrer Diplomarbeit immer mit vorangetrieben hat.

Für die Unterstützung im Labor möchte ich besonders Renate Guntrum und Christian Schölz danken, die stets ein offenes Ohr für mich hatten. Außerdem danke ich allen weiteren jetzigen und früheren Mitgliedern des Labors 1.23 bzw. 1.22 und der „TAP“-Gruppe für die angenehme Atmosphäre und die schöne Zeit im Labor sowie deren stetige Hilfsbereitschaft auch über die Grenzen des Labors hinaus.

Allen Kollegen des Instituts für Biochemie gilt mein besonderer Dank für das angenehme Arbeitsklima und die fachlichen und fachübergreifenden Diskussionen.

Ein besonders kulinarischer Dank gilt allen Mitgliedern des Kulinarischen Zirkels, da wir zusammen viele kulinarische Hochgenüsse aber auch Enttäuschungen erlebt haben und weil hieraus wunderbare Freundschaften entstanden sind.

Prof. William Skach von der OHSU, Portland (USA) danke ich dafür, dass ich die Gelegenheit bekommen habe, während eines 3-monatigen Forschungsaufenthaltes in seinem Labor Einblicke in neue Techniken zu bekommen. Ich danke ihm auch für

die Unterstützung bei der Etablierung des Systems der *in vitro* Translation in Frankfurt. David Pitonzo danke ich für die Betreuung dieses Projektes in Portland, sowie allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe von William Skach für das angenehme Arbeitsklima.

Prof. Emmanuel Wiertz von der LUMC, Leiden (NL) danke ich für die besonders ergiebige Kooperation und die Bereitstellung von Antikörpern und Zelllinien.

Ich danke Prof. Tom Kerppola von der University of Michigan Medical School, Ann Arbor (USA) für die Bereitstellung von DNA-Konstrukten für das BiFC-System und die Hilfsbereitschaft bei der Etablierung dieses Systems in Frankfurt.

Prof. Ivan Dikic vom Universitätsklinikum Frankfurt danke ich für die Durchführung des Y2H-Screens in Zusammenarbeit mit Christina Hecker in seinem Labor und die anregenden Diskussionen.

Prof. Volker Dötsch von der Universität Frankfurt danke ich für die zellfreie Expression von UL49.5 in seinem Labor in Zusammenarbeit mit Christian Klammt.

Ein besonders liebevoller Dank gilt meinem langjährigen Partner Sascha, der sowohl in guten als auch in schlechten Zeiten für mich da war und mich stets unterstützt und motiviert hat.

Meiner Mutter und meinen Großeltern danke ich ganz herzlich für ihre stetige Hilfsbereitschaft in jeglicher Hinsicht und der liebevollen Unterstützung während all der Jahre.

## Lebenslauf

**Name:** Sandra Loch  
**Geburtsdatum /-ort:** 30.07.1979, Kronberg/Ts.  
**Nationalität:** Deutsch + Französisch  
**Familienstand:** ledig



### Schulausbildung

16.06.1998 Abitur an der Main-Taunus Schule Hofheim, Note: 1,4

### Studium

10/1998 – 09/2003 Gutenberg-Universität Mainz, Studium der Biologie, Schwerpunkte: Biochemie, Genetik, Mikrobiologie  
25.10.2000 Vordiplom, Note: „sehr gut“  
12/2002 – 08/2003 Diplomarbeit: „RNAi-Technologie zur Unterdrückung der Genexpression potentieller alpha-Sekretasen in Säugerzellkulturen“  
29.08.2003 Diplom, Note: „Mit Auszeichnung“  
seit 10/2003 Studium der Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt  
Promotion in Biochemie: „Entschlüsselung des Inhibitionsmechanismus des varicelloviralen Faktors UL49.5“  
03/2008 – 06/2008 Oregon Health and Science University Portland, USA, Forschungsaufenthalt im Rahmen der Doktorarbeit

### Berufliche Tätigkeiten, Praktika

seit 02/2009 Patentanwaltskandidatin bei der Patentanwaltskanzlei Meyer-Dulheuer&Partner, Frankfurt  
04/2001 – 02/2003 Tutorien für Studienanfänger am Institut für Molekulare Tierphysiologie  
04/2001 – 07/2002 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Molekulare Tierphysiologie und Institut für Zoologie  
08/2002 – 10/2002 Praktikum bei der Firma Merck Darmstadt, Bereich Life Science Products/ Research&Development

## Zusatzqualifikationen

Sprachen: Englisch (verhandlungssicher),  
Französisch (verhandlungssicher)

EDV-Kenntnisse: Textverarbeitung Word, Tabellenkalkulation Excel,  
PowerPoint (alle ständig in Anwendung),  
SAP R3, Unix (Grundkenntnisse)

## Konferenzteilnahmen

05/2005 5th Transport Colloquium – Schloss Rauischholzhausen

10/2005 Katzir Conference „Molecular Perspectives on Protein-Protein Interactions“ – Eilat, Israel  
Beitrag: Kurzvortrag

10/2006 Symposium „Membrane Proteins 2006“ – Naurod  
Posterbeitrag

05/2007 6th Transport Colloquium – Schloss Rauischholzhausen  
Posterbeitrag

## Publikationen

**Loch S**, Klauschies F, Schölz C, Verweij M, Wiertz EJHJ, Koch J, Tampé R (2008) Signaling of a varicelloviral factor across the endoplasmic reticulum membrane induces destruction of the peptide-loading complex and immune evasion. *J Biol Chem* 283: 13428-13436

Koppers-Lalic D, Verweij M, Lipińska A, Wang Y, Quinten E, Reits EA, Koch J, **Loch S**, et al. (2008) Varicellovirus UL49.5 proteins differentially affect the function of the transporter associated with antigen processing, TAP. *PLoS Pathog* 4(5): e1000080

Verweij M, Koppers-Lalic D, **Loch S**, et al. (2008) Structural and functional dissection of the interaction of the varicellovirus-encoded immune evasion protein UL49.5 with TAP. *J Immunol* 181(7): 4894-907

**Loch S** and Tampé R (2005) Viral evasion of the MHC class I antigen-processing machinery. *Pflügers Arch* 451: 409-417

**Loch S** and Tampé R (2005) Immunevasine – Tricks, wie Viren dem Immunsystem entkommen. *BIOspektrum* 2: 157-161