

Die Rolle zytoplasmatischer  
Signalmotive des Herpes  
Simplex Virus Typ 1  
Glykoprotein B für die  
endosomale Sortierung von  
Komponenten des MHC Klasse II  
Prozessierungsweges

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Naima Niazy**

aus

Bad Kreuznach

Bonn 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. N. Koch
2. Gutachter: Prof. Dr. S. Burgdorf

Tag der Promotion: 27.10.2015  
Erscheinungsjahr: 2015

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Norbert Koch danke ich für die Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten und für die wertvolle Beratung und Betreuung. Prof. Sven Burgdorf danke ich für seine Arbeit als Zweitbetreuer und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt Frau Prof. Anna-Maria Eis-Hübinger, der mir bei Fragen hilfreich zur Seite gestanden und mir ermöglicht hat, die Virusinfektionen durchzuführen und Dr. Tone Gregers für die Versorgung mit Plasmid-Konstrukten. Außerdem möchte ich mich Herrn Prof. Walter Witke und seiner Arbeitsgruppe dafür bedanken, dass sie mir ihre Ultrazentrifuge und Fluoreszenzmikroskope zur Verfügung stellten.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Instituts für eine freundliche Arbeitsatmosphäre und entspannende Zusammenarbeit. Dabei gilt mein besonderer Dank den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Koch: Sebastian Temme, der mich mit wertvollen Anmerkungen und Ratschlägen unterstützt und die Arbeit Korrektur gelesen hat, Angelika König, die mich bei der täglichen Laborarbeit technisch unterstützt hat, Carmen Giesen, Hannah Kleines, Max Schilling und Nadine Kämper danke ich für wertvolle Anregungen und eine gute Zusammenarbeit.

Bei Silke Reiter bedanke ich mich dafür, dass sie mich moralisch unterstützt und meine Arbeit Korrektur gelesen hat.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und Geschwistern, für so viel mehr, als das Korrekturlesen der Arbeit. Unsere Kindheit bestimmt nicht unwesentlich, zu welchen Menschen wir heranwachsen und ich danke euch dafür, dass ihr mir ermöglicht habt, die Person zu werden, die ich heute bin.

---

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Intrazellulärer Transport von Membranproteinen .....	6
1.1.1	Regulation der Fusion des frühen Endosoms .....	7
1.1.2	multivesikuläre Endosomen.....	9
1.1.3	Exosomen.....	10
1.2	Der Haupthistokompatibilitätskomplex .....	11
1.2.1	Aufbau des MHC Klasse II / Invariante Kette Oligomers .....	12
1.2.2	MHC Klasse II Prozessierung .....	13
1.2.3	Transport Peptid beladener MHC II-Moleküle .....	14
1.3	Herpes Simplex Viren.....	15
1.3.1	Fusion der Virushülle mit der Zielzelle .....	16
1.3.2	Das HSV-1 Glykoprotein B.....	17
1.3.3	Immunantwort gegen Herpesvirusinfektionen .....	19
1.3.4	Immunevasionsstrategien von Herpes Simplex Viren.....	20
1.4	Fragestellung der Arbeit .....	22
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	23
2.1.1	Geräte.....	23
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien .....	25
2.1.4	Antikörper .....	28
2.1.5	Plasmide und Oligonucleotide .....	29
2.1.6	Bakterienstämme.....	31
2.1.7	Virusstamm.....	31
2.1.8	Zelllinien.....	32
2.1.9	Programme und Onlinetools.....	32
2.2	Methoden der Molekularbiologie .....	33
2.2.1	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration .....	33
2.2.2	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	33
2.2.3	PCR: in vitro Amplifikation von DNA .....	34
2.2.4	Synthese von A-Überhängen .....	34
2.2.5	Agarosegel-Elektrophorese .....	34
2.2.6	Extraktion von DNA aus dem Agarosegel.....	34

---

2.2.7	Enzymatische Restriktion .....	35
2.2.8	TOPO Klonierung .....	35
2.2.9	Kultivieren und transformieren von Prokaryotischen Zellen .....	35
2.2.10	Sequenzieren der DNA.....	36
2.3	Methoden der Proteinbiochemie .....	36
2.3.1	Präparation von Proteinen aus adhären-ten Zellen.....	36
2.3.2	Immunpärzipitation .....	36
2.3.3	Verdau mit Endoglykosidase H und Peptid-N-Glykosidase F .....	37
2.3.4	SDS-PAGE .....	37
2.3.5	Westernblot und Immundetektion.....	38
2.3.6	Nachweis von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue oder Ponceau S.....	38
2.3.7	Immunfloureszenzfärbung.....	39
2.3.8	Durchflusszytometrie .....	39
2.4	Methoden der Zellbiologie .....	40
2.4.1	Kultivierung eukariotischer Zellen .....	40
2.4.2	Transiente und stabile Expression in eukariotischen Zellen .....	40
2.4.3	Untersuchung der Internalisierung von der Zelloberfläche .....	41
2.4.4	Gewinnung von Exosomen aus Zellkulturüberstand .....	41
2.4.5	Infektion von Zellen mit HSV-1 .....	42
2.5	Statistische Methoden .....	42
2.5.1	Deskriptive Statistik .....	42
2.5.2	Signifikanz und Mittelwertunterschiede .....	43
3	Ergebnisteil.....	44
3.1	Charakterisierung morphologischer Verände-rungen nach HSV-1 gB Expression .	44
3.1.1	HSV-1 gB induziert vergrößerte intrazelluläre Vesikel .....	44
3.1.2	stark vergrößerte gB induzierte Vesikel kofärben mit frühendosomal- en Markern .....	47
3.1.3	Kofärbung von gB mit Calnexin .....	49
3.1.4	gB induzierte leicht vergrößerte Vesikel kolokalisieren mit spätendosomal- en Markern .....	50
3.1.5	Der PI3P-Kinaseinhibitor Wortmannin hemmt die gB induzierte Vesikelbildung . .....	51
3.2	Die Rolle zytoplasmatischer Transportmotive im endosomal- en Transport.....	54
3.2.1	Das YMAL Motiv wirkt als ER-Exportsignal.....	54
3.2.2	Der <sup>889</sup> YTQVPN <sup>894</sup> Sequenzbereich ist für die Lokalisation von gB im frühen Endosom erforderlich .....	57

---

3.2.3	Untersuchung des Transports von Antikörper gebundenem gB in frühe Endosomen nach Internalisierung.....	60
3.2.4	Einfluss der Trimerisierung auf den Transport von gB.....	63
3.3	Beeinflussung des MHC Klasse II Prozessierungswegs durch gB Expression .....	69
3.3.1	MHC Klasse II und Invariante Kette kolokalisieren mit gB-GFP in leicht und stark vergrößerten Vesikeln .....	69
3.3.2	MHC Klasse II und Invariante Kette kolokalisieren mit gB in EEA1 positiven Vesikeln .....	71
3.3.3	Kofärbungen von endosomalen Markern oder DR mit gB in HSV-1 infizierten Zellen .....	74
4	Diskussion .....	76
4.1	gB induzierte morphologische Veränderung frühendosomaler und spätendosomaler Vesikel .....	76
4.2	gB verursacht die Vergrößerung von frühen endosomalen Vesikeln.....	78
4.3	Die Rolle zytoplasmatischer Sortierungssignale beim endosomalen Transport von gB .....	80
4.4	Die Trimerisierung des zytoplasmatischen Teils ist notwendig für den endosomalen Transport von gB .....	83
4.5	gB beeinflusst die zelluläre Verteilung von Proteinen des MHC Klasse II Prozessierungsweges .....	85
5	Zusammenfassung .....	88
6	Literatur .....	89
7	Abkürzungsverzeichnis.....	104

# 1 Einleitung

## 1.1 Intrazellulärer Transport von Membranproteinen

Eukaryotische Zellen enthalten verschiedene Arten membranumschlossener Kompartimente mit spezialisierten Funktionen. Im rauen ER werden Proteine produziert, die für das ER, andere Organellen, die Plasmamembran oder den Extrazellulärraum bestimmt sind. Die Erkennung von Signalpeptiden zur ER-Translokation erfolgt kotranslational, das heißt die Ribosomen binden während der Translation ans raue ER und das Protein wird ins ER-Lumen hineinsynthetisiert. Bereits während der Faltung durch Chaperone des ER (z.B. Calnexin) werden Proteine, die entsprechende Signalsequenzen tragen, N-glykosyliert. Im Golgi kommt es zur weiteren Modifikation und Prozessierung der Glykoproteine, bevor sie vom Trans-Golgi-Netzwerk aus zur Plasmamembran oder anderen Organellen sortiert werden (Tannous et al. 2014).

Das endosomale System ist ein Netzwerk miteinander fusionierender Vesikel und dient dem Transport von und zur Plasmamembran und dem Abbau von Proteinen und Lipiden. Frühes Endosom und Recycling-Endosom sind an Endozytose und Exozytose beteiligt und stehen im Austausch mit dem Trans-Golgi-Netzwerk (Miaczynska et al. 2004; Lakadamyali et al. 2006). Dabei bilden frühe Endosomen nicht nur passive Auffangstationen für Rezeptoren nach der Endozytose, sondern können auch von der Plasmamembran kommende Signale amplifizieren oder terminieren (Miaczynska et al. 2004).

Im Laufe der endosomalen Reifung werden frühendosomale gegen endosomale Marker ausgetauscht und für den Abbau bestimmte Proteine werden durch ESCRT ("endosomal sorting complexes required for transport") Proteine gebunden und in intraluminale Vesikel sortiert. Die Abschnürung erfolgt nicht durch die Bildung eines Proteinkäfigs an der Außenseite des Vesikels, sondern wird durch die Anlagerung der ESCRT Komplexe am Vesikelhals bewirkt. Es kommt zur Bildung multivesikulärer Endosomen, welche nicht mehr am Transport zur Plasmamembran beteiligt sind. V-Typ ATPasen, die als Protonenpumpen wirken, führen zu einer Absenkung des luminalen pH-Werts (Forgacs 2007). Es entstehen Lysosomen, die einen niedrigen luminalen pH besitzen und hohe Konzentrationen an sauren Hydrolasen enthalten. Im

Lysosom werden Makromoleküle, endosomale Proteine und Lipide abgebaut (Huotari und Helenius 2011). Die Degradation von Mitochondrien, Zellorganellen und Proteinaggregaten wird durch Autophagosomen vermittelt, die die abzubauenden Kompartimente mit einer Doppelmembran umschließen und dann mit Endosomen oder Lysosomen fusionieren (Lamb et al. 2013).

Sowohl der Transport zwischen ER und Golgi-Apparat, als auch der von, zu und zwischen endosomalen und lysosomalen Kompartimenten erfolgt mit Hilfe von Transportvesikeln. Die Spezifität dieses Transports wird durch die beteiligten Rab und SNARE Proteine gewährleistet. Rab Proteine sind GTPasen, das heißt ihre Funktion ist von der Bindung von GTP und der Aktivierung durch GTP-Austauschfaktoren abhängig. Die einzelnen Mitglieder der Rab Proteinfamilie sind an verschiedenen Kompartimenten und Transportwegen zu finden, beispielsweise ist Rab5 am frühen und Rab7 am späten Endosom lokalisiert (Chavrier et al. 1990). Rab-GTPasen aktivieren eine Reihe von Effektoren (z.B. Tether), die schließlich zur Aktivierung von SNAREs führen (Barr und Lambright 2010). Die SNARE-Komplexe sind für das Andocken der Vesikel an die Zielmembran und die Vesikelfusion verantwortlich (Weber et al. 1998).

Das v-SNARE auf der vesikulären Membran und die t-SNAREs bilden ein Bündel von vier parallel angeordneten  $\alpha$ -Helices, wodurch die Membranen in unmittelbare Nähe geraten und miteinander verschmelzen. Sowohl die Bildung des 4-Helix-Bündels als auch das Lösen des SNARE-Komplexes durch NSF ("ATPase N-Ethylmaleimid sensitives Fusionsprotein") sind ATP abhängig und wird durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert. Die beschränkten Kombinationsmöglichkeiten von v- und t-SNAREs und die regulierenden Faktoren tragen zur Spezifität der Vesikelfusion bei (Hong und Lev 2014).

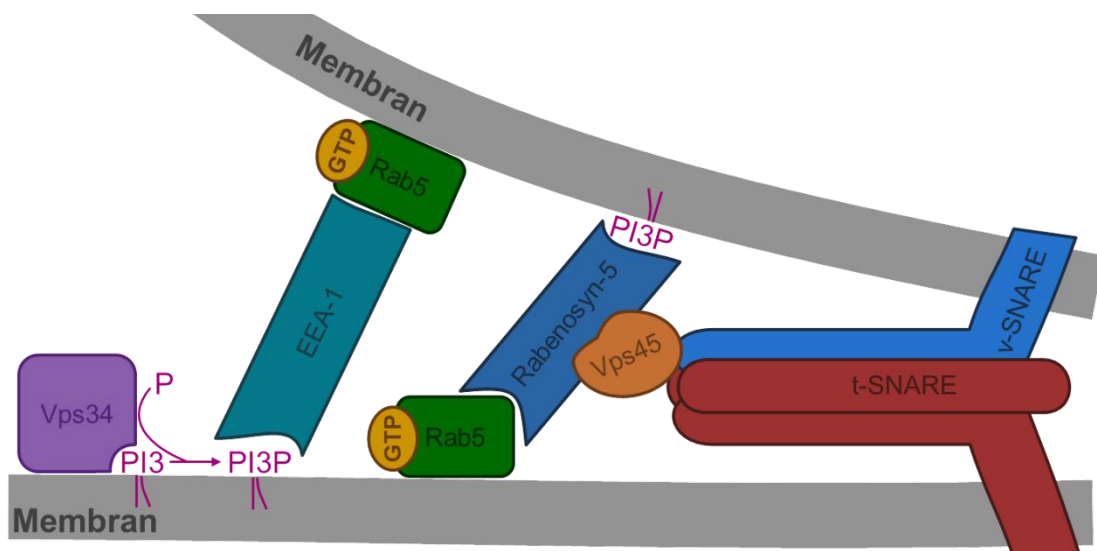
### **1.1.1 Regulation der Fusion des frühen Endosoms**

Rab5 ist ein Schlüsselprotein für die Regulation der homotypischen Fusion früher Endosomen oder der Fusion früher Endosomen mit Phagosomen oder mit von der Zellmembran stammenden Clathrin beschichteten Vesikeln (Gorvel et al. 1991; Duclos et al. 2000; Rubino et al. 2000; Zeigerer et al. 2012). Sowohl die Bindung von Rab5 an die frühendosomale Membran, als auch die Aktivität von Rab5 sind GTP abhängig. Der GDP / GTP Austausch erfolgt durch Rabex-5 und wird durch Rabaptin-5 gesteigert (Ullrich et al. 1994; Stenmark et al. 1995; Horiuchi et al. 1997; Sato et al.



2005). Rabex-5 und Rabaptin-5 bilden einen Komplex, welcher durch aktiviertes Rab5 über Rabaptin-5 zur frühendosomal Membran rekrutiert werden kann. Dadurch entsteht ein positiver Feedback-Loop, der für die homotypische Fusion früher Endosomen nötig ist (Horiuchi et al. 1997; Lippé et al. 2001).

Neben aktivem Rab5, sind das Lipid Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) und der Rab5 Effektor EEA1 ("Early Endosomal Antigen 1") entscheidend für die Einleitung der Vesikelfusion (Ohya et al. 2009). EEA1 ist ein dimeres Doppelwendel-Protein mit N-terminal gelegener Rab5 Bindedomäne und C-terminal gelegener FYVE-Domäne (Simonsen et al. 1998; Mishra et al. 2010). Die FYVE-Domäne (Fab1p, YOTB, Vac1p und EEA1; benannt nach den ersten vier Proteinen, in denen sie entdeckt wurde) bindet PI3P (Stenmark et al. 1996; Gillooly et al. 2001). Durch die Bindung von Rab5 und PI3P auf benachbarten endosomal Vesikeln kann EEA1 als Tether wirken und die Annäherung beider Membranen vermitteln (Rubino et al. 2000; Dumas et al. 2001). Außerdem fördert Rab5 die Rekrutierung der PI3-Kinase Vps34, welche PI3P an der frühendosomal Membran bildet (Schu et al. 1993; Christoforidis et al. 1999; Murray et al. 2002; Shin et al. 2005).



**Abb. 1: Regulation der Fusion am frühen Endosom:** GTP bindendes Rab5 (grün) rekrutiert Rab5-Effektoren wie EEA1 (türkis) und den Rabenosyn-5 / Vps45 Komplex (dunkelblau / orange). Diese binden sowohl Rab5, als auch das Lipid Phosphatidylinositol-3-Phosphat an der frühendosomal Membran und wirken dadurch als Tether. Phosphatidylinositol-3-Phosphat (pink) wird beispielsweise durch die PI3-Kinase Vps34 (violett) gebildet. Vps45 interagiert direkt mit SNARE-Proteinen. Der SNARE-Komplex setzt sich aus t-SNARE (rot) auf der Ziellmembran und v-SNARE (blau) auf der Vesikelmembran zusammen, die miteinander interagieren. Durch die Bildung eines  $\alpha$ -Helix-Bündels, werden die Membranen in unmittelbare Nähe zueinander gezogen.

Der Tether Rabenosyn-5 besitzt wie EEA1 eine Rab5-Bindedomäne und eine FYVE-Domäne und bildet einen stabilen Komplex mit dem SM ("Sec1/Munc18") Protein Vps45 (Nielsen et al. 2000; Eathiraj et al. 2005; Rahajeng et al. 2010). Dieses interagiert direkt mit SNAREs (Carpp et al. 2006; Shen et al. 2007; siehe auch Abb. 1). Der Rabenosyn-5 / Vps45 Komplex spielt eine Rolle bei der homotypischen Fusion von frühen Endosomen und der Fusion von frühen Endosomen mit Transportvesikeln (Nielsen et al. 2000; Gengyo-Ando et al. 2007; Rahajeng et al. 2010; Navaroli et al. 2012). Dabei sind die Funktionen von Rabenosyn-5 und EEA1 nicht vollständig redundant (Nielsen et al. 2000).

### 1.1.2 multivesikuläre Endosomen

Während der endosomalen Reifung entstehen durch die Abschnürung intraluminaler Vesikel multivesikuläre Body's ("multivesicular body", MVB). Diese können mit Lysosomen verschmelzen, sodass es zum lysosomalen Abbau der intraluminalen Vesikel ("intraluminal vesicle", ILV) kommt. Durch die Fusion von MBVs mit der Plasmamembran können ILVs als Exosomen freigesetzt werden, oder ihr Inhalt kann durch Rückfusion mit der limitierenden Membran der MVBs wieder dem endosomalen System zur Verfügung gestellt werden (Henne et al. 2011).

Die ESCRT ("endosomal sorting complexes required for transport") Maschinerie bildet den am besten erforschten Mechanismus zur Sortierung in intraluminalen Vesikel und besteht aus den fünf Komplexen ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III und Vps4, die enger miteinander interagieren (Katzmann et al. 2003; Teo et al. 2006; Gill et al. 2007; Shields et al. 2009).

Hrs ist eine Untereinheit des ESCRT-0 Komplexes und spielt eine wichtige Rolle für die Rekrutierung der ESCRT Maschinerie. Es bindet die endosomale Membran über eine FYVE-Domäne und interagiert mittels Ubiquitin-Bindedomänen mit monoubiquitylierten Proteinen und ESCRT-I (Raiborg et al. 2001; Shih et al. 2002; Katzmann et al. 2003; Bache et al. 2003). Auch die Untereinheiten von ESCRT-I und II, beispielsweise die ESCRT-I Untereinheit Tsg101, besitzen Ubiquitin-Bindedomänen, die der Erkennung und Sortierung monoubiquitylierter Proteine dienen (Katzmann et al. 2001; Sundquist et al. 2004; Alam et al. 2006). ESCRT-I und II bewirken eine Krümmung der Membranbereiche, zu denen die ubiquitylierten Proteine rekrutiert werden (Wollert und Hurley 2010).

Abschnürung der intraluminalen Vesikel erfolgt durch die spiralförmige Oligomerisierung von Snf7 am "Vesikelhals", durch die es zu einer trichterförmigen

Einstülpung der Membran kommt. Snf7 ist der Hauptbestandteil des ESCRT-III Komplexes, die weiteren Untereinheiten regulieren die Oligomerisierung von Snf7 und beeinflussen die Krümmung der Spirale (Teis et al. 2008; Henne et al. 2012; Buchkovich et al. 2013). Die AAA-ATPase Vps4 ist für den Abbau des ESCRT-III Komplexes in seine Untereinheiten verantwortlich und führt zur endgültigen Abschnürung des intraluminalen Vesikels (Babst et al. 1998; Shim et al. 2008; Lata et al. 2008; Adell et al. 2014).

Ein wichtiger Faktor für die Bildung von ILVs ist die Entstehung von "Lipidflößen" welche reich an Cholesterol, Ceramiden und den Phospholipiden Lysobisphosphatidsäure (LBPA) / Bis(monoacylglycero)phosphat sind (Kobayashi et al. 1998; Kobayashi et al. 2002; Möbius et al. 2003). Die Bildung intraluminale Vesikel kann ESCRT unabhängig durch die Zusammensetzung dieser "Lipidflöße" (Matsuo et al. 2004; Trajkovic et al. 2008) oder durch die Bildung Tetraspanin-reicher Mikrodomänen erfolgen (van Niel et al. 2011; Perez-Hernandez et al. 2013). ILVs unterschiedlicher Biogenese und verschiedener Zusammensetzung existieren dabei innerhalb desselben multivesikulären Bodys (Edgar et al. 2014).

### 1.1.3 Exosomen

Multivesikuläre Bodys können mit der Plasmamembran verschmelzen und Intraluminale Vesikel als Exosomen in den Extrazellulärraum abgeben (Harding et al. 1983; Pan et al. 1985; Johnstone et al. 1987). Exosomen lassen sich aufgrund ihrer Größe (40 - 100 nm) und Biogenese von Mikrovesikeln (50 nm - 1 µm) und apoptotischen Bodys unterscheiden. Sie werden über Blut und andere Körperflüssigkeiten transportiert und können eine Vielzahl von Prozessen beeinflussen, beispielsweise die Immunantwort, die Tumorentwicklung oder virale Infektionen (Bobrie et al. 2011). Neben Proteinen des endosomalen Weges (z.B. CD63 oder Komponenten der ESCRT-Maschinerie) enthalten sie auch eine Reihe von Transport- und Signalproteinen (beispielsweise MHC I und MHC II) und RNAs (Théry et al. 2001; Wubbolts et al. 2003; Valadi et al. 2007; Pegtel et al. 2010).

Die Exosomen Antigen präsentierender Zellen enthalten Peptid beladenes MHC II (pMHC II) und können T-Zellen Antigen-spezifisch aktivieren (Raposo et al. 1996; Muntasell et al. 2007; Nolte-'t Hoen et al. 2009) oder die Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen steigern (Théry et al. 2002; Segura et al. 2007; Muntasell et al. 2007). MHC II-haltige Exosomen können aber auch eine supprimierende Wirkung

auf CD4+ T-Zellen haben oder Toleranz induzieren (Östman et al. 2005; Almqvist et al. 2008; Bakela et al. 2015).

Auch für virale Infektionen (z.B. HIV, HSV, EBV) spielen Exosomen eine wichtige Rolle (Pegtel et al. 2010; Lenassi et al. 2010). HSV-1 Viren benötigen für ihre korrekte Behüllung und Freisetzung Komponenten der ESCRT-Maschinerie und des Exosomensekretionsweges (Calistri et al. 2007; Pawliczek und Crump 2009; Bello-Morales et al. 2012). Die Tatsache, dass Exosomen und Viruspartikel die gleiche Größe haben und einige Viren die Exosomenbiogenesewege der Zelle verwenden, führte zur "trojanischen Exosomen-Hypothese" als möglicher viraler Evasionsstrategie. Diese besagt, dass Viren durch die Verwendung der zellulären Exosomenbiogenesewege zelluläre Exosomenmarker tragen, während Exosomen virale Proteine enthalten, sodass die Erkennung der Viruspartikel durch das Immunsystem erschwert wird (Gould et al. 2003). Zusätzlich zu infektiösen Viruspartikeln werden während einer HSV-Infektion große Mengen nicht-infektiöser, sogenannter L-Partikel ("light particles") freigesetzt, die Tegument und Glykoproteine enthalten, jedoch kein virales Kapsid (Loret et al. 2008). Diese können beispielsweise von nicht infizierten Zellen aufgenommen werden und durch die Verbreitung viraler Proteine und RNAs die Infektion nicht infizierter Zellen erleichtern (McLauchlan et al. 1992; Dargan und Subak-Sharpe 1997).

## 1.2 Der Haupthistokompatibilitätskomplex

Der T-Zellrezeptor erkennt Peptide, die durch Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes ("Major Histocompatibility Complex", MHC) auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Der *Haupthistokompatibilitätskomplex* liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 und codiert für viele Proteine deren Funktionen mit dem Immunsystem assoziiert sind. Das *HLA Klasse I* ("human leucocyte antigen") Gencluster codiert für die Gene *HLA-A*, *HLA-B* und *HLA-C* und das *HLA Klasse II* Cluster für die Gene *HLA-DP*, *HLA-DQ* und *HLA-DR*, die hoch polymorph sind (Ausnahme ist *HLA-DR $\alpha$* ). Zusätzlich dazu enthält der *HLA Klasse II* Cluster die beiden, nicht polymorphen Gene *HLA-DM* und *HLA-DO*, welche für Proteine codieren, die die Peptidbeladung von *HLA-DR*, *HLA-DP* und *HLA-DQ* beeinflussen (The MHC sequencing consortium 1999).

### 1.2.1 Aufbau des MHC Klasse II / Invariante Kette Oligomers

MHC Klasse II Proteine werden in Antigen präsentierenden Zellen ("antigen presenting cell", APC) wie beispielsweise dendritischen Zellen, B-Zellen oder Makrophagen exprimiert. Darüber hinaus ist die Expression in einer Reihe von Geweben durch INF $\gamma$  induzierbar (Pober et al. 1983; Boehm et al. 1997). MHC Klasse II Proteine sind Heterodimere, die sich aus einer  $\alpha$ -Kette (35 kDa) und einer  $\beta$ -Kette (28 kDa) zusammensetzen (Kaufman et al. 1984). Beide Ketten sind Typ I Membranproteine mit zwei extrazellulären Domänen ( $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  bzw.  $\beta 1$  und  $\beta 2$ ) und einem kurzen zytoplasmatischen Rest. Die ersten extrazellulären Domänen beider Ketten ( $\alpha 1$  und  $\beta 1$ ) bilden die Peptidbindungsgrube, die aus zwei  $\alpha$ -Helices und acht  $\beta$ -Faltblättern besteht (Brown et al. 1993; Ghosh et al. 1995). Sie enthält Taschen in denen Aminosäureseitenketten des in der Grube verankerten Peptids binden können und ist an den Enden offen, was die Bindung von Peptiden unterschiedlicher Länge ermöglicht (Rudensky et al. 1991; Hunt et al. 1992; Chicz et al. 1992).

Bei der Synthese im endoplasmatischen Retikulum assoziieren MHC II  $\alpha$ - und  $\beta$ -Dimere mit trimerisierter Invarianter Kette zu einem stabilen Oligomer (Roche et al. 1991; Anderson und Miller 1992; Bijlmakers et al. 1994a; Koch et al. 2011). Ii ist ein trimeres, nicht polymorphes Typ II Membranprotein, welches in vier Isoformen vorkommt (Singer et al. 1984; Strubin et al. 1986; Marks et al. 1990). Der luminale Teil von Ii untergliedert sich in eine C-terminal gelegene Trimerisierungsdomäne und eine membran-nahe Domäne deren CLIP-Sequenzbereich ("Class II-Associated Invariant Chain Peptid"), sich in die Peptidbindungsgrube von MHC II lagert (Claesson et al. 1983; Riberdy et al. 1992; Freiswinkel et al. 1993; Bijlmakers et al. 1994b). Zusätzliche Interaktionen mit MHC II finden über die Prolin-reiche Sequenz, der membran-nahen Domäne und über die Transmembrandomäne statt (Stumptner und Bénaroch 1997; Castellino et al. 2001; Neumann und Koch 2006). Der kurze zytoplasmatische Teil von Ii trägt zwei endosomale Sortierungssignale, die Isoformen und p33 und p43 besitzen zusätzlich ein ER-Retentionssignal (Strubin et al. 1986; Lotteau et al. 1990; Bakke und Dobberstein 1990). Die Invariante Kette wirkt als Chaperone für MHC II (Roche und Cresswell 1990; Roche et al. 1991; Riberdy et al. 1992) und vermittelt den Transport des Komplexes. Neben Ii scheinen auch ER-Chaperone wie Calnexin und BIP eine Rolle bei der Faltung und Zusammensetzung des MHC Klasse II Dimers zu spielen (Bonnerot et al. 1994; Anderson und Cresswell 1994).

### 1.2.2 MHC Klasse II Prozessierung

Der Transport des MHC II / Ii - Komplexes vom Trans-Golgi-Netzwerk über das frühe Endosom zum spezialisierten MHC Klasse II Kompartiment ("MHC class II compartment"; MIIC) wird durch endosomale Sortierungssignale im zytoplasmatischen Teil der Invarianten Kette reguliert und erfolgt entweder direkt oder indirekt über die Plasmamembran (Bakke und Dobberstein 1990; Arneson und Miller 1995; Warmerdam et al. 1996; Brachet et al. 1999). Die Clathrin und AP-2 abhängige Endozytose des MHC II / Ii - Komplexes von der Zelloberfläche wird durch Di-Leucin Motive der Invarianten Kette vermittelt, ist aber nicht zwingend erforderlich damit es zum Transport ins MIIC kommt (Rodionov und Bakke 1998; Liu et al. 1998; McCormick et al. 2005).

Das MIIC ist ein prälysosomales Kompartiment in dem Proteine des MHC II Prozessierungsweges akkumulieren (Sanderson et al. 1994; Pierre et al. 1996; Stang et al. 1998). In diesem spätendosomalen Kompartiment kommt es zum Abbau der Invarianten Kette durch Cathepsin S und Cathepsin L, bis nur noch das CLIP-Fragment an die Peptidbindegrube von MHC II gebunden ist. (Castellino und Germain 1995; Riese et al. 1996; Nakagawa et al. 1998).

Das nicht polymorphe HLA-DM ist essentiell für die Peptidbeladung von MHC II (Kelly et al. 1991; Morris et al. 1994; Fling et al. 1994; Denzin et al. 1994). HLA-DM katalysiert sowohl die Freisetzung des CLIP Fragments (Sanderson et al. 1994; Sherman et al. 1995; Denzin und Cresswell 1995), als auch die Bindung höher affiner Peptide (Sloan et al. 1995; Weber et al. 1996; Kropshofer et al. 1996). DM interagiert mit MHC II und führt zu Konformationsänderungen in der Peptidbindungsgrube von MHC II, die zur Dissoziation des Peptids führen (Pashine et al. 2003; Ferrante et al. 2008; Anders et al. 2011; Pos et al. 2012). Außerdem wirkt DM als Chaperon für die nicht-beladene Zwischenform von MHC II (Denzin et al. 1996; Kropshofer et al. 1997). Ein negativer Regulator des MHC Klasse II Prozessierungsweges ist das MHC II Strukturanaloga HLA-DO. Es bindet bereits im ER nahezu irreversibel an HLA-DM, wobei es die Bindung an MHC II imitiert und verhindert so die Interaktion von HLA-DM mit MHC II (Liljedahl et al. 1996; Denzin et al. 1997; Guce et al. 2013). In aktivierten APCs wird die Expression von HLA-DO stark herunterreguliert, sodass HLA-DM die Bindung von hoch-affinen Peptiden an MHC II vermitteln kann (Karlsson et al. 1991; Glazier et al. 2002; Hornell et al. 2006).

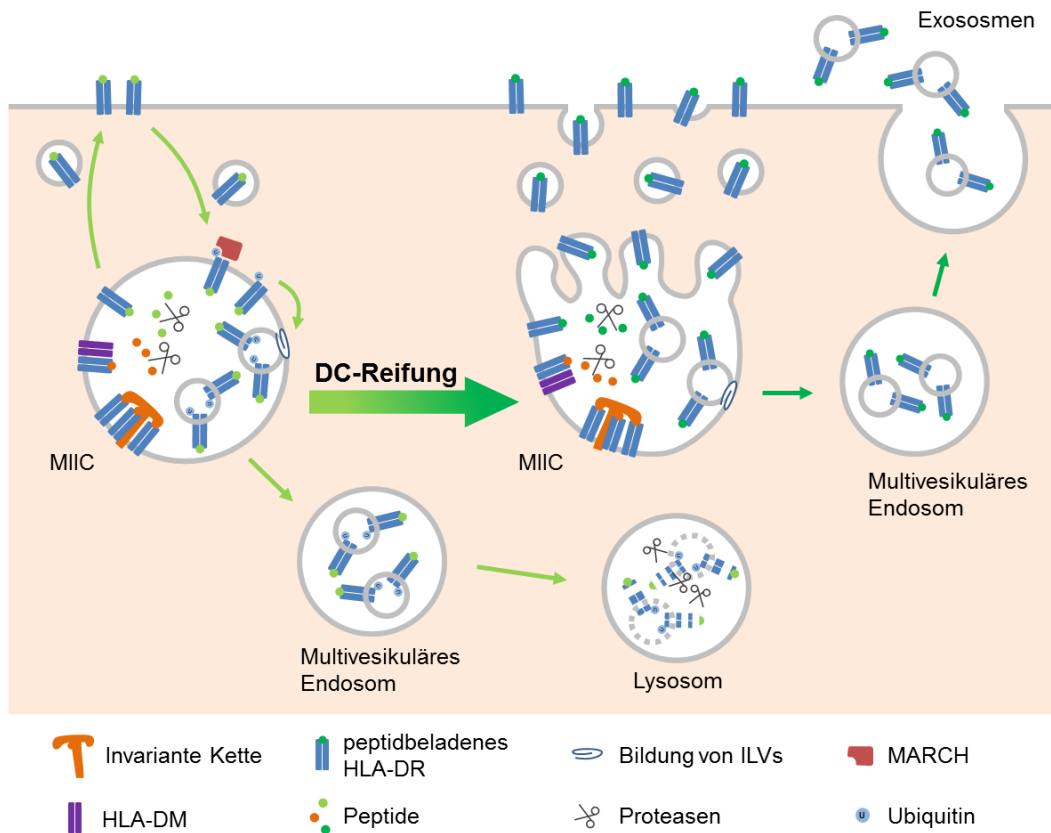
### 1.2.3 Transport Peptid beladener MHC II-Moleküle

Die Regulation der Oberflächenexpression von Peptid beladenem MHC II erfolgt unabhängig von I $\alpha$  und verändert sich während der DC Reifung gravierend (Villadangos et al. 2001). In unreifen dendritischen Zellen ("dendritic cell", DC) werden die zytoplasmatischen Reste von peptidbeladenem MHC II durch die E3 Ligasen MARCH 1 und MARCH 8 ubiquitinyliert, wobei die  $\beta$ -Kette das dominantere Substrat ist (Shin et al. 2006; Lapaque et al. 2009). Nach Clatrin unabhängiger Endozytose erfolgt die Ubiquitinylierung von pMHC II durch MARCH I im frühen Endosom (Furuta et al. 2013). Die Ubiquitinylierung an Lysin 225 der  $\beta$ -Kette führt zur Sortierung von pMHCII in die Intraluminalen Vesikel multivesikulärer Bodys und zur lysosomalen Degradation (van Niel et al. 2006; Buschow et al. 2009; Walseng et al. 2010).

Der Mechanismus mit dem MHC II in intraluminale Vesikel transportiert wird, wird diskutiert. Es gibt sowohl Hinweise auf eine Beteiligung der ESCRT-Maschinerie (van Niel et al. 2008; Colombo et al. 2013), als auch auf die Beteiligung des Tetraspanins CD63 (Petersen et al. 2011). Multivesikuläre Bodys, die dem Abbau von MHC II und solche, die der Freisetzung von MHC II via Exosomen dienen, besitzen unterschiedliche Marker (Buschow et al. 2009; van den Hoorn et al. 2012).

Die Peptidbeladung von MHC II durch HLA-DM findet auf der limitierenden Membran multivesikulärer Bodys statt (Kleijmeer et al. 2001; ten Broeke et al. 2011; Bosch et al. 2013). Während sich in unreifen DCs der Hauptteil der MHC II Moleküle in endosomalen Kompartimenten befindet, steigt während der Reifung die Peptidbeladung und Oberflächenexpression von MHC II an (Pierre et al. 1997; Barois et al. 2002). Aus den sphärischen oder länglichen MIIC-Kompartimenten bilden sich riesige tubuläre MIIC-Netzwerke und Peptid beladene MHC II Moleküle werden durch MHC II Vesikel auf die Zelloberfläche transportiert (Kleijmeer et al. 2001; Barois et al. 2002; van Nispen tot Pannerden et al. 2010; siehe Abb. 2).

In reifen DCs ist die MARCH 1 Expression herunterreguliert (de Gassart et al. 2008) und Peptid beladenes MHC II wird unabhängig von einer Ubiquitinylierung in MBVs transportiert und über Exosomen abgegeben. Diese Exosomen werden von T-Zellen aufgenommen und verstärken ihre Aktivierung (Nolte-'t Hoen et al. 2009; Buschow et al. 2009) Auch reife B-Zellen sekretieren peptidbeladenes MHC II via Exosomen, wodurch die Proliferation und Zytokinproduktion geprimter T-Zellen induziert wird (Raposo et al. 1996; Muntasell et al. 2007).



**Abb 2: Transport Peptid beladener MHC II-Moleküle:** Im MIIC wird die Invariante Kette abgebaut und HLA-DR mit Peptiden beladen, wobei HLA-DM als Chaperone wirkt. In unreifen dendritischen Zellen ("DC") wird auf der Oberfläche exprimiertes Peptid beladenes HLA-DR schnell endozytiert und durch MARCH 1 und 8 ubiquitinyliert. Die Ubiquitinylierung führt zur Sortierung von HLA-DR in intraluminale Vesikel ("ILVs") und zum lysosomalen Abbau (hellgrüne Pfeile). Während der Reifung dendritischer Zellen, bilden sich tubuläre MIIC-Netzwerke und peptidbeladenes HLA-DR wird massiv zur Oberfläche transportiert. Gleichzeitig erfolgt eine Ubiquitin unabhängige Sortierung von HLA-DR in ILVs und die Freisetzung dieser Vesikel als Exosomen (dunkelgrüne Pfeile).

## 1.3 Herpes Simplex Viren

Die Familie der Herpesviridae besteht aus behüllten DNA-Viren und gliedert sich in vier Subfamilien ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  Herpesviridae) mit insgesamt 8 humanpathogenen Varianten. Die Primärinfektion erfolgt häufig in früher Kindheit und mehr als 70% der Erwachsenen sind HSV-1 infiziert (Arduino und Porter 2008). Nach der Primärinfektion kommt es zu einer lebenslangen Latenz im Rahmen derer es immer wieder zu einer Reaktivierung des Virus kommt. Diese verläuft meist asymptomatisch oder geht mit der Bildung von Lippenbläschen einher. Allerdings kann es auch zu einer Infektion im Auge kommen, die zu Keratitis und im schlimmsten Fall zu Blindheit



führt oder in Einzelfällen zu Enzephalitis oder Meningitis. Obwohl HSV-2 eher genital lokalisiert ist, sind die meisten genitalen Herpeserkrankungen ebenfalls durch HSV-1 ausgelöst (Arduino und Porter 2008).

Das Herpesvirus besteht aus einem ikosaedrischen Nukleocapsid, das die doppelsträngige, lineare, ca. 152 kbp lange DNA umschließt und von einer Lipidhülle mit etwa 15 viralen Glykoproteinen umhüllt wird. Dazwischen befindet sich das Tegument, welches aus dicht gepackten viralen Proteinen besteht (Grünwald et al. 2003).

Der Vermehrungszyklus von HSV-1 beginnt mit einer initialen lytischen Phase, die in eine latente Phase mit gelegentlichen lytischen Ausbrüchen übergeht. Nach der Fusion mit der Wirtszelle gelangt das Virus mittels Interaktion von Tegumentproteinen mit dem Mikrotubuli-Transportsystem zum Zellkern, wo die virale DNA in den Kern transportiert und dort repliziert wird (Radtke et al. 2010). Kapsidproteine und eine Reihe anderer viraler Proteine werden nach ihrer Synthese im Zytoplasma ebenfalls in den Kern transportiert. Dort wird die virale DNA in ein Kapsid verpackt, welches an der inneren Kernmembran behüllt wird. Durch Fusion mit der äußeren Kernmembran wird das Kapsid ins Zytosol freigesetzt. Am Trans-Golgi-Netzwerk oder am Endosom kommt es dann zur Bildung der finalen Hülle um Kapsid und Tegumentproteine (Mettenleiter et al. 2006; Johnson und Baines 2011).

### **1.3.1 Fusion der Virushülle mit der Zielzelle**

HSV-1 kann Lymphozyten, Epithelzellen, Fibroblasten oder Neuronen infizieren, wobei der Eintritt je nach Zelltyp über die Plasmamembran oder den endosomalen Weg erfolgen kann. Während bei den meisten Viren der Eintritt in die Wirtszelle mit Hilfe eines einzelnen Fusionsproteins erfolgt, greifen Herpesviren auf eine ganze Maschinerie zurück. Die eng miteinander interagierenden viralen Glykoproteine B (gB), D (gD) und das Heterodimer der Glykoproteine H und L (gH / gL) sind für den Eintritt in die Zelle essentiell (Avitabile et al. 2007; Avitabile et al. 2009; Cairns et al. 2011). Die Bindung von HSV-1 an die Plasmamembran wird hauptsächlich über gD vermittelt, welches verschiedene zelluläre Rezeptoren wie HVEM ("Herpesvirus Entry mediator", ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie), die Zelladhäsionsproteine Nectin 1 und Nectin 2 und Heparansulfat-Reste bindet (Montgomery et al. 1996; Cocchi et al. 1998; Geraghty et al. 1998; Shukla et al. 1999). Das Glykoprotein B kann mit dem PILR $\alpha$  Rezeptor interagieren (Sato et al. 2008; Wang et al. 2009) und gB sowie das

nicht essentielle Glykoprotein C (gC) können über die Bindung von Heparansulfat-Resten eine erste Interaktion mit der Wirtszelle bewirken (Herold et al. 1991).

Die Aktivierung von gD durch Rezeptorbindung triggert eine Konformationsänderung des gH / gL Komplexes, die dann die fusiogene Aktivität von gB begünstigt (Atanasiu et al. 2010). Beim Eintritt des Virus über den endosomalen Weg kommt es aufgrund des niedrigen pHs zu starken Konformationsänderungen von gH / gL und gB (Dollery et al. 2010; Cairns et al. 2011), wobei die Konformationsänderungen im Fusionsloop 2 von gB zum Annehmen einer fusionsaktiveren Form führen (Stampfer et al. 2010; Muggeridge 2012).

### 1.3.2 Das HSV-1 Glykoprotein B

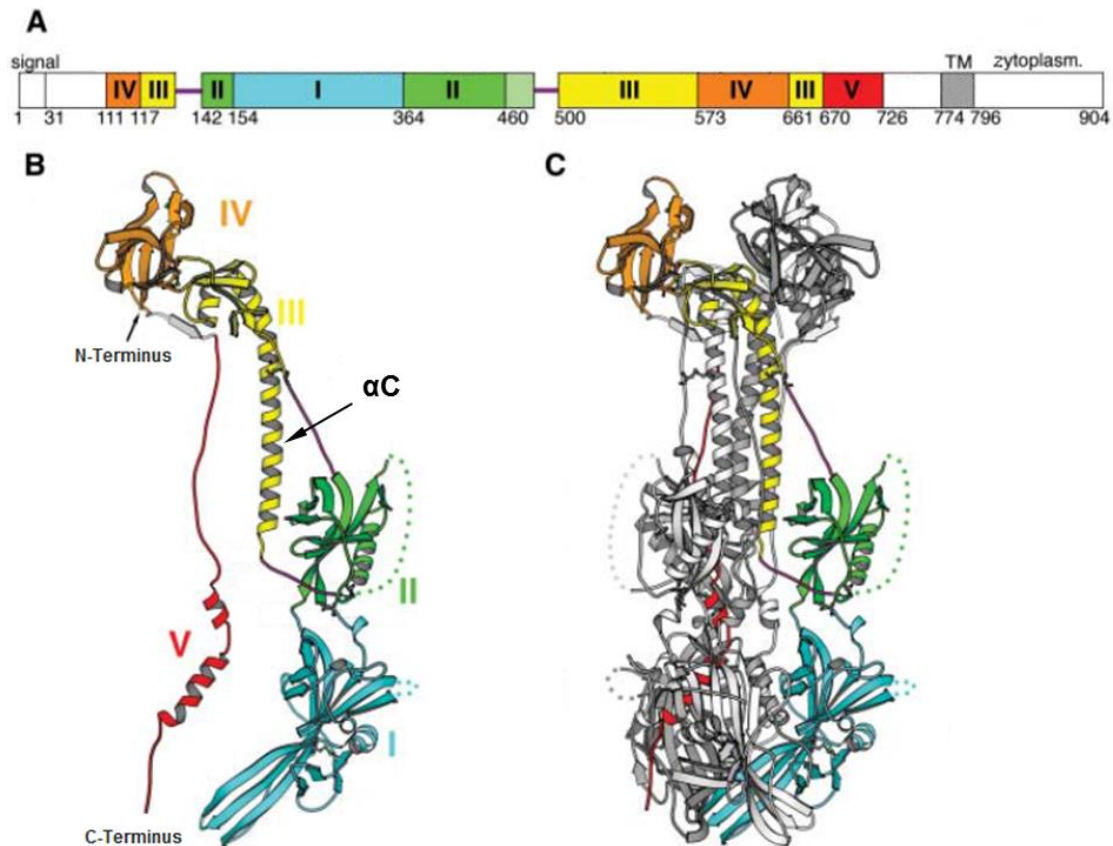
Das Glykoprotein B ist ein trimeres Klasse I Membranprotein mit einer großen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Domäne mit mehreren Signalsequenzen. Die Struktur der gB Orthologe ist innerhalb der Herpesviren stark konserviert, wobei ein Großteil der Variationen innerhalb der ersten 80 Aminosäuren liegt (Heldwein et al. 2006; Backovic et al. 2009; Sharma et al. 2013).

Der luminal Bereich besteht aus fünf Domänen, enthält intramolekulare Disulfidbrücken und wird N- und O-glykosyliert (Heldwein et al. 2006; Wang et al. 2009). Die Trimerisierung erfolgt über multiple Kontakte zwischen den einzelnen Protomeren, hauptsächlich in den Domänen III und V (Heldwein et al. 2006). Lange  $\alpha$ -Helices bilden zusammen mit dazu antiparalell angeordneten C-terminalen Armen den Kern des Proteins. Mutationen in diesem Bereich behindern die korrekte Faltung und Oberflächenexpression von gB und hemmen Viruseintritt und Zell-Zell-Fusion (Heldwein et al. 2006; Connolly und Longnecker 2012).

Das Glykoprotein gB gehört zu den Klasse III Fusionsproteinen (Heldwein et al. 2006), wobei die beiden Loops in Domäne I die Fusion von Liposomen *in vitro* bewirken (Hannah et al. 2007; Falanga et al. 2012). Da die Postfusion-Form sehr stabil ist, gibt es keine Kristallstrukturen der Präfusionsform. Experimentelle Ergebnisse unterstützen ein Modell, wonach die  $\alpha$ C-Helix in Domäne III in der Präfusionskonformation destabilisiert und in 2 kürzere Helices geteilt ist (Backovic et al. 2009; Vitu et al. 2013; Cantisani et al. 2013; Gallagher et al. 2014) (siehe auch Abb. 3). Die membran-nahe Region ist stark hydrophob, liegt in der Präfusionsform in unmittelbarer Nähe zu den Fusionsloops und maskiert diese möglicherweise (Shelly et al. 2012; Maurer et al. 2013).

Neben seiner Funktion als Fusionsprotein beim Viruseintritt, kann gB mit dem PILR $\alpha$  Rezeptor und Heparansulphat-Resten auf der Wirtszellmembran interagieren (Herold et al. 1991; Satoh et al. 2008). Beim Virusaustritt hat gB eine mit anderen viralen Proteinen redundante Funktion bei der Freisetzung des Kapsids an der äußeren Kernmembran (Farnsworth et al. 2007; Wisner et al. 2009; Sagou et al. 2010) und der zweiten Behüllung (Johnson et al. 2011). Bei der Bildung von Synzytien durch HSV-1, bei der die vier Glykoproteine des Viruseintritts (gD,gB,gH/gL) und zusätzlich die Proteine gE, gI, gM, und UL45 benötigt werden, wirkt gB ebenfalls als Fusiogen (Davis-Poynter et al. 1994; Haanes et al. 1994).

Der zytoplasmatische Teil von gB spielt eine Rolle für den intrazellulären Transport (Heineman et al. 2004; Beitia Ortiz de Zarate et al. 2004; Beitia Ortiz de Zarate et al. 2007) und die fusiogene Aktivität von gB (Fan et al. 2002; Avitabile et al. 2004; Silverman et al. 2012). Zum Aufbau der zytoplasmatischen Domäne gibt es keine Kristallstruktur, jedoch wurde anhand der Sequenz die Existenz von drei  $\alpha$ -Helices vorhergesagt (Ruel et al. 2006; Chowdary und Heldwein 2010). Der zytoplasmatische Teil von gB enthält zwei Tyrosin-basierte Motive (<sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup> und <sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup>) und ein Di-Leucin Motiv (<sup>871</sup>LL<sup>872</sup>) (Beitia Ortiz de Zarate et al. 2004). Das N-terminaler gelegene Tyrosin-basierte Motiv (<sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup>), wurde als Internalisierungssignal beschrieben (Fan et al. 2002; Beitia Ortiz de Zarate et al. 2004). Außerdem spielen <sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup> und <sup>871</sup>LL<sup>872</sup> Motiv möglicherweise eine Rolle beim Transport von gB zum Trans-Golgi-Netzwerk nach Internalisierung (Beitia Ortiz de Zarate et al. 2004). Gleichzeitig führen Deletionen und Mutationen im Bereich um das Di-Leucin Motiv häufig zu einer verstärkten Synzytienbildung während der Virusinfektion (Baghian et al. 1993; Fan et al. 2002; Favoreel et al. 2002), wobei dieser Effekt unabhängig von der erhöhten Oberflächenexpression bei einem Verlust des Tyrosin-basierten Motivs ist (Fan et al. 2002). Das <sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup> Motiv kann in Verbindung mit dem nahen <sup>857</sup>ERTE<sup>860</sup> Motiv als ER- Exportsignal wirken (Heineman et al. 2004). Nach einer Deletion des <sup>857</sup>ERTE<sup>860</sup> Motivs wurde keine Funktion für das <sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup> Motiv gefunden (Beitia Ortiz de Zarate et al. 2004).



**Abb 3. Aufbau und Kristallstruktur des Glykoprotein B.** Die Domänen des luminalen Teils wurden farblich gekennzeichnet: Domäne I (türkis), Domäne II (grün), Domäne III (gelb), Domäne IV (orange), Domäne V (rot) (A) Die Sequenz von gB wurde schematisch dargestellt und Domänen des luminalen Teils farblich hervorgehoben. Signalpeptid ("signal"), Transmembrandomäne ("TM") und zytoplasmatische Domäne ("zytoplasm.") sind entsprechend gekennzeichnet. (B) und (C): Die Kristallstruktur umfasst die Ektodomäne von gB bis auf die membran-nahe Region. Die einzelnen Domänen innerhalb des gB-Protomers (B) und des gB-Trimers (C) wurden farblich hervorgehoben. Unstrukturierte Bereiche wurden als gepunktete Linien dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert nach *Heldwein et al. 2006* dargestellt. (Mit freundlicher Genehmigung der Zeitschrift *Science AAAS: "Crystal Structure of Glycoprotein B from Herpes Simplex Virus 1"*, von E. E. Heldwein, 2006.)

### 1.3.3 Immunantwort gegen Herpesvirusinfektionen

Angeborenes und adaptives Immunsystem arbeiten bei der Bekämpfung einer HSV-1 Infektion eng zusammen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen spielen als Hauptproduzenten antiviraler Zytokine (z.B. INF $\gamma$  und TNF $\alpha$ ) eine wichtige Rolle beim Eindämmen der viralen Infektion (Manickan und Rouse 1995). Durch die Produktion von INF $\gamma$  wird die Expression von MHC II gesteigert und die Hemmung der MHC I Expression durch HSV-1 überwunden (Mikloska und Cunningham 1998). INF $\gamma$  induziert die MHC II Expression in Keratinozyten, welche während der lytischen Phase durch HSV-1 infiziert werden (Cunningham et al. 1985). Die MHC II Präsentation wiederum dient

der Erkennung von infizierten Zellen durch zytotoxische CD4+ Zellen, welche in infizierten Zellen direkt den Zelltod einleiten können (Yasukawa und Zarling 1984; Schmid 1988; Koelle et al. 1998). B-Zellen setzen neutralisierende Antikörper frei und wirken als Antigen präsentierende Zellen für CD4+ T-Zellen (Deshpande et al. 2000). Während Die NK-Zell- und CD4+ T-Zellantwort während der gesamten Infektion mit HSV-1 stark ist, ist die CD8+ Zell-Antwort in frühen Stadien der Infektion schwächer (Koelle et al. 1998) und die Aktivierung CD8+ zytotoxischer-Zellen von der Hilfe von CD4+ T-Zellen abhängig (Smith et al. 2004; Nakanishi et al. 2009). Natürliche Killerzellen und CD8+ T-Zellen und leiten den Zelltod infizierter Zellen ein (Grubor-Bauk et al. 2008). Darüber hinaus können CD8+ Zellen die Reaktivierung von latentem HSV-1 unterbinden (Liu et al. 2000; Knickelbein et al. 2008).

#### **1.3.4 Immunevasionsstrategien von Herpes Simplex Viren**

Der wichtigste Mechanismus, mit dem HSV-1 eine Elimination aus dem Wirtskörper verhindert, ist die Latenz. In diesem Zustand beschränkt sich die virale Genexpression größtenteils auf das Latenz-assoziierte Transkript (LAT) (Wagner et al. 1988; Feldman et al. 2002; Umbach et al. 2008), sodass kaum virale Antigene vorhanden sind. Die LAT Sequenz enthält sieben miRNAs und zwei sRNAs (Umbach et al. 2008; Shen et al. 2009). Diese regulieren die Transkription viraler Proteine (Umbach et al. 2008) und hemmen die Apoptose (Ahmed et al. 2002; Jin et al. 2003; Shen et al. 2009). Die Reaktivierung von HSV-1 korreliert mit einer ganzen Reihe Stressfaktoren, wie UV-Strahlung, hormonellen Schwankungen, lokalem Sauerstoffmangel im Gewebe und psychischem Stress. Beim Wechsel von latentem in lytischen Zustand spielt das virale Protein VP16 eine Rolle, die genauen Mechanismen sind jedoch unbekannt (Thompson und Sawtell 2011; Kim et al. 2012).

Im lytischen Zustand können Herpesviren die NK-Zellantwort hemmen (Rao et al. 2011) und die Zellviabilität und Migration von dendritischen Zellen inhibieren (Müller et al. 2004; Prechtel et al. 2005). Sie manipulieren Signalwege der Immunantwort (beispielsweise den NFκB-Signalweg) (Amici et al. 2006; van Lint et al. 2010), inhibieren die Fas-vermittelte Apoptose (Medici et al. 2003; Dufour et al. 2011) und beeinflussen die Prozessierungswege von MHC I und II. Beispielsweise interagiert das virale HSV-1 Protein ICP47 mit TAP Proteinen und verhindert den Transport von antigenen Peptiden ins ER und damit die Beladung von MHC I, was zum Schutz vor zytotoxischen T-Zellen führt (York et al. 1994; Früh et al. 1995; Hill et al. 1995). Das

Glykoprotein B interagiert mit CD1d, verringert die Oberflächenexpression des Proteins und hemmt damit die NK-Zellfunktion (Rao et al. 2011). Außerdem beeinflusst gB die zelluläre Lokalisation von HLA-DR, HLA-DM und Ii (Neumann et al. 2003). Es interagiert direkt mit MHC II und führt nach der Degeneration der Invarianten Kette zur verstärkten Sortierung von MHC II in Exosomen (Sievers et al. 2002; Temme et al. 2010). Eine funktionierende MHC II Präsentation ist für die Aktivierung von CD4+ T-Zellen essentiell, welche wiederum eine zentrale Rolle bei der antiviralen Immunabwehr spielen (s. 1.3.6.).

## 1.4 Fragestellung der Arbeit

Nach einer Infektion mit Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) verhindern zahlreiche Evasionsstrategien eine vollständige Eliminierung des Virus durch das Immunsystem. Dabei spielt das HSV-1 Glykoprotein eine wichtige Rolle. Es interagiert mit Proteinen des MHC Klasse II Prozessierungsweges (Sievers et al. 2002; Neumann et al. 2003). Dabei führt gB zu einer vermehrten Sortierung von HLA-DR in den exosomalen Weg (Temme et al. 2010). Die Transfektion von Zellen mit gB führt zur Induktion vergrößerter Vesikel (Temme et al. 2010; Bocuk 2012). Ein Teil dieser Vesikel ist CD63 positiv und enthält gB und MHC II (Temme et al. 2010). Die Akkumulation von gB in vergrößerten Vesikeln könnte eine Bedeutung für die Manipulation des MHC Klasse II Prozessierungsweges haben und die zelluläre Lokalisation von Proteinen des MHC Klasse II Prozessierungsweges könnte durch gB manipuliert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten endosomale, gB induzierte Vesikel morphologisch charakterisiert und ihre Bedeutung für eine mögliche Manipulation des MHC Klasse II Prozessierungsweges untersucht werden. Nach der morphologischen Charakterisierung gB induzierter Vesikel mit Hilfe von Kofärbungen, sollte ermittelt werden, ob sich die Vesikelbildung durch Inhibition der zellulären Fusionsmaschinerie hemmen lässt. Der intrazelluläre Transport von gB wird durch Signalmotive auf der zytoplasmatischen Domäne gewährleistet (Beitia Ortiz de Zarate et al. 2004; Calistri et al. 2007). Deshalb sollte die Rolle zytoplasmatischer Signalmotive und der Trimerisierung der zytoplasmatischen Domäne von gB auf die Lokalisation in gB induzierten Vesikelpopulationen untersucht werden. Dazu sollen zytoplasmatische Deletionskonstrukte des gB hergestellt und gezeigt werden, ob es zum ER-Export, früh- und spätendosomaler Lokalisation und der Sortierung in den exosomalen Weg der Konstrukte kommt. In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, ob gB einen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von Proteinen des MHC Klasse II Prozessierungsweges nimmt. Dazu sollte festgestellt werden, ob MHC Klasse II, Peptid beladenem MHC Klasse II und Invarianter Kette in gB exprimierenden Zellen, mit CD63 negative, gB induzierte Vesikel kolokalisieren und ob diese Kolokalisation zu einer veränderten Verteilung der Proteine führt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

#### 2.1.1 Geräte

Agarosegelelektrophorese	Renner, Darmstadt
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Bakterieninkubator	Heraeus, Zürich, Schweiz
Brutschrank für eukaryotische Zellen	Heraeus, Zürich, Schweiz
Durchflusszytometer FACS Scan	BD Biosciences, Heidelberg
Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR	CAWO Photochemisches Werk GmbH, Schrobenuhausen
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf GmbH, Hamburg
Kassetten für Autoradiographie	Faust GmbH, Köln
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riss
Mikroliterpipetten	Thermo Labsystems, Vantaa, Finnland Gilson Pipetman, Langenfeld
Mikroskop Wilovert	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop LSM 510 Meta	Zeiss, Oberkochen
Mikrowellenherd	Micromat AEG Hausgeräte, Berlin
Netzgeräte	Renner, Darmstadt
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim
pH-Meter inoLab pH 730	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Überkopfmischer	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
SDS-PAGE Elektrophoresekammer	cti, Idstein
Semidry Blotting Apparatur	cti, Idstein
Sicherheitswerkbank	STEAG Laminarflow-Prozesstechnik GmbH, Pfullingen
Spektrophotometer U-1100	Hitachi, Tokyo, Japan
Synergy HT Multi - Mode Microplate Reader	BioTek, Bad Friedrichshall



Thermomixer 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg
Tiefkühltruhe (-80 °C) Forma 900 Series	Thermo Scientific, Rockford, USA
Vortex Genie 2	Bender & Holbein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad Julabo 12B	Julabo Labortechnik GmbH, Houston, USA
Wippe Rocking Platform	Biometra, Göttingen
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Biofuge 22R	Heraeus, Zürich, Schweiz
Zentrifuge J-20 HS Beckmann	Beckmann, Hamburg
Zentrifuge Ultrazentrifuge!	Beckmann, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus, Zürich, Schweiz

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

15 ml-, 50 ml-Falcon-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
1,5 ml Reaktionsgefäße für die Ultrazentrifuge	Beckmann, Hamburg
10 cm Schalen für die Zellkultur	Sarstedt, Nümbrecht
6-, 12- und 96- Well-Platten für die Zellkultur	Sarstedt, Nümbrecht
Autoradiographie-Film Cronex 5 (für WB)	Agfa-Gaevert, Leverkusen
CL-4B Sepharose	Pharmacia GmbH, Freiburg
Cryo Tube™	Nunc, Wiesbaden
Deckgläser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Einmalspritzen und Kanülen	VWR, Darmstadt
Einweghandschuhe Rotiprotect	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme	Agfa-Gaevert, Leverkusen
FACS Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Gel-Blotting Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Nitrozellulosemembran BA83	GE Healthcare, Freiburg
Objektträger	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago,

	USA
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen (für Bakterien)	Greiner, Flacht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Protein-A-Sepharose	Amersham Biosciences, Little Chalfort, UK
Sterilfilter 0,22/0,45µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
T25- und T75 Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Take3 Trio Mikro-Volumen-Platte	BioTek, Bad Friedrichshall
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann, Hamburg
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agar	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxisulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Complete (Protease-Inhibitorcocktail)	Roche Diagnostics, Mannheim
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
dNTPs	Thermo Scientific, Rockford, USA
Dulbecco's MEM	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Dulbecco's PBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
ECL Westernblot Detektionsreagents	Amersham Biosciences, Little Chalfort, UK
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt

---

FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS) "GOLD"	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Fluoromount-G	eBioscience, Inc., San Diego, USA
G418	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES Buffer Solution (1 M)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
HybridoMed DIF-1000	Biochrom, Berlin
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumacetat (KAc)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
LB Broth, Lennox	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
modified Eagle Medium (MEM)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Myco-3	AppliChem, Darmstadt
Natriumazid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumpyrovat (100mM)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Nonylphenoxyloxyethoxyethanol40 (NP40)	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
PEI Max	Polysciences Inc., Warrington, USA
PBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Ponceau S	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti-Block	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti-Immunoblock	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti <sup>®</sup> -Load 1 Proteinauftragspuffer, reduzierend	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Propidium-Iodid (PI)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SOC Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio Rad, Richmond, USA

Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X 100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	AppliChem, Darmstadt
Trypsin-EDTA (05 / 0,02 % w/v in PBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Tween20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Wortmannin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Alle aufgelisteten Chemikalien besitzen den Reinheitsgrad, der für molekularbiologische Arbeiten erforderlich ist. In der Zellkultur eingesetzte Reagenzien sind steril und für die Anwendung in der Zellzucht geeignet.

### Enzyme:

Agel	Thermo Scientific, Rockford, USA
Apel	Thermo Scientific, Rockford, USA
BamHI	Thermo Scientific, Rockford, USA
HindIII	Thermo Scientific, Rockford, USA
KpnI	Thermo Scientific, Rockford, USA
Q5 <sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt
RNAse A (für Minipräparation)	New England Bio Labs, Ipswich, USA
Taq DNA polymerase	Thermo Scientific, Rockford, USA

### Marker:

PeqLab 1 kb DNA-Leiter	PeqLab Biotechnologies GmbH, Erlangen
PeqLab 100 bp DNA-Leiter	PeqLab Biotechnologies GmbH, Erlangen
PeqLab peqGOLD Protein Marker V	PeqLab Biotechnologies GmbH, Erlangen
PeqLab Protein Marker III	PeqLab Biotechnologies GmbH, Erlangen

### Kits:

Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
Gelelutionskit	Thermo Scientific, Rockford, USA
GenJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
NucleoBond <sup>®</sup> Plasmid-Purification	Macherey und Nagel, Düren
pcDNA <sup>™</sup> 3.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> TA Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.1.4 Antikörper

**Tabelle 2.1.4.1:** Primärantikörper

Epitop (ggf. Klon)	Isotyp/Spezies	Verwendung	Quelle
Aktin ( <i>AC-40</i> )	IgG2a/Maus	WB	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (A3853)
Calnexin ( <i>AF18</i> )	IgG1/Maus	IF	Dianova, Hamburg (ABR-01072)
CD63 ( <i>MEM-259</i> )	IgG1/Maus	FACS, IF, IP	Exbio, Vestec, Tschechische Republik (11-343)
EEA1	Kaninchen	WB, IF, IP	Thermo Scientific, Rockford, USA (PA5-17228)
GFP ( <i>3H9</i> )	IgG2a/Ratte	WB	Chromotek, Planegg
HSV-1 und-2 gB ( <i>2c/2 mAb</i> )	IgG2a/Maus	FACS, IF, IP	Eis-Hübinger et al. 1993
HSV-1 und-2 gB ( <i>10B7</i> )	IgG1/Maus	WB	Abcam, Cambridge, UK (ab6506)
Invariante Kette, N-Terminus (as 1-73) ( <i>Vic-Y1</i> )	IgG1/Maus	IF, IP	Quaranta et al. 1984
MHCI-Moleküle ( <i>HC10</i> )	IgG2a/Maus	WB	Stam et al. 1986
MHCI-Moleküle ( <i>W6/32</i> )	IgG2a/Maus	FACS, IF, IP	Barnstable et al. 1978
MHCII-Molekül HLA-DR $\alpha$ ( <i>Tal-1B5</i> )	IgG1/Maus	IP, WB	Adams et al. 1983
MHCII-Moleküle ( <i>ISCR3</i> )	IgG2b/Maus	FACS, IF, IP	Watanabe et al. 1983
MHCII-Molekül HLA-DR ( <i>D1-12</i> )	IgG2a/Maus	IF, IP	Accolla et al. 1981
MHCII-Molekül HLA-DR $\alpha$ ( <i>YD1/63.4.10</i> )	IgG2a/Ratte	IF	Serotec, Puchheim (MCA72G)

6-His-Tag	Kaninchen	FACS, IF, IP	Bethyl (A190-114A)
Ratte $\kappa$ -Kette (MAR 18.5)	IgG2a/Maus	FACS	Lanier et al. 1982
Transferrin Rezeptor (PA-1)	Maus	IF	(Koch und Hämmerling 1986)
V5-Tag (SV5-Pk1)	Maus	FACS, IF, WB	Serotec, Puchheim

**Tabelle 2.1.4.2:** direkt gekoppelte Primärantikörper für die Immunfluoreszenz

Epitop (ggf. Klon)	Isotyp/Spezies	Gekoppelt an	Quelle
CD63 (MEM-259)	IgG1/Maus	FITC	Exbio, Vestec, Tschechische Republik (1F-343)
HLA-DR (AC122)	IgG2a/Maus	Allophycocyanin	Miltenyi Biotec GmbH, Gladbach (130-095- 297)

**Tabelle 2.1.4.4:** Sekundärantikörper

Epitop	Gekoppelt an	Verwendung	Quelle
Maus IgG	Alexa Fluor488	IF	Invitrogen, Karlsruhe
Maus IgG	Alexa Fluor594	IF	Invitrogen, Karlsruhe
Maus IgG	HRP	WB	Dianova, Hamburg
Kaninchen IgG	Alexa Fluor488	IF	Invitrogen, Karlsruhe
Kaninchen IgG	Alexa Fluor594	IF	Invitrogen, Karlsruhe
Kaninchen IgG	HRP	WB	Dianova, Hamburg
Ratte IgG	Alexa Fluor594	IF	Invitrogen, Karlsruhe
Ratte IgG	HRP	WB	Dianova, Hamburg

## 2.1.5 Plasmide und Oligonucleotide

**Tabelle 2.1.5.1:** Auflistung aller verwendeten Vektoren

Vektor	Beschreibung
pcDNA <sup>TM</sup> 3.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> TA	Linearisierter TOPO <sup>®</sup> TA -Vektor von Invitrogen, zum Klonieren von PCR-Produkten
pcDNA3.1(-) HSV-1 gB myc/His	HSV-1 Stamm 17 <sup>+</sup> Glykoprotein B cDNA in eukariotischem Expressionsvektor mit C-terminalem myc/His-Tag
pcDNA3.1(-) HSV-1 gB-GFP	HSV-1 Stamm 17 <sup>+</sup> Glykoprotein B cDNA in eukariotischem Expressionsvektor mit C-terminalem GFP-Tag

pcDNA3.1(-) HSV-1 GFP	Eukaryotischer Expressionsvektor mit GFP (kloniert aus dem pEGFP-N1 Vektor)
pcDNA3.1(-) HSV-1 gB-mCherry	HSV-1 Stamm 17 <sup>+</sup> Glykoprotein B cDNA in eukaryotischem Expressionsvektor mit C-terminalem mCherry-Tag
pcDNA3.1(-) HSV-1 gBΔ895-904 V5/His Topo	HSV-1 Stamm 17 <sup>+</sup> Glykoprotein B cDNA, bei der die Sequenz der Aminosäuren 895-904 deletiert ist, in eukaryotischem Expressionsvektor mit C-terminalem V5/His-Tag
pcDNA3.1(-) HSV-1 gBΔ889-904 V5/His Topo	HSV-1 Stamm 17 <sup>+</sup> Glykoprotein B cDNA, bei der die Sequenz der Aminosäuren 889-904 deletiert ist, in eukaryotischem Expressionsvektor mit C-terminalem V5/His-Tag
pcDNA3.1(-) HSV-1 gBΔ877-904 V5/His Topo	HSV-1 Stamm 17 <sup>+</sup> Glykoprotein B cDNA, bei der die Sequenz der Aminosäuren 877-904 deletiert ist, in eukaryotischem Expressionsvektor mit C-terminalem V5/His-Tag
pcDNA3.1(-) HSV-1 gBΔ855-904 V5/His Topo	HSV-1 Stamm 17 <sup>+</sup> Glykoprotein B cDNA, bei der die Sequenz der Aminosäuren 855-904 deletiert ist, in eukaryotischem Expressionsvektor mit C-terminalem V5/His-Tag
pcDNA3.1(-) HSV-1 gBΔ805-904 V5/His Topo	HSV-1 Stamm 17 <sup>+</sup> Glykoprotein B cDNA, bei der die Sequenz der Aminosäuren 805-904 deletiert ist, in eukaryotischem Expressionsvektor mit C-terminalem V5/His-Tag
pcDNA3.1(-) HSV-1 gBΔ805-904YMAL V5/His Topo	HSV-1 Stamm 17 <sup>+</sup> Glykoprotein B cDNA, bei der die Sequenz der Aminosäuren 805-904 deletiert und die Sequenz für das <sup>851</sup> YMAL <sup>854</sup> Motiv angehängt ist, in eukaryotischem Expressionsvektor mit C-terminalem V5/His-Tag
pEGFP-ctEEA1 C1	cDNA des C-terminalen Bereichs von EEA1 (aa 1257-1411) in eukaryotischem Expressionsvektor mit N-terminalem GFP-Tag
pEGFP-EEA1 C1	EEA1 cDNA in eukaryotischem Expressionsvektor mit N-terminalem GFP-Tag
pEGFP-FYVE C1	cDNA für ein Duplikat des FYVE Motivs (aa147-223) aus Maus Hrs, wobei der Linker QGQGS die beiden FYVE Finger trennt, in eukaryotischem Expressionsvektor mit N-terminalem GFP-Tag
pEGFP-N1	Eukaryotischer Expressionsvektor mit GFP und N-terminal gelegenem Klonierungsbereich mit Restriktionsschnittstellen
pEGFP-Rab5 C1	cDNA von humanem rab5 in eukaryotischem Expressionsvektor mit N-terminalem GFP-Tag
pEGFP-Rab7b C1	cDNA von humanem rab7b in eukaryotischem Expressionsvektor mit N-terminalem GFP-Tag

**Tabelle 2.1.5.2:** Auflistung aller verwendeten Primer

<b>Primername</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Verwendungszweck</b>
HSV1_gB.fw	ATGCGCCAGGGCGCCC	Klonierung
HSV1_gB.fw lang	ATGCGCCAGGGCGCCCCCGCG	Klonierung
HSV1_gB796-904.fw	TACGTCATGCGGCTGCAGAGCAACCC	Klonierung
HSV1_gB774-904.fw	TTTGGGGCGCTGGCCGTGGGTC	Klonierung
HSV1_gBd805YMAL.rv	CAGGGCCATGTAGTTGCTCTGCAGCCG CATGACGTA	Klonierung
HSV1_gBd805-904.rv	GTTGCTCTGCAGCCGCATGACGTA	Klonierung
HSV1_gBd855-904.rv	AGACACCAGGGCCATGTACCG	Klonierung
HSV1_gBd877-904.rv	TACGTCATGCGGCTGCAGAGCAACCC	Klonierung
HSV1_gBd889-904.rv	GACCTTGGCGCTGAGCAG	Klonierung
HSV1_gBd895-904.rv	GTTGGGAAC TTGGGTGTAGTTGGT	Klonierung
HSV1_gB.rv	CAGGTCGTCCTCGTCGGCGTCA	Klonierung
HLA-A2.fw	ATGGCCGTCATGGCGCCCCGAACC	Klonierung
HLA-A2d333-365.rv	CCGCATGACGTACCACATCACGGCAG	Klonierung
HLA-A2d309-365.rv	GCGCCCCAAAGATGGGGATGGTGG	Klonierung
T7.fw	AATACGACTCACTATAGG	Sequenzierung
BGH.rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Sequenzierung
HSV-1_gB_553.fw	ATCTTTGAGGACCGC	Sequenzierung
HSV-1_gB_1386.fw	GCTGTACGTGCGGGAAACACC	Sequenzierung

## 2.1.6 Bakterienstämme

**Tabelle 2.1.6:** Auflistung aller verwendeten Bakterienstämme

<b>Bakterienstämme</b>	<b>Spezifität:</b>
One Shot® TOP10 Invitrogen, Karlsruhe	F-mcrA, $\Delta$ (mrrhsdRMSmcrBC), $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ lacX74, recA1, araD139, $\Delta$ (araleu)7697, galU, galK, rlpL, (StrR), endA1 nupG

## 2.1.7 Virusstamm

Zur Untersuchung von Glykoprotein B im Kontext einer Infektion wurde HSV-1 Stamm 17<sup>+</sup> [Lysat 10<sup>6,5</sup> ID50/50  $\mu$ l] verwendet.



## 2.1.8 Zelllinien

**Tabelle 2.1.7:** Auflistung aller verwendeten Zelllinien

Name	Beschreibung	Literaturquelle
Cos-7	SV-40 transformierte Nierenzelllinie des Affen ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )	Gluzman 1981
IMR90S	SV-40 transformierte humane Lungenfibroblastenzelllinie	Nichols et al. 1977
Mel JuSo	MHCII-exprimierende, humane Melanomzelllinie	Johnson et al. 1981
Mel JuSo gB	Stabil gB exprimierende, humane Melanomzelllinie	Temme et al. 2010

## 2.1.9 Programme und Onlinetools

Bildbearbeitung	ImageJ (Rasband WS, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, USA) ImageJ Plugin JaCoP (Bolte und Cordelieres 2006) LSM Image Browser (Zeiss, Oberkochen) Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. ( <a href="http://www.jmol.org/">http://www.jmol.org/</a> )
Datenverarbeitung	Excel (Microsoft Inc., Redmond, USA)
Densitometrie	FCS Express 4 Plus (De Novo Software, Glendale, Kanada) Flowing Software 2 (Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology, Finnland)
Sequenzanalysen & Sequenzvergleiche	GENTle (Magnus Manske, Universität Köln) BioEdit (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, Kanada) MUSCLE (McWilliam et al. 2013) UbPred.org (Radivojac et al. 2010)
Textverarbeitung	Adobe Reader (Adobe Systems GmbH, München) Apache OpenOffice (Apache Software Foundation, Budapest, Ungarn) Microsoft Office (Microsoft Inc., Redmond, USA)

## 2.2 Methoden der Molekularbiologie

### 2.2.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt mit Hilfe des *Nanodrop* bei 260 nm. Anhand der gemessenen Extinktion lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes die Nukleinsäurekonzentration bestimmen.

Die bei 280 nm gemessene Extinktion erfolgt durch die Reste der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin und ermöglicht somit eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäuren. Der 260 / 280 Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 2.2.2 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse.

Für die Präparation kleiner Plasmidmengen mit möglichst hohem Durchsatz werden 1 - 1,5 ml Bakterienkultur zentrifugiert (1 min, 8.300 x g, Raumtemperatur) und der Überstand verworfen. Nachdem das Pellet in 200 µl Puffer 1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA; 100 µg / ml RNase A, pH 8) resuspendiert wurde, werden 400 µl Puffer 2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) zugegeben, zwei bis vier Mal invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Bakterienzellen lysiert sind. Es werden 300 µl Puffer 3 (3 M KAc, pH 5,5) zugegeben und durch gründliches Invertieren gemischt, sodass Proteine und chromosomale DNA ausfallen. Das Gemisch wird zentrifugiert (10 min, 18.000 x g, Raumtemperatur) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Es werden 0,7 Volumenteile Isopropanol zugegeben und erneut zentrifugiert (10 min, 18.000 x g, Raumtemperatur). Das Pellet wird mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert (2 min, 18.000 x g, Raumtemperatur) und anschließend der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wird an der Luft getrocknet, bis der gesamte Alkohol verdunstet ist und in 30 - 50 µl Wasser resuspendiert.

Für eine reinere Präparation eines Plasmids in größerer Menge werden 200 - 250 ml Übernachtskultur mit Hilfe des *NucleoBond PC 100* Kits von Macherey und Nagel nach Angaben der Hersteller aufgereinigt.

### 2.2.3 PCR: in vitro Amplifikation von DNA

Bei der in vitro DNA Amplifikation wird eine DNA-Sequenz mit Hilfe einer Polymerase in der Polymerase Kettenreaktion ("Polymerase Chain Reaction", PCR) vervielfältigt. In der vorliegenden Arbeit wird die PCR für das Klonieren von Fusions und Deletionskonstrukten eingesetzt. Für Produkte mit einer Länge unter einem 1 kb wird die Taq Polymerase von Thermo Scientific, für größere Produkte die Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase von NEB oder das Expand Long Template PCR System von Roche Diagnostics nach Angaben der Hersteller verwendet.

Für die Herstellung von Fusionsproteinen werden zunächst beide Teilstücke in separaten PCRs amplifiziert, wobei die Sequenzen der Primer so gewählt werden, dass sie sich an der Fusionsstelle überlagern. In einer zweiten PCR wird das Fusionskonstrukt amplifiziert, wobei die Teilstücke aus den ersten PCRs als Template dienen.

### 2.2.4 Synthese von A-Überhängen

Die für die PCR (siehe 2.2.3) verwendete Q5 Polymerase erzeugt glatte Enden am PCR-Produkt, weshalb vor dem TOPO Klonieren A-Überhänge synthetisiert werden müssen. Dazu werden zu 12 µl PCR-Produkt Taq Polymerase Puffer, dATP (600 µM), und Taq Polymerase (1 U; Thermo Scientific) gegeben und der Ansatz für 15 min bei 72 °C inkubiert.

### 2.2.5 Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Agarosegel-Elektrophorese werden Nukleinsäuren je nach Größe der zu betrachtenden DNA-Fragmente bei 85 V - 150 V für eine Stunde auf einem 1 - 2 %igem TAE-Agarosegel aufgetrennt. Als Marker werden DNA 100 bp Marker und DNA 100 bp Marker verwendet, als Puffer TAE (40 mM Tris, 20 mM NaAc, 1 mM EDTA, pH 8,3). Durch Zugabe von Ethidiumbromid (0,6 mg / l) zum Gel kann die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### 2.2.6 Extraktion von DNA aus dem Agarosegel

Die Gelbande mit der richtigen Fragmentlänge wird mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des *GenJET Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 2.2.7 Enzymatische Restriktion

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen und schneiden innerhalb spezifischer, meist palindromischer DNA-Sequenzen, wobei je nach Restriktionsenzym glatte Enden oder Einzelstrangüberhänge ('sticky ends') entstehen können. Restriktionsendonukleasen vom Typ IV hingegen erkennen und spezifische Modifikationen der DNA, beispielsweise schneidet DpnI methylierte DNA unabhängig von ihrer Sequenz.

Für den analytischen Restriktionsverdau wird ca. 1 µg DNA mit den gewünschten Restriktionsenzymen und dem entsprechenden Restriktionspuffer in Einfachkonzentration für 1 h bei 37 °C verdaut.

### 2.2.8 TOPO Klonierung

Der pcDNA<sup>TM</sup> 3.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> TA -Vektor liegt in linearisierter Form vor und besitzt 3'-Thymidinüberhänge. An das Phosphat des Thymidins ist kovalent eine Topoisomerase I gebunden. Das PCR-Produkt inseriert mit Hilfe seiner A-Überhänge in den Vektor, wobei die Topoisomerase die Bildung der Phosphodiesterbindung zwischen der Phosphatgruppe des überhängenden Thymidins und der 5'-Hydroxyl-Gruppe des PCR-Produkts katalysiert.

Die TOPO Klonierung wird mit Hilfe des pcDNA<sup>TM</sup> 3.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> TA *Kits* von Invitrogen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Ligation wird der Ansatz in kompetente Zellen (*E.coli TOP10*) transformiert (siehe 2.2.9).

### 2.2.9 Kultivieren und transformieren von Prokaryotischen Zellen

Bakterien werden in LB-Flüssigkulturen oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Zur Selektion wird Medium und Platten Ampicillin (100 µg / ml) oder Kanamycin (50 µg / ml) zugegeben.

Zur Transformation werden mit Calciumchlorid kompetent gemachte *E. coli TOP10* Zellen auf Eis aufgetaut, 2 - 5 µl Plasmid zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erhalten die Zellen einen Hitzeschock (30 sec, 42 °C), der zur Aufnahme des Plasmids durch das Bakterium führt und werden für 2 min auf Eis abgekühlt. Es werden 250 µl LB-Medium oder S.O.C.-Medium zugegeben und die Zellen für 1 h auf dem Thermomixer (37 °C, 750 RPM) geschüttelt. Zur weiteren Vermehrung werden die Bakterien auf LB-Agarplatten ausgestrichen oder in LB-Flüssigmedium gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.10 Sequenzieren der DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde durch die Firma **Seqlab**- Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen) durchgeführt. Die vergleichende Analyse von Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software GENTle von Magnus Manske (Universität Köln) und dem Onlinetool MUSCLE von EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

## 2.3 Methoden der Proteinbiochemie

### 2.3.1 Präparation von Proteinen aus adhärenenten Zellen

Adhärenente Zellen werden mit Hilfe von Trypsin-EDTA (0,5 / 0,02 % w/v in PBS) abgelöst, gezählt und gleiche Zellmengen pelletiert (5 min, 3.500 x g, Raumtemperatur). Alle weiteren Schritte werden auf Eis bzw. in einer vorgekühlten Zentrifuge durchgeführt. Die Zellen werden für eine halbe Stunde in Lysepuffer (ST-Puffer + 0,5 % Triton X 100, Complete Protease-Inhibitorcocktail) lysiert, wobei immer wieder mittels Vortexer gemischt wird. Danach werden Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 18.000 x g, 4 °C) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Proben werden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.3.2 Immunpräzipitation

Zelllysate von etwa  $10^7$  Zellen (siehe 2.3.1) werden mit 10 µl CL-4B Sepharose (Pharmacia GmbH, Freiburg) für eine Stunde bei 4 °C auf dem Überkopfmischer vorpräzipitiert, sodass unspezifisch an Sepharose bindende Proteine entfernt werden. Durch Zentrifugation für 3 min bei 3.500 x g werden die Sepharosekugeln sedimentiert. Der Überstand wird mit 1 µg Antikörper in einem neuen Reaktionsgefäß gemischt und mit Protein-A-Sepharose (Amersham Biosciences) versetzt, welche zuvor mit ST-Puffer gewaschen wurde. Protein-A-Sepharose bindet spezifisch an den F<sub>c</sub>-Teil des Antikörpers, welcher wiederum an sein Epitop bindet. Die Proben werden für 1 - 24 h auf dem Überkopfmischer inkubiert. Anschließend wird das Präzipitat dreimal gewaschen (ST-Puffer + 0,5 % Triton X 100, Complete Protease-Inhibitorcocktail) und dann nach Zugaben von 2xRoti<sup>®</sup>-Load 1 Proteinauftragspuffer für

5 min bei 95 °C aufgeköcht. Dadurch lösen sich die denaturierten Proteine von der Sepharose.

### 2.3.3 Verdau mit Endoglykosidase H und Peptid-N-Glykosidase F

Viele Proteine des sekretorischen Weges werden in Endoplasmatischem Retikulum und Golgi durch Oligosaccharid-Ketten modifiziert, wobei man N-verknüpfte (Modifikation eines Asparagins) und O-verknüpfte Glykosylierungen (Modifikation eines Serins oder Threonins) unterscheidet. Die Zuckerketten N-glykosylierter Proteinen haben beim Verlassen des Endoplasmatischen Retikulums einen hohen Mannoseanteil und sind Endoglykosidase H (Endo H) sensitiv. Bei der weiteren Modifikation der Oligosaccharid-Ketten im Golgi durch die Mannosidase II, werden die gereiften Zuckerketten Endo H-resistent. Die Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) kann nahezu unabhängig von den Modifikationen der Oligosaccharid-Kette, zwischen Glycan und Glykoprotein schneiden. Das Fehlen oder Vorhandensein von Glykosylierungen lässt sich aufgrund der Größe der Oligosaccharid-Ketten mittels SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.3.4) bestimmen.

Für die Verdau werden Zelllysate (siehe 2.3.1) zunächst mit Roti<sup>®</sup>-Load 1 Proteinauftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Pro Probe werden drei Ansätze erstellt: eine unverdaute Kontrolle (20 µl Lysat / Präzipitat + 10 µl ST-Puffer) ein Endo H Verdau (20 µl Lysat / Präzipitat + 3 µl Puffer G5 + 0,5 µl EndoH + 6,5 µl ST-Puffer) und ein PNGase F Verdau (20 µl Lysat / Präzipitat + 3 µl Puffer G7 + 3 µl 10 % NP-40 + 0,2 µl PNGase F + 3,8 µl ST Puffer). Enzyme und Puffer stammen von New England Biolabs (G5: 50 mM Natriumzitat, pH 5,5; G7: 50 mM Natriumphosphat, pH 7,5). Der Verdau erfolgt für 10 h bei 37 °C.

### 2.3.4 SDS-PAGE

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine zunächst in SDS-haltigem Ladepuffer aufgeköcht (5 min, 95 °C) und dadurch denaturiert. Der verwendete Roti<sup>®</sup>-Load 1 Proteinauftragspuffer (Carl Roth GmbH) enthält darüber hinaus 2-Mercaptoethanol, das zur Reduktion von Disulfidbrücken führt. Je nach gewünschter Auftrennung werden die Proben auf ein 7 - 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS [w/v]). Die Gelelektrophorese erfolgt bei 60 V (Sammelgel) bis 90 V (Trenngel) für ca. 2,5 h.

### 2.3.5 Westernblot und Immundetektion

Nach der SDS-PAGE (siehe 2.3.4) werden die Proteine mit Hilfe einer Semidry Blotting Apparatur (cti) für 1 - 1,5 h bei 0,8 mA / cm<sup>2</sup>-Stapelfläche auf eine BA83 Nitrozellulosemembran geblottet. Dazu wird die Membran auf zwei Filter gelegt, das Gel darüber platziert und dieses mit zwei weiteren Filterpapieren bedeckt, wobei alle Bestandteile mit Transferpuffer (50 mM Tris, 40 mM Glycin, 20 % v/v Methanol, 0,4 % w/v SDS) getränkt werden.

Für die Immundetektion wird die Membran zunächst für 1 h bei Raumtemperatur in Rotiblock inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen und anschließend für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht 4 °C in primärem Antikörper inkubiert (Verdünnung 1:1000 - 1:5000 in Rotiblock). Nach dreimaligem Waschen für 7 min (in PBS mit 0,2 % Tween20) wird für eine dreiviertel Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. (Verdünnung 1:1000 in Rotiblock). Es wird erneut gewaschen (4 x 7 min in PBS mit 0,2 % Tween20) und dann ECL Westernblot Detektionsreagenz (Amersham Biosciences) auf die Membran gegeben und für zwei Minuten inkubiert. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminols, wodurch Chemilumineszenz frei wird. Diese wird durch einen Autoradiographie-Film erfasst und der Film mit Hilfe der Cawomat 2000 IR Entwicklermaschine entwickelt.

### 2.3.6 Nachweis von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue oder Ponceau S

Mit Hilfe der Farbstoffe Coomassie Brilliant Blue oder Ponceau S werden Proteine unspezifisch angefärbt. Nachdem eine SDS-Gelelektrophorese wie in 2.3.4 beschrieben durchgeführt wurde, wird das Trenngel für 10 min in Coomassie Brilliant Blue Lösung (50 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,115 % Coomassie Brilliant Blue) inkubiert. Anschließend wird das Gel durch mehrmaliges Waschen in Entfärbelösung (10 % Essigsäure, 10 % Methanol) soweit entfärbt, dass sich die Proteinbanden gut erkennen lassen. Die Färbung von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran erfolgt nach dem Blotten (siehe 2.3.5) mittels Ponceau S Lösung (5 % Essigsäure, 0,1 % Ponceau S), wobei die Membran mit destilliertem Wasser oder PBS entfärbt wird.

### 2.3.7 Immunfluoreszenzfärbung

Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden Proteine auf der Oberfläche von und / oder in fixierten und permeabilisierten Zellen angefärbt. Dazu werden die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen fixiert (4 % PFA in PBS für 15 min) und permeabilisiert (0,5 % Triton X 100 in ST-Puffer für 5 min). Anschließend werden sie für 30 min oder (unter Zugabe von 0,1 % Natrium-Azid) bis zum Zeitpunkt der Färbung in Roti-Immunoblock inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Für die Immunfluoreszenzfärbung werden 20 - 50 µl Primärantikörper (1:20 - 1:1000) auf die Zellen getropft und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit PBS werden die Zellen für 1 h mit für die Primärantikörper spezifischen Sekundärantikörpern (1:1000) inkubiert, die an Alexa-Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Gegebenenfalls wird danach erneut mit PBS gewaschen (3 x 10 min) und für eine Stunde mit direkt gekoppelten Primärantikörpern gefärbt. Anschließend werden die Zellen viermal für 10 - 15 min mit PBS gewaschen, wobei der Waschpuffer während des zweiten Waschschriffs mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) versetzt wird. Die gefärbten Deckgläschen werden mit Fluoromount-G eingedeckelt und in Dunkelheit bei 4 °C gelagert.

Die Bilder wurden mit Hilfe des Axiophot (Zeiss) Mikroskops oder des LSM 510 Meta (Zeiss) Mikroskops, die an eine Kamera angeschlossen sind, aufgenommen. Im Gegensatz zu herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopen wird bei einem Laser Scanning Mikroskop nicht das gesamte Präparat beleuchtet, sondern punktweise mit einem fokussierten Laserstrahl abgefahren. Durch eine Lochblende vor dem Detektor wird das Licht aus Ebenen außerhalb der Fokusebene abgefangen, sodass ein sehr kontrastreiches Bild entsteht. Für Bildbearbeitung und quantitativen Analyse wurden die Programme LSM Image Browser von Zeiss und ImageJ von W.S. Rasband (U.S. National Institutes of Health, USA) verwendet.

Die Berechnung der Mander-Koeffizienten erfolgte mit Hilfe des ImageJ Plugins JaCoP.

### 2.3.8 Durchflusszytometrie

Nachdem die Zellen mit Hilfe von Trypsin-EDTA (05 / 0,02 % w/v in PBS) abgelöst, gezählt und gleiche Zellmengen pelletiert (5 min, 3.500 x g, Raumtemperatur) wurden, werden sie in FACS-Puffer (PBS + 3 % FCS + 0,1 % NaAzid) resuspendiert und zur Färbung in FACS-Röhrchen überführt. Hierzu werden die Zellen entweder für eine



Oberflächenfärbung lebend gefärbt oder durch Zugabe von 100 µl 4% PFA für 10 - 15 min bei Raumtemperatur fixiert, mit FACS-Puffer gewaschen und für 5 min mit 100 µl Triton X 100 (0,5 % in PBS) permeabilisiert.

Die weiteren Schritte werden auf Eis oder in vorgekühlten Zentrifugen durchgeführt. Die Zellen werden für 1 h in 50 µl Primärantikörper inkubiert (2c/2 *mAb*; 0,4 µg / ml) und dreimal mit FACS-Puffer gewaschen (resuspendieren in 100 µl FACS-Puffer und abzentrifugieren für 3 min bei 3.500 x g). Anschließend werden die Zellen für 30 min mit 50 µl Maus-spezifischem Alexa Fluor488 gekoppeltem Sekundärantikörper (1:2000 in FACS-Puffer) unter Zugabe von Propidium-Iodid (1 µg / ml) inkubiert und erneut dreimal mit FACS-Puffer gewaschen. Propidium-Iodid dringt durch perforierte Zellmembranen und interkaliert mit der DNA, kann lebende Zellen mit intakter Zellmembran jedoch nicht anfärben. Nach dem dritten Waschschrift werden die in FACS-Puffer suspendierten Proben im Durchflusszytometer *FACS Scan* (BD Biosciences, Heidelberg) gemessen und die Ergebnisse mit Hilfe der Programme Flowing Software 2 von Perttu Terho (Turku Centre for Biotechnology, Finland) und FCS Express 4 Plus von De Novo Software ausgewertet.

## 2.4 Methoden der Zellbiologie

### 2.4.1 Kultivierung eukariotischer Zellen

Alle Zelllinien werden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Nährmedium für die adhärenenten Cos-7, Mel JuSo Zellen wird DMEM Medium mit HEPES (0,5 mM), Penicillin (100 Units / ml), Streptomycin (100 µg / ml) und 10 % FCS verwendet, für die adhärenenten IMR90S Zellen MEM Medium mit HEPES (0,5 mM), Natriumpyrovat (1 mM), Penicillin (100 Units / ml), Streptomycin (100 µg / ml) und 15 % FCS.

Bei Exosomenpräparationen und Internalisierungsexperimenten wurden die Zellen in serumfreien *Hybridomed DIF-1000* Medium unter Zugabe von HEPES (0,5 mM), Natriumpyrovat (1 mM), Penicillin (100 Units / ml), Streptomycin (100 µg / ml) kultiviert.

### 2.4.2 Transiente und stabile Expression in eukariotischen Zellen

Zur Transfektion wurde das Polyethylenimine PEI Max (Polysciences, 1 µg / µl, pH 8.0) verwendet. Als Polykation kann PEI Max mit Nukleinsäuren, welche negativ

geladen sind, Komplexe bilden, die dann von Zellen mittels Endozytose aufgenommen werden.

Pro Transfektionsansatz werden pro 10 cm Schale mit Zellen 5 µg - 8 µg DNA und pro Well (6-Well Platten) 1 - 3 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Plasmid-DNA und PEI Max werden in separate Reaktionsgefäße mit NaCl-Lösung (150 mM) gegeben, wobei die Menge von PEI Max der dreifachen Menge der eingesetzten DNA entspricht. Beide Ansätze werden gemischt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wird dem Medium der Zellen tröpfchenweise zugegeben und die Zellen werden für 24 - 72 h im Brutschrank inkubiert.

Zur Herstellung stabiler Zelllinien wird eine 10er Schale transfiziert und dem Medium 24 h nach der Transfektion das Neomycinderivat G418 (500 µg / ml) zugesetzt. Da neben dem Zielgen auch ein Gen für Neomycin-Resistenz exprimiert wird, kann auf diese Weise eine Selektion der Zellen erfolgen, die eine Expression rekombinanter Gene zeigen. Nach etwa zwei Wochen können der Schale stabile Klone entnommen und expandiert werden.

### **2.4.3 Untersuchung der Internalisierung von der Zelloberfläche**

Auf Deckgläschen ausgesäte Zellen, werden wie unter 2.4.2 beschrieben transfiziert und 48 h im Brutschrank inkubiert. Der Primärantikörper, der spezifisch gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist (gB-spezifischer Ak *2c/2 mAb* oder anti-CD63 Ak, Endkonzentration jeweils 1 µg / ml), wird in serumfreien *Hybridomed DIF-1000* Medium verdünnt. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und dann für 10 min auf Eis in *Hybridomed DIF-1000* Medium mit Antikörper inkubiert, sodass der Antikörper an das auf der Zelloberfläche vorhandene Epitop binden kann. Die Zellen werden erneut mit PBS gewaschen, mit DIF-Medium versetzt und für verschiedene Zeiträume im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert, sodass Epitop und gebundener Antikörper internalisiert werden können. Anschließend werden die Zellen fixiert und permeabilisiert und wie unter 2.3.7 beschrieben gefärbt, wobei die Zugabe des Primärantikörpers entfällt.

### **2.4.4 Gewinnung von Exosomen aus Zellkulturüberstand**

Vier bis sechs Stunden nach der Transfektion (siehe 2.4.2) wird das Medium der Zellen durch serumfreies *Hybridomed DIF-1000* Medium ersetzt und die Zellen für 48 h - 72 h im Brutschrank kultiviert. Der Überstand wird abgenommen und für 30 min

bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wird durch einen 0,22 µm Filter filtriert und die Exosomen für 2 h - 3 h bei 100.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml PBS für eine Stunde auf Eis inkubiert, damit die Exosomen sich lösen können. Dann wird erneut bei 100.000 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Exosomen werden je nach geplanter Anwendung in PBS oder 2 x RSB aufgenommen und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.4.5 Infektion von Zellen mit HSV-1

Zur Infektion mit HSV-1 Stamm 17<sup>+</sup> werden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 24 h in virushaltigem Medium inkubiert. Die Versuche wurden mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Eis-Hübinger im Institut für Virologie der Universität Bonn durchgeführt.

## 2.5 Statistische Methoden

### 2.5.1 Deskriptive Statistik

Um mehrere durchflusszytometrische Messungen zusammenzufassen wurden, Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Formal handelt es sich um n Messungen, wobei für einen Parameter die Messwerte  $x_1, x_2, \dots, x_n$  erfasst werden. Der Mittelwert (arithmetisches Mittel  $\bar{x}$ ), berechnet sich als die Summe aller Messwerte geteilt durch die Anzahl der Messwerte ( $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$ ).

Die Standardabweichung (SD) ist die Quadratwurzel der Varianz. Die Varianz ( $s^2$ ) ist ein Messwert für die Streuung der Messwerte und berechnet sich als die quadratische Abweichung der Messwerte vom Mittelwert ( $s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}$ ;  $SD = \sqrt{s^2}$ ).

In der Arbeit wurden mehrfach Durchmesser und Anzahl von Vesikeln unter verschiedenen Versuchsbedingungen bestimmt und die Ergebnisse als Boxplot dargestellt. Werden die Messwerte  $x_1$ , bis  $x_n$  in aufsteigender Reihenfolge sortiert, lassen sich die Quartile Q1 („unteres Quartil“), Q2 („mittleres Quartil“/Median) und Q3 („oberes Quartil“) bestimmen. Dabei ist der Medianwert der Wert, der höher oder

gleich hoch wie 50 % der Messwerte und niedriger oder genauso niedrig wie die anderen 50 % der Messwerte ist. Für das untere Quartil gilt entsprechend, dass mindestens 25 % der Messwerte  $\leq Q1$  und 75 % größer oder gleich  $Q1$  sind, für das obere Quartil, dass 75 % der Messwerte  $\leq Q3$  und 25 % der Messwerte  $\geq Q3$  sind. Bei Messungen mit großer Standardabweichung geben die Quartile einen besseren Überblick über die Verteilung der Messwerte als das arithmetische Mittel allein. Sie lassen sich in einem Boxplot darstellen, wobei die Box die mittleren 50 % der Messwerte (Interquartilsabstand) umfasst. Die Linien (Antennen) außerhalb der Box umspannen die Messwerte bis zum kleinsten bzw. größten Messwert des Datensatzes (Minimum bzw. Maximum). Eine Ausnahme bilden Ausreißer, die außerhalb der Antenne als leerer Kreis dargestellt werden. Der Median wird durch einen waagerechten Strich in der Box gekennzeichnet, das arithmetische Mittel durch einen Punkt.

### 2.5.2 Signifikanz und Mittelwertunterschiede

Eine Normalverteilung ist eine symmetrische, glockenförmige Verteilung mit dem Mittelwert  $\mu$  und der Streuung  $\sigma$ . Aus Mittelwert  $\bar{x}$  und Standardabweichung  $s^2$  einer untersuchten Stichprobe lassen sich die Mittelwert  $\mu$  und der Streuung  $\sigma$  für die gesamte Population schätzen.

Ein Unterschied zwischen zwei Messreihen kann nur dann als signifikant gelten, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass die gemessenen Werte der gleichen Population entstammen, unter einer bestimmten Schwelle liegt. Diese festgelegte Schwelle ist das Signifikanzniveau ( $\alpha$ ), welches in der vorliegenden Arbeit der Konvention entsprechend bei 5 % liegt ( $\alpha = 0,05$ ).

Der Signifikanzwert ( $p$ ) beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese ( $H_0$ ) zutrifft, nach der die beiden Messreihen einer identischen Population entstammen. Je niedriger der  $p$ -Wert, desto unwahrscheinlicher ist das Zutreffen der Nullhypothese und desto höher die Signifikanz des Messergebnisses.

Um zu ermitteln, ob der Unterschied zwischen zwei Messreihen, bei denen eine Normalverteilung angenommen wird, signifikant ist, wird ein T-Test verwendet. In der Berechnung werden die Differenz der Mittelwerte der Messreihen, die Varianz innerhalb der Stichproben und die Anzahl der Messwerte berücksichtigt. Die T-Tests (beidseitig; für Messreihen mit unterschiedlichen Varianzen) in der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Excel (Microsoft Inc., Redmond, USA) durchgeführt.

## 3 Ergebnisteil

### 3.1 Charakterisierung morphologischer Veränderungen nach HSV-1 gB Expression

#### 3.1.1 HSV-1 gB induziert vergrößerte intrazelluläre Vesikel

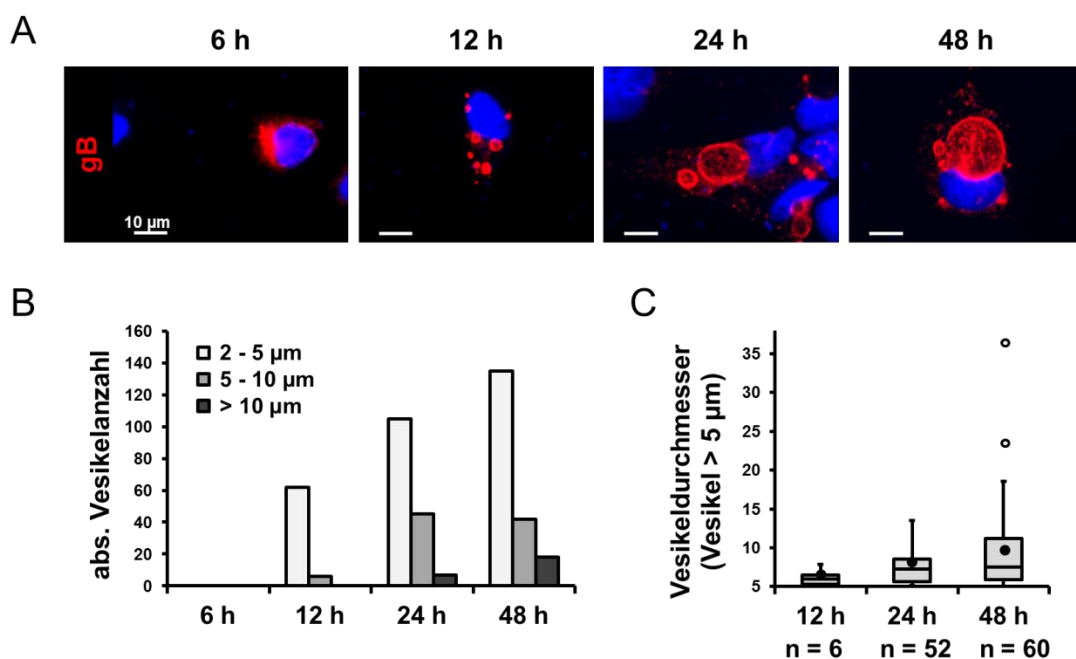
Die Transfektion mit für Herpes Simplex Virus Glykoprotein B (gB) kodierender cDNA kann in verschiedenen Zelllinien die Bildung leicht und stark vergrößerter Vesikel hervorrufen. Das gilt sowohl für verschiedene Stämme des Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) als auch für gB Orthologe aus anderen Herpesvirusspezies (Bocuk 2012).

Um den zeitlichen Verlauf der Entstehung gB-induzierter Vesikel zu untersuchen, wurde die humane Lungenfibroblastenzelllinie IMR90S mit gB transfiziert, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion fixiert und gegen gB immunfluoreszenzgefärbt (rot; Abb. 4A). Nach sechs Stunden zeigt die gB Färbung eine diffuse, leicht netzartige, perinukleäre Verteilung des Proteins (Abb. 4A, 6 h) und nach 12 Stunden sind gB positive Vesikel zu erkennen (Abb. 4A, 12 h). Im Zeitraum zwischen 12 und 24 Stunden nimmt die Größe der Vesikel deutlich zu (Abb. 4A, 24 h). Zwischen 24 und 48 Stunden kommt es zu einem weiteren Anstieg der Vesikeldurchmesser. Nach 48 Stunden finden sich vereinzelt Zellen mit Vesikeln, deren Durchmesser deutlich über 15  $\mu\text{m}$  liegen (Abb. 4A, 48 h).

Für die quantitative Analyse wurden die Durchmesser der Vesikel ( $> 2 \mu\text{m}$ ) von 30 Zellen pro Zeitpunkt bestimmt und die absolute Vesikelanzahl aller Zellen für jeden Zeitpunkt aufgetragen (Abb. 4B). 12 Stunden nach der Transfektion hat die überwiegende Mehrheit der Vesikel einen Durchmesser zwischen 2  $\mu\text{m}$  und 5  $\mu\text{m}$ , vereinzelt finden sich Vesikel mit einem Durchmesser von 5 - 10  $\mu\text{m}$ . Nach 24 Stunden hat sich die Anzahl der Vesikel mit einem Durchmesser von 2  $\mu\text{m}$  - 5  $\mu\text{m}$  und 5 - 10  $\mu\text{m}$  deutlich erhöht. Erstmals zeigen sich Vesikel, die größer sind als 10  $\mu\text{m}$  (Abb. 4B, dunkelgrauer Balken). 48 Stunden nach der Transfektion ist die Anzahl der Vesikel mit einem Durchmesser von mehr als 10  $\mu\text{m}$  weiter gestiegen.

Für stark vergrößerte Vesikel (Vesikel mit einem Durchmesser von mehr als 5  $\mu\text{m}$ ) wurden für jeden Zeitpunkt die Vesikeldurchmesser als Boxplot dargestellt (Abb. 4C). Der mittlere Vesikeldurchmesser nimmt mit der Zeit zu (Abb. 4C, Mittelwert durch

schwarze Punkte markiert). Zwischen 24 und 48 Stunden vergrößert sich die Streuung innerhalb der gemessenen Vesikeldurchmesser, während sich der Median kaum erhöht. Nach 48 Stunden finden sich Zellen mit Vesikeln, die wesentlich größer als 15  $\mu\text{m}$  sind (Abb. 4C). Die Induktion stark vergrößerter Vesikel durch gB erfolgt in IMR90S Zellen zwischen 12 und 24 Stunden, wobei die Zellen untereinander hinsichtlich der Anzahl und Durchmesser der Vesikel eine große Heterogenität aufweisen.



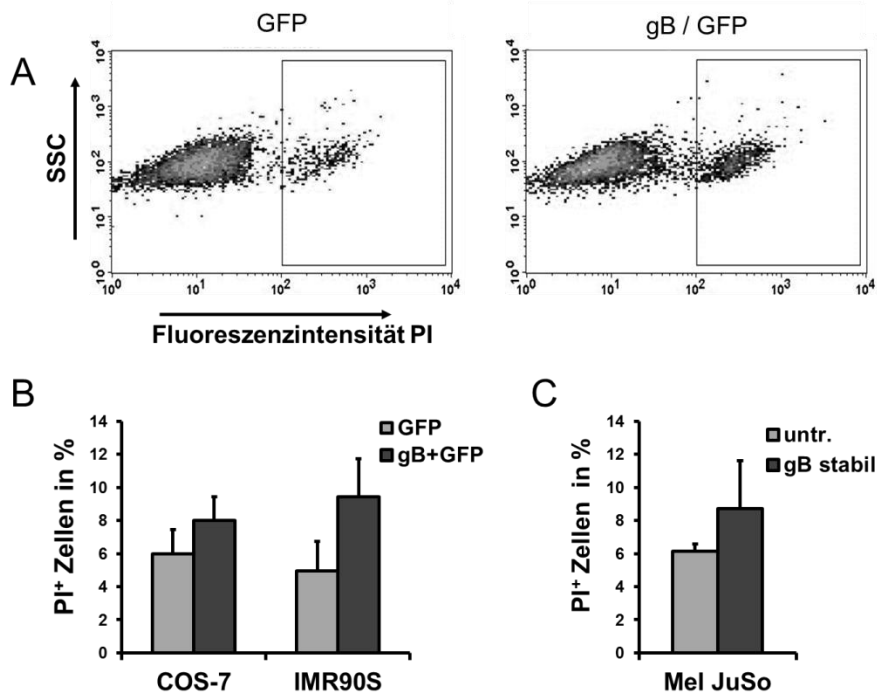
**Abb. 4: Zeitlicher Verlauf gB induzierter Vesikelbildung.** IMR90S Zellen wurden 6 h, 12 h, 24 h und 48 h nach der Transfektion mit gB fixiert und mit *2c/2 mAb* (anti-gB) und Maus-spezifischem, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa594 (rot) gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. (A) Die Bilder wurden mit dem Axiophot Mikroskop bei einer Vergrößerung von 1:1000 aufgenommen. Der eingezeichnete Balken entspricht einer Länge von 10  $\mu\text{m}$ . (B) Für die statistischen Analysen wurden für jeden Zeitpunkt 30 Zellen mit dem konfokalen Mikroskop LSM-510 Meta (optische Schichtdicke 1  $\mu\text{m}$ ) untersucht und mit Hilfe der Software LSM Image Browser die Durchmesser für alle Vesikel größer 2  $\mu\text{m}$  bestimmt. (C) Die Durchmesser der Vesikel (Durchmesser größer 5  $\mu\text{m}$ ) wurden ermittelt und die Werte als Boxplot dargestellt. Die Mittelwerte sind durch einen schwarzen Punkt gekennzeichnet. Werte über 15  $\mu\text{m}$  wurden als Ausreißer gewertet und mit einem weißen Kreis gekennzeichnet.

Um festzustellen, ob die gB induzierten morphologischen Veränderungen einen zytotoxischen Effekt haben, wurde der Einfluss der gB Expression in verschiedenen Zelllinien auf die Anzahl der toten Zellen untersucht (Abb. 5). Dazu wurden IMR90S Zellen entweder mit einem GFP-Vektor oder einem Vektor transfiziert, der für gB und

GFP unter dem gleichen Promoter codiert (gB / GFP). Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit Propidium-Iodid (PI) inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Für die Messung wurden ausschließlich GFP positive Zellen untersucht. Propidium-Iodid interkaliert mit der DNA und färbt Zellen mit perforierter Zellmembran an. In den Dot Plots (Abb. 5A) wurde die Fluoreszenzintensität der PI Färbung in GFP oder gB / GFP positiven Zellen IMR90S Zellen bestimmt. Der überwiegende Teil der GFP positiven Zellen besitzt eine intakte Plasmamembran und ist somit PI negativ. Bei der Population im eingezeichneten Quadranten handelt es sich um PI positive Zellen.

Der Versuch wurde wie oben beschrieben für IMR90S Zellen und die Affennierenzelllinie COS-7 durchgeführt und der relative Anteil PI positiver Zellen graphisch dargestellt (Abb. 5B). In gB und GFP exprimierenden IMR90S und COS-7 Zellen liegt der Anteil der toten Zellen bei 8 - 10 % und bei GFP exprimierenden Zellen bei 5 - 6 %.

Um zu untersuchen, ob die gB Expression einen langfristigen zytotoxischen Effekt hat, wurden die humane Melanomzelllinie Mel JuSo und die stabile Mel JuSo gB Zelllinie mit PI gefärbt, im Durchflusszytometer untersucht und der relative Anteil PI positiver Zellen ermittelt (Abb. 5C). Die Zytotoxizität der Mel JuSo gB Zellen ist im Vergleich zu untransfizierten Mel JuSo Zellen von durchschnittlich 6 % auf 9 % erhöht. Insgesamt liegt der Anteil von PI positiven Zellen je nach verwendeter Zelllinie in Abwesenheit von gB bei etwa 6 % und bei gB Expression bei 8 - 10 %. Die transiente und stabile Expression von gB in Zellen hat folglich nur einen geringen zytotoxischen Effekt.



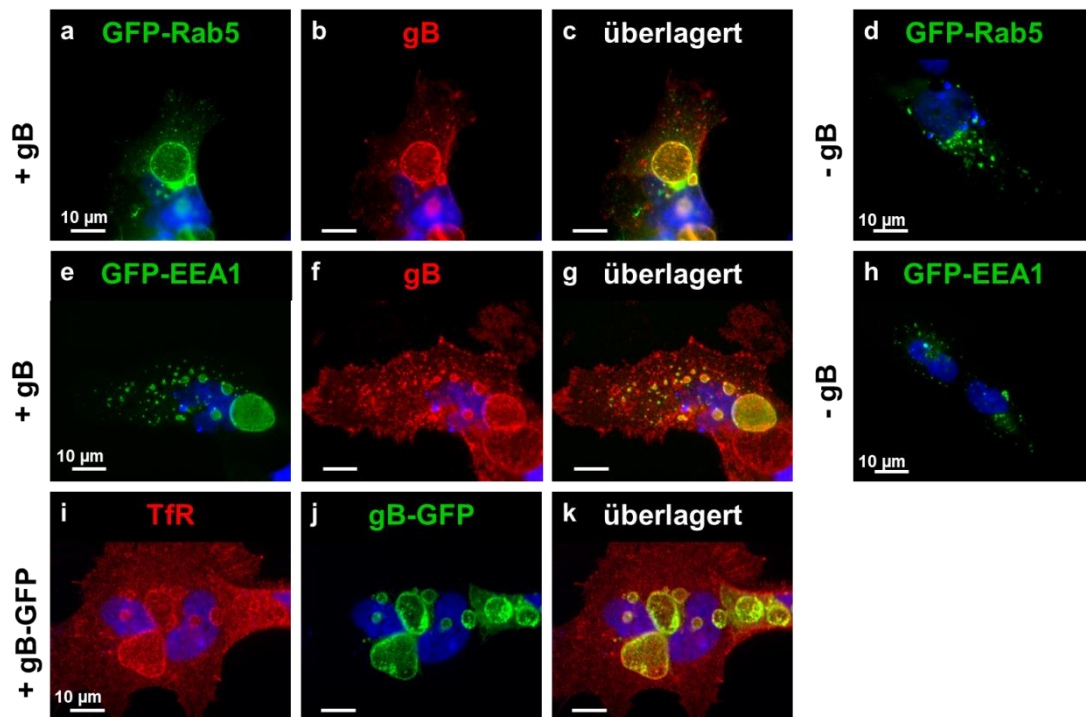
**Abb. 5: Einfluss der Expression von HSV-1 gB auf die Lebendzellzahl.** (A) IMR90S Zellen, die GFP oder gB und GFP exprimieren, wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und für eine halbe Stunde mit Propidium-Iodid (PI) gefärbt. Die Zellen wurden im Durchflusszytometer untersucht und GFP positive Zellen für die weiteren Analysen ausgewählt. Die Fluoreszenz im FL-3 Kanal wurde gegen den SSC aufgetragen. Die PI positiven Zellen befinden sich im eingezeichneten Quadranten. Die gezeigten Daten wurden exemplarisch aus drei unabhängigen Versuchen ausgewählt. (B) GFP und gB / GFP transfizierte IMR90S und COS-7 Zellen wurden wie unter (A) ausgeführt analysiert und der prozentuale Anteil GFP und PI positiver Zellen bestimmt. (C) Mel JuSo Zellen ("untr.") und stabile Mel JuSo gB Zellen ("gB stabil") wurden mit PI gefärbt, im Durchflusszytometer untersucht und der Anteil PI positiver Zellen bestimmt. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

### 3.1.2 stark vergrößerte gB induzierte Vesikel kofärben mit frühendosomalen Markern

Das Glykoprotein B zeigt eine Kollokalisierung mit dem spätendosomalen Marker CD63 in moderat vergrößerten Vesikeln in Mel JuSo Zellen (Temme et al. 2010). Die Ergebnisse von Bocuk (Diplomarbeit, 2012) legen nahe, dass die nach gB Transfektion auftretenden, stark vergrößerten Vesikel ebenfalls endosomalen Ursprungs sind. Es wurde untersucht, ob stark und weniger stark vergrößerte gB induzierte Vesikel mit endosomalen Markern kofärben. Die Kollokalisierung von gB mit den frühendosomalen Markern Rab5, EEA1 und Transferrin-Rezeptor (TfR) ist in Abbildung 6 dargestellt. EEA1 und Rab5 sind auf frühen Endosomen zu finden und spielen eine Rolle bei der Fusion frühendosomaler Membranen (Ohya et al. 2009).



IMR90S Zellen wurden mit gB und GFP-Rab5 (Abb. 6, a-c) oder GFP-EEA1 (e-g) kotransfiziert und mit gB-spezifischem Primärantikörper und fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper (rot) angefärbt. In der limitierenden Membran gB positiver Vesikel (rot) zeigt sich eine deutliche Kofärbung mit GFP-Rab5 (grün; Abb. 6, c). Bei der Expression von gB (rot) mit GFP-EEA1 (grün) zeigt sich ebenfalls eine deutliche Kolorisation in den stark vergrößerten Vesikeln, wobei GFP-EEA1 auch das Vesikellumen gleichmäßig anfärbt (Abb. 6, g). In der unteren, rechten Ecke des Bildes (g) ist eine Zelle zu sehen, die zwar gB aber nicht GFP-EEA1 transfiziert ist und ebenfalls vergrößerte Vesikel bildet. Einzeltransfektionen mit GFP-Rab5 (d) oder GFP-EEA1 (h) führen nicht zur Bildung deutlich vergrößerter Vesikel.



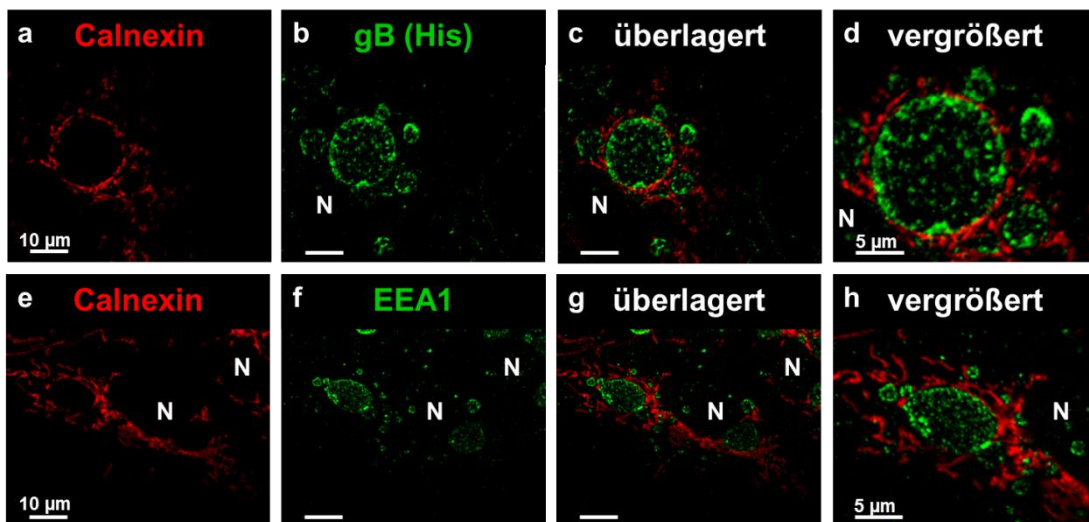
**Abb. 6: Kofärbung gB exprimierender Zellen mit frühendosomalen Markern.** IMR90S Zellen wurden mit gB und GFP-Rab5 (a-c) oder GFP-EEA1 (e-g) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert und gB mit *2c/2 mAb* und anti-Maus-Alexa594 (rot) angefärbt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit GFP-Rab5 (d) oder GFP-EEA1 (h) transfiziert wurden. (i-k): gB-GFP transfizierte IMR90S Zellen wurden mit dem Transferrin-Rezeptor (TfR)-spezifischen Antikörper *PA-1* und anti-Maus-Alexa594 Sekundärantikörper gefärbt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Die Aufnahmen wurden mit dem Axiophot Mikroskop bei einer Vergrößerung von 1:1000 aufgenommen. Die Länge des Balkens entspricht 10 µm.

Der Transferrin-Rezeptor (TfR) vermittelt den Transport des Eisen-bindenden Proteins Transferrin vom Extrazellulärraum in Endosomen und ist auf der Plasmamembran, in frühen Endosomen und in Recycling-Endosomen zu finden (Mayle et al. 2012). In

gB-GFP (grün) transfizierten IMR90S Zellen wurde endogener Transferrin-Rezeptor (rot) immunfluoreszenzgefärbt. Der TfR ist deutlich in stark vergrößerten gB positiven Vesikeln zu finden (Abb. 6, i-k). Die Kofärbung von gB mit mehreren frühendosomalen Markern zeigt, dass es sich bei den stark vergrößerten gB induzierten Vesikeln um Strukturen frühendosomalen Ursprungs handelt.

### 3.1.3 Kofärbung von gB mit Calnexin

Um festzustellen, ob ER-Membranen an der Bildung stark vergrößerter Vesikel beteiligt sind, wurde die Kolokalisation von gB mit dem im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierten Chaperon Calnexin untersucht (Abb. 7). gB transfizierte IMR90S Zellen wurden mit anti-His-Antikörper (gegen den His-Tag von gB, grün) und Calnexin-spezifischem Antikörper (rot) immunfluoreszenzgefärbt und mit dem LSM-510 Meta Mikroskop untersucht (Abb. 7, a-d). Als zusätzliche Kontrolle wurden gB transfizierte IMR90S Zellen mit EEA1-spezifischem (grün) und Calnexin-spezifischem Antikörper (rot) immunfluoreszenzgefärbt (Abb. 7, e-h).



**Abb. 7: Kofärbung von gB mit Calnexin.** Die Immunfluoreszenzfärbung gB transfizierter IMR90S Zellen erfolgte mittels Calnexin-spezifischem Antikörper / anti-Maus-Alexa594 (rot) und anti-His-Antikörper (gB besitzt einen His-Tag) / anti-Kaninchen-Alexa488 (grün, a-d) oder mit Calnexin-spezifischem Antikörper / anti-Maus-Alexa594 und anti-EEA1-Antikörper / anti-Kaninchen-Alexa488 (e-h). Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop LSM-510 Meta aufgenommen (Vergrößerung von 1:1000, optische Schichtdicke 1 μm). Die Positionen der Zellkerne sind mit N gekennzeichnet. Die Länge der Balken entspricht 10 μm und im vergrößert dargestellten Ausschnitt 5 μm.

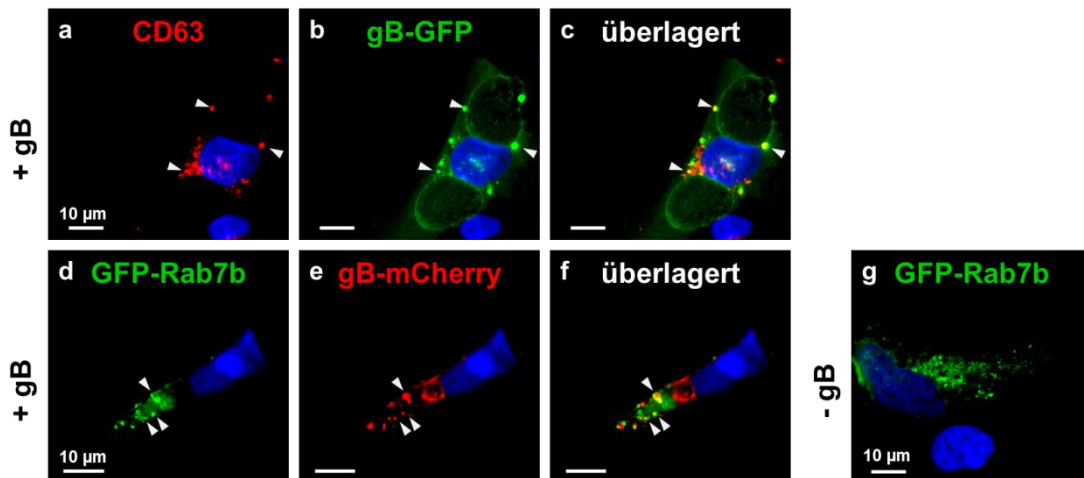
Die Vergrößerung (Abb. 7, d) zeigt, dass zwischen gB und Calnexin keine Kolokalisation zu beobachten ist, obwohl es sich bei beiden Proteinen um

Membranproteine handelt. Auch zwischen EEA1 und Calnexin gibt es keine Kolokalisation (h). Die Bildung stark vergrößerter gB induzierter Vesikel erfolgt ohne Beteiligung der ER-Membran.

### **3.1.4 gB induzierte leicht vergrößerte Vesikel kolokalisieren mit spätendosomalen Markern**

Ein Teil der in Mel JuSo nach gB Transfektion gebildeten, vergrößerten Vesikel ist spätendosomalen Ursprungs (Temme et al. 2010). Um mögliche Unterschiede zwischen den zuvor gezeigten großen gB induzierten Vesikeln und den von Temme beschriebenen Vesikeln zu untersuchen, wurde gB mit den spätendosomalen Markern CD63 und Rab7b kofärbt (Abb. 8). Dazu wurden IMR90S Zellen mit gB-GFP transfiziert und endogenes CD63 mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht (rot; Abb. 8, a-c). CD63 kolokalisiert mit gB in leicht vergrößerten Vesikeln (weiße Pfeile), jedoch nicht in stark vergrößerten Vesikeln.

Außerdem wurden IMR90S Zellen mit gB-mCherry (rot) und GFP-Rab7b (grün) kotransfiziert (Abb. 8, d-g). Auch GFP-Rab7b kolokalisiert mit gB in leicht vergrößerten Vesikeln (weiße Pfeile). Es kommt zu keiner Kolokalisation in moderat vergrößerten Vesikeln. Aufgrund der GFP-Rab7b Überexpression kommt es zu einer leichten zytoplasmatischen Färbung und die Durchmesser der stark vergrößerten Vesikel sind geringer als bei der Einzeltransfektion mit gB-GFP. Eine Kontrolltransfektion mit GFP-Rab7b zeigt, dass GFP-Rab7b keine Bildung moderat vergrößerter Vesikel induzieren kann (Abb. 8, g). Es lassen sich zwei Populationen gB induzierter Vesikel unterscheiden: leicht vergrößerte Vesikel spätendosomalen Ursprungs (Abb. 8) und stark vergrößerte Vesikel frühendosomalen Ursprungs (vgl. Abb. 6).



**Abb. 8: Lokalisation von gB induzierten Vesikeln und spätendosomalen Markern.** In gB-GFP transfizierten IMR90S Zellen wurde mittels CD63-spezifischem Antikörper und anti-Maus-Alexa594 (rot) das endogene CD63 angefärbt (a-c). IMR90S Zellen wurden mit gB-mCherry und GFP-Rab7 transfiziert (d-f). GFP-Rab7b transfizierte IMR90S Zellen dienen als Negativkontrolle (g). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Vesikel, in denen eine Kolokalisation der spätendosomalen Marker mit gB zu sehen ist, wurden exemplarisch durch weiße Pfeile gekennzeichnet. Die Aufnahmen wurden mit dem Axiophot Mikroskop bei einer Vergrößerung von 1:1000 aufgenommen. Die Länge des Balkens entspricht 10 µm.

### 3.1.5 Der PI3P-Kinaseinhibitor Wortmannin hemmt die gB induzierte Vesikelbildung

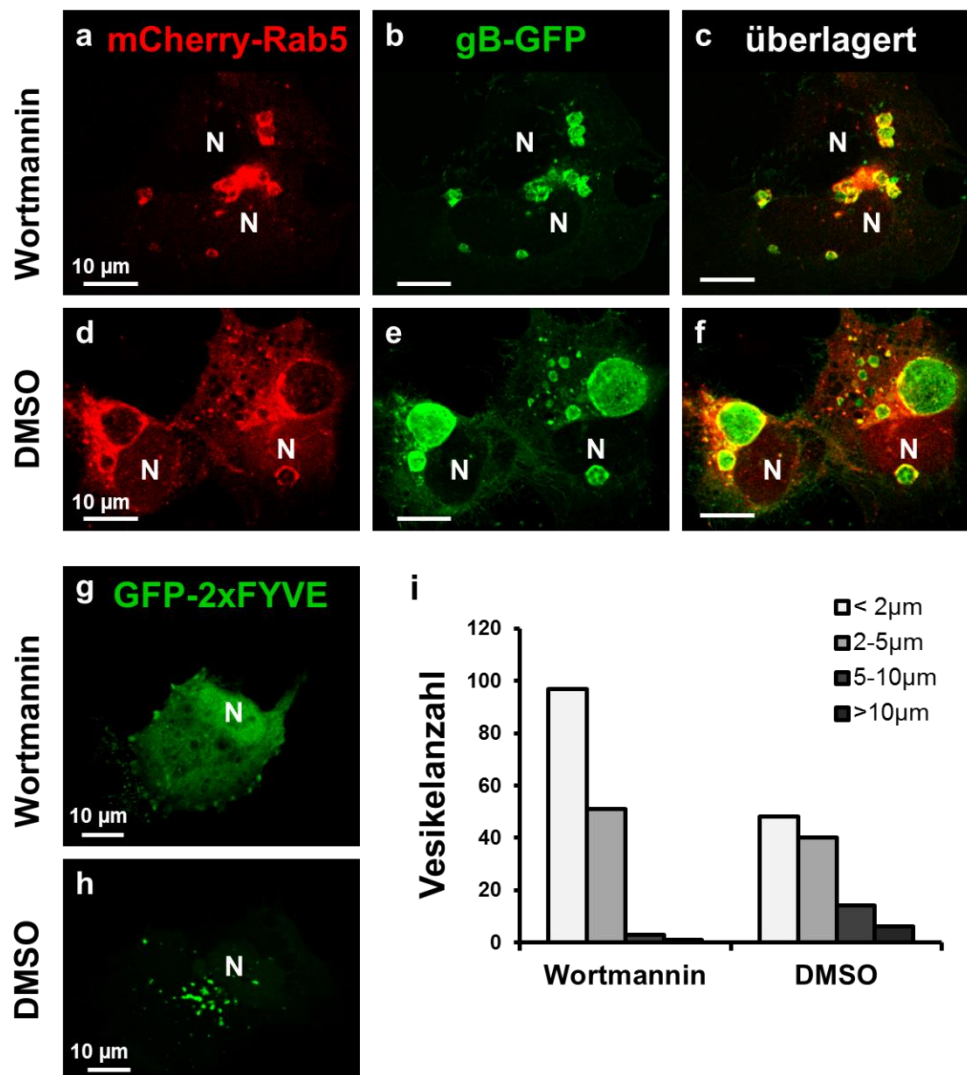
Die Wirkung von Inhibitoren der frühendosomalen Vesikelvergrößerung lässt sich in IMR90S Zellen durch eine Veränderung der Vesikelgröße direkt erkennen und erlaubt Rückschlüsse auf den der Vesikelvergrößerung zu Grunde liegenden Mechanismus. Die Bildung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) durch PI3-Kinasen ist, neben aktivem Rab5, essentiell für die durch Rab5 und EEA1 vermittelte Vesikelfusion. PI3P kann durch EEA1 und andere Proteine mit FYVE Domäne spezifisch gebunden werden und vermittelt die Rekrutierung dieser Proteine zur frühendosomalen Membran (Christoforidis et al. 1999; Shin et al. 2005).

Um zu testen, ob die gB induzierte Vesikelvergrößerung PI3P abhängig ist, wurden IMR90S Zellen mit mCherry-Rab5 und gB-GFP transfiziert und 19 h nach der Transfektion für fünf Stunden mit dem PI3-Kinaseinhibitor Wortmannin behandelt (Abb. 9, a-c). Dabei dienten DMSO behandelte Zellen als Negativkontrolle (Abb. 9, d-f). Nach der Wortmanninbehandlung sind die Durchmesser gB-GFP und mCherry-Rab5 positiver Vesikel im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen deutlich verringert (Abb. 9, c, f). Weil es sich bei den nach der Behandlung mit Wortmannin auftretenden, leicht vergrößerten Vesikeln um Rab5 positive Vesikel frühendosomalen Ursprungs handelt, ist davon auszugehen, dass die Verringerung der

Vesikeldurchmesser auf die Inhibition durch Wortmannin zurückzuführen ist. GFP-2xFYVE transfizierte IMR90S Zellen wurden als Positivkontrolle verwendet, da bei erfolgreicher Inhibition der PI3-Kinasen durch Wortmannin kein PI3P gebildet wird, sodass das GFP-2xFYVE nicht an die frühendosomale Membran binden kann und zytosolisch vorliegt (Abb. 9, g, h).

Um den Effekt der Behandlung mit Wortmannin zu quantifizieren, wurden für jeweils zehn Wortmannin oder DMSO behandelte Zellen die Anzahl und die Durchmesser mCherry-Rab5 und gB-GFP positiver Vesikel bestimmt (Abb. 9, i). Nach Wortmanninbehandlung ist die Anzahl der gB-GFP und mCherry-Rab5 positiven Vesikel mit einem Durchmesser größer 5  $\mu\text{m}$  im Vergleich zur DMSO-Kontrolle stark reduziert. Die Mehrzahl der Vesikel hat nach Wortmanninbehandlung einen Durchmesser von unter 2  $\mu\text{m}$ . Der Größenunterschied zwischen den Vesikeln in DMSO und in Wortmannin behandelten Zellen ist signifikant ( $p < 0,0001$ ).

In DMSO behandelten Zellen gibt es weniger Vesikel mit Durchmessern unter 2  $\mu\text{m}$  als in Wortmannin behandelten Zellen, was ebenfalls dafür spricht, dass die stark vergrößerten Vesikel durch eine PI3P abhängige Fusion aus kleineren mCherry-Rab5 und gB-GFP positiven Vesikeln entstehen. Die durch gB induzierte Vesikelfusion ist also Wortmannin sensitiv und damit abhängig von der Bildung von PI3P.



**Abb. 9: Behandlung gB transfizierter Zellen mit dem PI3-Kinaseinhibitor Wortmannin.** 19 h nach der Transfektion mit mCherry-Rab5 und gB-GFP wurden IMR90S Zellen für 5 h mit dem PI3-Kinaseinhibitor Wortmannin gelöst in DMSO inkubiert (Endkonzentration 1 µM), wobei das Medium aufgrund der geringen Halbwertszeit von Wortmannin alle halbe Stunde gewechselt wurde (a-c). DMSO behandelte Zellen dienen als Negativkontrolle (d-f). Als Kontrolle für die Wirkung von Wortmannin wurden GFP-2xFYVE transfizierte IMR90S Zellen verwendet (g, h). Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des LSM-510 Meta Mikroskops aufgenommen (Vergrößerung 1:1000, optische Schichtdicke 1 µm). Die Positionen der Zellkerne wurden mit N markiert, die Länge der Balken entspricht 10 µm. (i): Die Anzahl und Durchmesser der Vesikel aus jeweils 10 Wortmannin oder DMSO behandelten Zellen wurden bestimmt und die Gesamtanzahl der Vesikel graphisch dargestellt.

## 3.2 Die Rolle zytoplasmatischer Transportmotive im endosomalen Transport

Das Glykoprotein B besteht aus einer großen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. Die Aminosäuresequenz des zytoplasmatischen Teils von gB ist in Abbildung 10 dargestellt (erste Zeile). Sie enthält mehrere Signalmotive, die sowohl innerhalb der HSV-1 Stämme als auch verschiedener Herpesviridae konserviert sind. Dabei handelt es sich um zwei Tyrosin-basierte Motive (<sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup> und <sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup>) und ein Di-Leucin Motiv (<sup>871</sup>LL<sup>872</sup>) (Beitia Ortiz de Zarate et al. 2004).

```

gB (904 aa)      -YVMRLQSNPMKALYPLTTKELKNPTNPDASGEEGEGDFDEAKLAEAREMIR849YMAL852VSAMERTEHKAKKGGTSALLSAKVTDMVMRKRRTN889YTQV892PNKDGDADEDDL
gBΔ895-904      -YVMRLQSNPMKALYPLTTKELKNPTNPDASGEEGEGDFDEAKLAEAREMIR849YMAL852VSAMERTEHKAKKGGTSALLSAKVTDMVMRKRRTN889YTQV892PN - V5-Tag
gBΔ889-904      -YVMRLQSNPMKALYPLTTKELKNPTNPDASGEEGEGDFDEAKLAEAREMIR849YMAL852VSAMERTEHKAKKGGTSALLSAKVTDMVMRKRRTN - V5-Tag
gBΔ877-904      -YVMRLQSNPMKALYPLTTKELKNPTNPDASGEEGEGDFDEAKLAEAREMIR849YMAL852VSAMERTEHKAKKGGTSALLSAKV - V5-Tag
gBΔ855-904      -YVMRLQSNPMKALYPLTTKELKNPTNPDASGEEGEGDFDEAKLAEAREMIR849YMAL852VS - V5-Tag
gBΔ805-904      -YVMRLQSN - V5-Tag
gB804-YMAL      -YVMRLQSN849YMAL852 - V5-Tag

```

**Abb. 10: Sequenzen der zytoplasmatischen Domänen von gB-Deletionsmutanten.** Die Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne von gB (erste Reihe) enthält drei Signalmotive: ein Di-Leucin Motiv (blau) und zwei Tyrosin-basierte Motive (grün und rot). Der zytoplasmatische Teil von gB wurde sukzessive deletiert (zweite bis sechste Reihe). Zusätzlich wurde ein Konstrukt kloniert, bei dem sich das Tyrosin-basierte Motiv YMAL direkt hinter den ersten acht Aminosäuren des zytoplasmatischen Teils befindet (siebte Reihe).

### 3.2.1 Das YMAL Motiv wirkt als ER-Exportsignal

Um die Rolle der zytoplasmatischen Signalmotive beim endosomalen Transport von gB genauer zu untersuchen, wurden zytoplasmatische Deletionskonstrukte hergestellt, bei denen ein oder mehrere Signalmotive deletiert wurden (Abb. 10, Zeile 2 - 6). Beim gBΔ895-904 (Zeile 2) fehlen die letzten zehn Aminosäuren, während alle drei Signalmotive noch vorhanden sind. Die Deletionskonstrukte gBΔ889-904 und gBΔ877-904 (Zeile 3 - 4) enthalten das <sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup> und das Di-Leucin Motiv, wobei das gBΔ889-904 direkt vor dem <sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup> Motiv deletiert und das gBΔ877-904 wenige Aminosäuren nach dem <sup>871</sup>LL<sup>872</sup> verkürzt wurde. Das gBΔ855-904 Konstrukt (Zeile 5) enthält ausschließlich das <sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup> Motiv und zur Herstellung des gBΔ805-904 Konstrukts (Zeile 6) wurde der komplette zytoplasmatische Teil bis auf acht Aminosäuren deletiert. Mit Hilfe des gB804-YMAL Konstrukts (Abb. 10, Zeile 7), bei dem der zytoplasmatische Teil bis auf acht

Aminosäuren deletiert und das YMAL Motiv angehängt wurde, sollte die Funktion des YMAL Motivs untersucht werden.

Um festzustellen, ob alle Konstrukte exprimiert und aus dem Golgi transportiert werden, wurden eine Reihe von Glykosidase Verdauen durchgeführt (Abb. 11A). Export- und Membranproteine werden glykosyliert, wobei es durch die Aktivität der Golgi-Mannosidase II zu einer Resistenz N-glykosylierter Proteine gegenüber einem EndoGlykosidase H (Endo H) Verdau kommt. Die Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) hingegen kann weitgehend alle Oligosaccharide von N-glykosylierten Proteinen abspalten, sodass weitestgehend deglykosylierte Proteine entstehen.

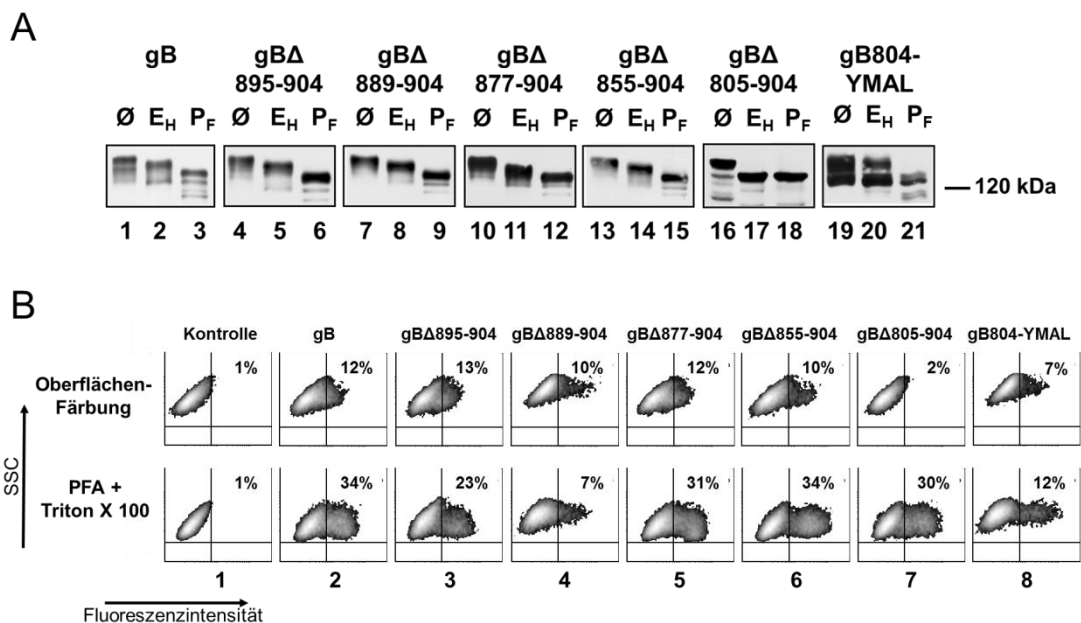
IMR90S Zellen wurden mit gB oder gB-Deletionskonstrukten transfiziert und ein Endo H Verdau der Zelllysate durchgeführt (Abb. 11A). Als Referenz dienen zum einen unverdaute Proben und zum anderen Proben, die mit PNGase F verdaut wurden. Die Größenunterschiede zwischen verdauten und unverdauten Proben werden mittels Auftrennung durch SDS-PAGE und anschließender Immundetektion der Deletionskonstrukte sichtbar gemacht (siehe Abschnitt 2.5).

Alle Deletionskonstrukte lassen sich in IMR90S Zellen exprimieren (Abb. 11A Probe 4, 7, 10, 13, 16 und 19). Der Endo H Verdau von gB (Abb. 11A, Spalte 2) zeigt im Vergleich zur unverdauten Probe (Spalte 1) eine Verschiebung der Bande nach unten, liegt jedoch höher als die PNGase F verdauten Bande (Spalte 3). gB ist partiell sensitiv gegenüber einem Endo H Verdau, das bedeutet, dass ein Teil der N-glykosylierten Zuckerketten während der Reifung nicht durch die Golgi-Mannosidase II modifiziert wird. Auch die Deletionskonstrukte gB $\Delta$ 895-904 (Spalte 4 - 6), gB $\Delta$ 889-904 (Spalte 7 - 9), gB $\Delta$ 877-904 (Spalte 10 - 12) und gB $\Delta$ 855-904 (Spalte 13 - 15) sind partiell sensitiv gegenüber einem Endo H Verdau, werden also zum Golgi exportiert. Bei Konstrukt gB $\Delta$ 805-904 (Spalte 16 - 18), bei welchem die zytoplasmatische Domäne fast vollständig deletiert wurde, befinden sich Endo H verdaute (Spalte 17) und PNGase F verdaute Bande (Spalte 18) auf gleicher Höhe. Das Konstrukt ist somit Endo H sensitiv. Das gB804-YMAL Konstrukt, das sich von dem gB $\Delta$ 805-904 Konstrukt nur durch das angehängte YMAL Motiv unterscheidet, ist partiell Endo H resistent (Spalte 19 - 21). Es konnte folglich gezeigt werden, dass das YMAL Motiv als ER-Exportsignal wirkt.

Nach dem Export aus dem Trans-Golgi-Netzwerk erfolgt der Transport von Membranproteinen zur Zelloberfläche, ohne dass weitere Signalmotive notwendig sind (Pfeffer und Rothman 1987). Um die Oberflächenexpression der Deletionskonstrukte zu ermitteln, wurden IMR90S Zellen mit gB oder



gB-Deletionskonstrukten transfiziert, eine Oberflächenfärbung durchgeführt und die Proben im Durchflusszytometer analysiert (Abb. 11B, erste Zeile). Ein Teil der Proben wurde zur Kontrolle der Transfektion vor der Färbung fixiert und permeabilisiert (zweite Zeile). Sowohl gB als auch die Deletionskonstrukte gB $\Delta$ 895-904, gB $\Delta$ 889-904, gB $\Delta$ 877-904 und gB $\Delta$ 855-904, die alle das YMAL Motiv enthalten, werden auf der Oberfläche exprimiert (Abb. 11B, Spalte 2 - 6). Das gB $\Delta$ 805-904 Konstrukt (Spalte 7) wird zwar in den transfizierten Zellen exprimiert (zweite Zeile), zeigt jedoch keine Oberflächenexpression (erste Zeile). Das gB804-YMAL hingegen wird auf der Oberfläche exprimiert (Spalte 8). Das YMAL Motiv vermittelt den ER-Export und den Transport des gB zur Plasmamembran.



**Abb. 11: Expression von gB-Deletionsmutanten.** (A) IMR90S Zellen wurden mit gB (1 - 3), oder den C-terminalen Deletionskonstrukten gB $\Delta$ 895-904 (4 - 6), gB $\Delta$ 889-904 (7 - 9), gB $\Delta$ 877-904 (10 - 12), gB $\Delta$ 855-904 (13 - 15), gB $\Delta$ 805-904 (16 - 18) oder gB804-YMAL (19 - 21) transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und entweder nicht behandelt (gekennzeichnet durch  $\emptyset$ ; 1, 4, 7, 10, 13, 16 und 19), oder mit EndoGlykosidase H (gekennzeichnet durch E<sub>H</sub>; 2, 5, 8, 11, 14, 17 und 20) oder mit Peptid-N-Glykosidase F (gekennzeichnet durch P<sub>F</sub>; 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 21) verdaut und dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt. gB wurde mit Hilfe des gB-spezifischen Antikörpers 10B7 und die gB-Deletionsmutanten mit Hilfe eines anti-V5-Antikörpers angefärbt, wobei jeweils ein Maus-spezifischer HRP gekoppelter Sekundärantikörper verwendet wurde. (B) IMR90S Zellen, die gB oder gB-Deletionskonstrukte exprimieren, wurden entweder direkt (obere Reihe) oder nach Fixierung mit PFA und Permeabilisierung mit Triton X 100 (untere Reihe) mit dem gB-spezifischen 2c/2 mAb / anti-Maus-Alexa488 und Propidium-Iodid (PI) gefärbt. Die Fluoreszenzintensität im FL-1 Kanal wurde gegen den SSC aufgetragen und ein Counterplot aufgenommen. Die gezeigten Daten wurden exemplarisch aus drei unabhängigen Versuchen ausgewählt.

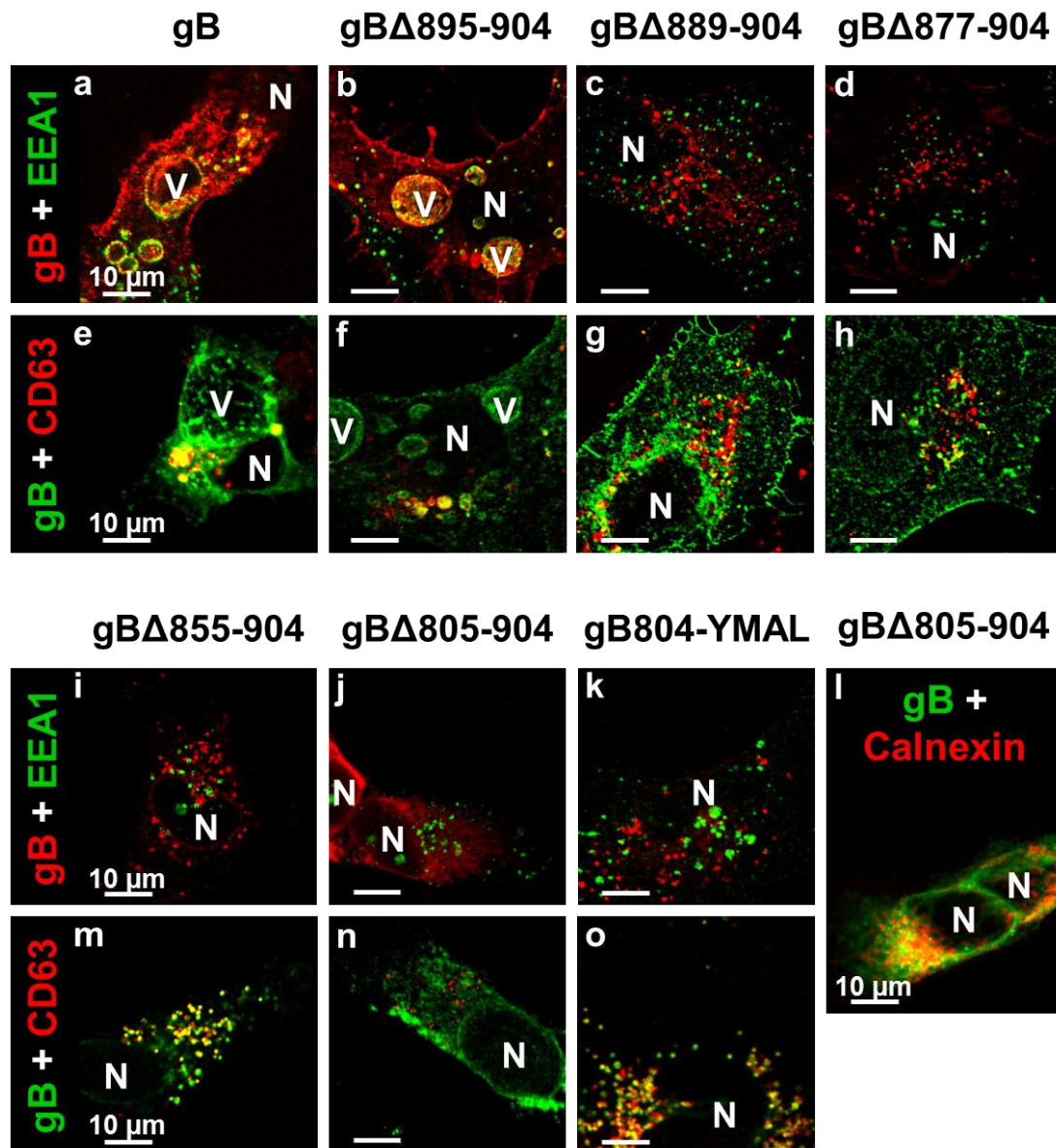
### 3.2.2 Der <sup>889</sup>YTQVPN<sup>894</sup> Sequenzbereich ist für die Lokalisation von gB im frühen Endosom erforderlich

Als nächstes wurde die Rolle der zytoplasmatischen Motive während des endosomalen Transports untersucht. Dazu wurden IMR90S Zellen mit gB oder gB-Deletionskonstrukten transfiziert, nach 48 Stunden fixiert und die gB-Konstrukte mit den Endosomenmarkern EEA1 und CD63 kofärbt und mit dem konfokalen Mikroskop LSM-510 Meta untersucht (Abb. 12). Das Deletionskonstrukt gB $\Delta$ 895-904 (b, f), bei dem nur die letzten zehn Aminosäuren fehlen, aber alle zytoplasmatischen Signalmotive vorhanden sind, zeigt eine ähnliche zelluläre Verteilung wie das Wildtyp gB (a, e): Es findet sich auf der Zelloberfläche und kolokalisiert mit dem frühendosomalen Marker EEA1 in stark vergrößerten und mit dem spätendosomalen Marker CD63 in leicht vergrößerten Vesikeln. Die beiden Konstrukte gB $\Delta$ 889-904 und gB $\Delta$ 877-904, denen das YTQV Motiv fehlt, führen weder zu einer Bildung stark vergrößerter frühendosomaler Vesikel, noch zeigen sie eine Kolokalisation mit EEA1 (c, d). Eine Kolokalisation mit dem spätendosomalen Marker CD63 konnte jedoch gezeigt werden (g, h).

Bei der Mutante, bei der zusätzlich das <sup>871</sup>LL<sup>872</sup> Motiv deletiert ist (gB $\Delta$ 877-904), zeigt sich eine vesikuläre Färbung, die mit dem spätendosomalen Marker CD63 kofärbt (m), während keine Kofärbung mit EEA1 zu beobachten ist (i).

gB $\Delta$ 805-904 zeigt keine Kolokalisation mit endosomalen Markern (j, n) und eine deutliche Kofärbung mit dem ER-Marker Calnexin (l). Ist bei diesem Deletionskonstrukt jedoch ein YMAL Motiv angehängt (gB $\Delta$ 804-YMAL), ähnelt die zelluläre Verteilung der beim gB $\Delta$ 877-904 Konstrukt beobachteten: Die Färbung ist vesikulär und die Vesikel sind CD63 positiv (k, o).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass der <sup>889</sup>YTQVPN<sup>894</sup> Sequenzbereich für die Akkumulation von gB im frühen Endosom benötigt wird. Das YMAL Motiv ist für den Transport ins späte Endosom ausreichend.

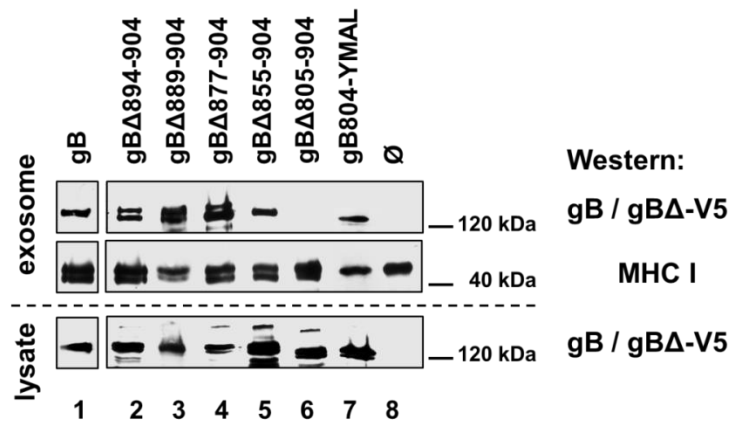


**Abb. 12: Endosomale Sortierung von gB-Deletionskonstrukten in Abhängigkeit von vorhandenen Signalsequenzen.** IMR90S Zellen wurden mit gB oder den C-terminalen Deletionskonstrukten gB $\Delta$ 895-904, gB $\Delta$ 889-904, gB $\Delta$ 877-904, gB $\Delta$ 855-904, gB $\Delta$ 805-904 oder gB804-YMAL transfiziert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit 2c/2 mAb (gB) oder anti-V5-Antikörper (gB $\Delta$ ) und anti-Maus-Alexa594 (rot) sowie mit anti-EEA1-Antikörper / anti-Kaninchen-Alexa488 (grün) durchgeführt (a-d, i-k). Außerdem wurden anti-His-Antikörper / anti-Kaninchen-Alexa488 (gB und gB $\Delta$ ) und anti-CD63 / anti-Maus-Alexa594 verwendet (e-h, m-o). Mit dem gB $\Delta$ 805-904 Konstrukt transfizierte IMR90S Zellen wurden mit anti-His-Antikörper / anti-Kaninchen-Alexa488 und anti-Calnexin / anti-Maus-Alexa594 gefärbt (l). Die Zellpräparate wurden mit Hilfe des LSM-510 Meta Mikroskops bei einer Vergrößerung 1:1000 (optische Schichtdicke von 1  $\mu$ m) untersucht. Die Länge der Balken entspricht 10  $\mu$ m. In den Aufnahmen sind die Positionen der Zellkerne mit N und stark vergrößerte gB induzierte Vesikel mit V markiert.

Während der endosomalen Reifung bilden sich multivesikuläre Endosomen, wobei die Sortierung von Proteinen in intraluminale Vesikel (ILVs) spezifisch erfolgt (Edgar et al.

2014). Die multivesikulären Endosomen, können mit der Plasmamembran fusionieren, wobei die ILVs als Exosomen sekretiert werden (Bobrie et al. 2011). Dabei wird gB vermehrt in den exsosomaligen Weg sortiert (Temme et al. 2010).

Um zu untersuchen, welche zytoplasmatischen Signalmotive für die Sortierung in intraluminale Vesikel und die Exosomensekretion von gB eine Rolle spielen, wurden IMR90S Zellen mit gB oder gB-Deletionskonstrukten transfiziert, für drei Tage in FCS freiem Medium inkubiert und die Zellüberstände verwendet, um Exosomen zu präparieren. Die aufgereinigten Exosomen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Immundetektion untersucht (Abb. 13, Spalte 1 - 7, untransfizierte Kontrolle Spalte 8).



**Abb. 13: Nachweis von gB und gB-Deletionskonstrukten in Exosomen.** Die Exosomen wurden aus dem Zellüberstand von IMR90S Zellen isoliert, die mit gB oder den Deletionskonstrukten gB $\Delta$ 895-904, gB $\Delta$ 889-904, gB $\Delta$ 877-904, gB $\Delta$ 855-904, gB $\Delta$ 805-904 oder gB804-YMAL transfiziert wurden. Die Exosomen untransfizierter Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Zelllysate und lysierte Exosomen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über spezifische Antikörper gegen gB (10B7, Spalte 1) oder V5 (gegen den V5-Tag der Deletionskonstrukte, Spalte 2-8) nachgewiesen (erste und dritte Reihe). Der Nachweis von HLA Klasse I durch den spezifischen Antikörper HC10 dient als Kontrolle für die Exosomenpräparation (zweite Reihe).

Dazu wurden die gB-Konstrukte mittels spezifischer Antikörper in den Exosomen nachgewiesen (Abb. 13, Reihe 1). Der Nachweis von MHC I in den Exosomen dient als Kontrolle der Präparation (Reihe 2), der Nachweis der gB-Konstrukte in den zugehörigen Zelllysaten als Transfektionskontrolle (Reihe 3). Sowohl gB als auch alle Deletionskonstrukte, die das YMAL Motiv enthalten (gB $\Delta$ 895-904, gB $\Delta$ 889-904, gB $\Delta$ 877-904 und gB $\Delta$ 855-904; Abb. 13, Spalte 1 - 5), sind in den Exosomen nachweisbar, gleiches gilt für gB804-YMAL, bei dem das YMAL Motiv angehängt ist (Spalte 7). Allein das gB $\Delta$ 805-904, welches nicht aus dem ER exportiert wird, ist auch

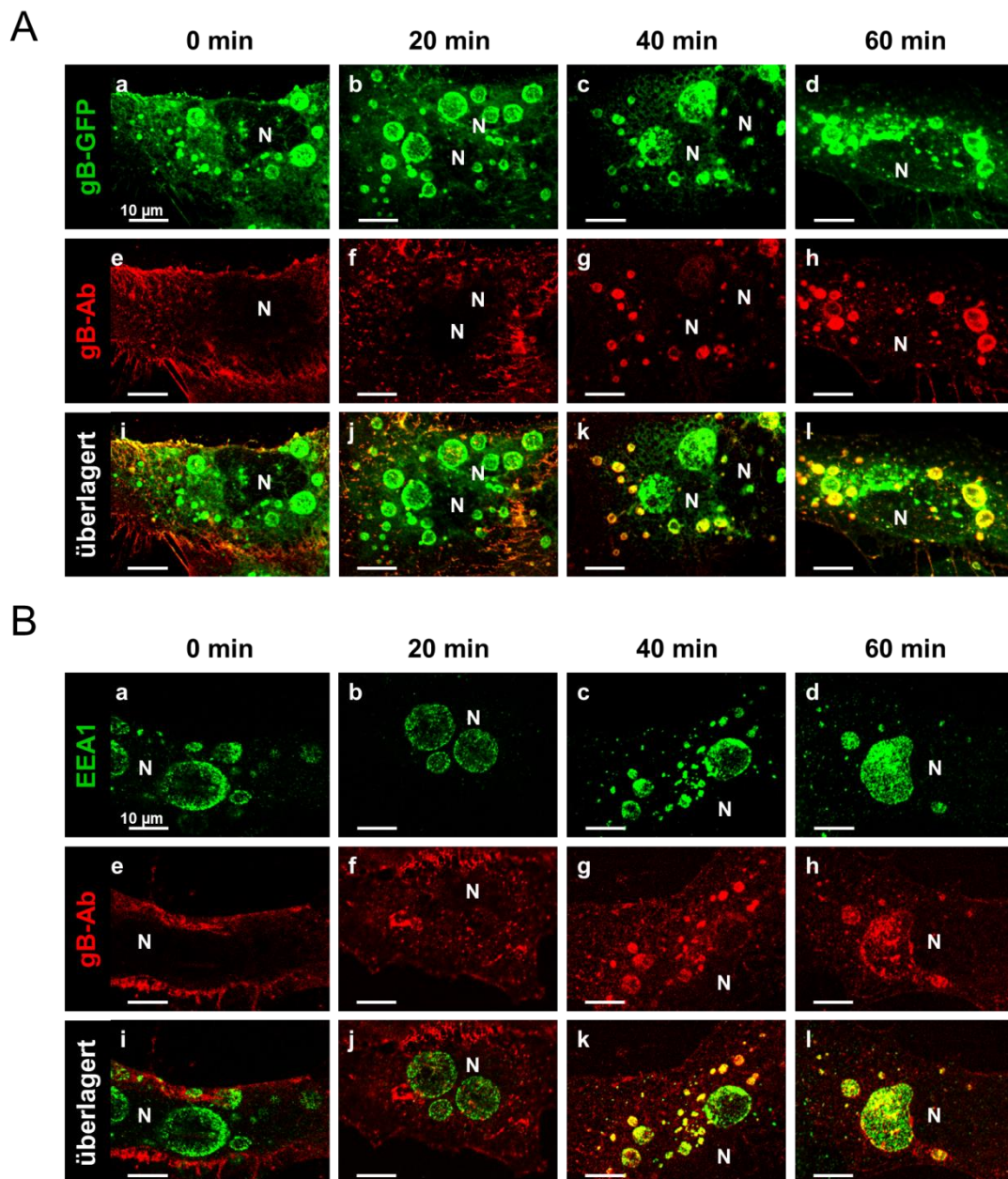
nicht in Exosomen zu finden (Spalte 6). Das YMAL Motiv ist folglich ausreichend um die Sortierung von gB in den exosomalen Weg zu gewährleisten.

### 3.2.3 Untersuchung des Transports von Antikörper gebundenem gB in frühe Endosomen nach Internalisierung

Konstrukte, denen der <sup>889</sup>YTQVPN<sup>894</sup> Sequenzbereich fehlt, zeigen eine Kolokalisation mit spätendosomalen Markern, nicht aber mit frühendosomalen Markern. Um die Rolle der Sequenz bei der Sortierung nach Internalisierung zu untersuchen, wurde zunächst der Transport von Wildtyp gB von der Zelloberfläche untersucht (Abb. 14). Dazu wurden IMR90S Zellen mit gB-GFP transfiziert (Abb. 14A) und 48 h nach der Transfektion mit dem gB-spezifischen Antikörper *2c/2 mAb* inkubiert. Anschließend wurde die Internalisierung des Antikörpers untersucht. Dazu wurden die Zellen für verschiedene Zeitspannen bei 37 °C inkubiert und dann eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (rot) durchgeführt, der den Maus *2c/2 mAb* erkennt. Während das fluoreszierende GFP-Protein das gesamte, in der Zelle exprimierte gB-GFP anfärbt (grün; Abb. 14A, a-d), wird durch die Immunfluoreszenzfärbung nur der Anteil des Proteins sichtbar, der während der Antikörper-Inkubation auf der Oberfläche exprimiert war (rot; Abb. 14A, e-h).

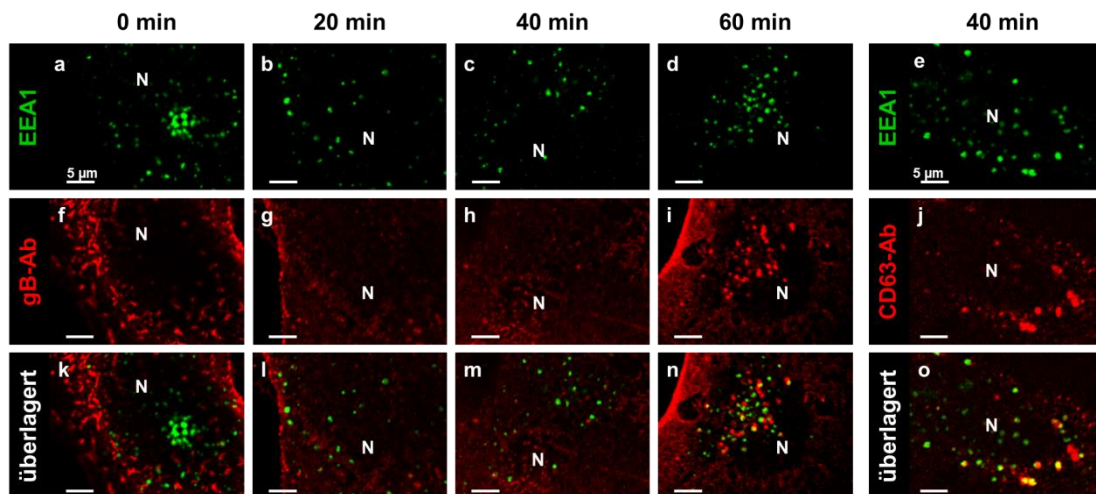
Um zu überprüfen, ob es sich bei den Vesikeln, in die gB endozytiert wird, um frühe Endosomen handelt, wurden IMR90S Zellen mit gB transfiziert und wie oben beschrieben mit *2c/2 mAb*-haltigem Medium inkubiert (Abb. 14B). Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit Antikörpern gegen endogenes EEA1 (grün; Abb. 14B, a-d) und mit einem Sekundärantikörper gegen *2c/2 mAb* (rot; Abb. 14B, e-h) durchgeführt.

Direkt nach der Inkubation mit gB-spezifischem Antikörper ist ausschließlich die Zelloberfläche angefärbt (Abb. 14A und B, 0 min). Nach 20 Minuten ist die Färbung nicht nur auf der Zelloberfläche, sondern auch in kleineren Vesikeln in der Zellperipherie zu finden (Abb. 14A und B, 20 min). Eine Kolokalisation in moderat vergrößerten, gB induzierten Vesikeln ist nach 40 Minuten zu beobachten. Nach 60 Minuten ist sie auch in stark vergrößerten Vesikeln deutlich zu sehen, wobei es sich in beiden Fällen um frühe Endosomen handelt (Abb. 14A und B, 40 min und 60 min). Die Internalisierung von gB und der anschließende Transport in stark vergrößerte EEA1 positive Vesikel ist folglich gegeben.



**Abb. 14: Internalisierung von gB gebundenem Antikörper von der Zelloberfläche in vergrößerte Endosomen.** gB transfizierte IMR90S Zellen wurden für 10 min mit dem gB-spezifischen *2c/2 mAb* Antikörper auf Eis inkubiert, gewaschen und für 0 min, 20 min, 40 min und 60 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden sie fixiert, immunfluoreszenzgefärbt und mit dem LSM-510 Meta Mikroskop untersucht (Vergrößerung 1:1000, optische Schichtdicke 1  $\mu\text{m}$ , Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ ). Die Positionen der Zellkerne ist mit N gekennzeichnet. (A) gB-GFP transfizierte IMR90S Zellen wurden nach der Internalisierung des *2c/2 mAb* mit anti-Maus-Alexa594 Sekundärantikörper (rot) angefärbt. (B) Die Färbung gB transfizierter IMR90S Zellen wurde mit anti-EEA1-Antikörper / anti-Kaninchen-Alexa488 (grün) und anti-Maus-Alexa594 Sekundärantikörper (gegen den internalisierten *2c/2 mAb*) durchgeführt.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob für den Transport von gB von der Plasmamembran ins frühe Endosom der Sequenzbereich benötigt wird, in dem das  $^{889}\text{YTQV}^{892}$  Motiv liegt (Abb. 15). Dazu wurden IMR90S Zellen mit dem gB $\Delta$ 877-904 Konstrukt transfiziert, dem das  $^{889}\text{YTQV}^{892}$  Motiv fehlt, mit *2c/2 mAb*-haltigem Medium inkubiert und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen EEA1 (grün) und *2c/2 mAb* (rot) durchgeführt. In den ersten 20 Minuten ist das gB $\Delta$ 877-904 Konstrukt nur auf der Zelloberfläche zu sehen (Abb. 15, 0 min, 20 min). Das gB $\Delta$ 877-904 Konstrukt zeigt nach 40 Minuten eine Färbung in vesikulären Strukturen und nach 60 Minuten eine Kolokalisation von gB $\Delta$ 877-904 und EEA1 (Abb. 15, 40 min und 60 min). Um zu prüfen, ob der Transport spätendosomaler Proteine über das frühe Endosom nach Internalisierung mit der verwendeten Methode nachweisbar ist, wurden untransfizierte Zellen mit Medium inkubiert, welches CD63-spezifischen Mausantikörper enthielt, und mit EEA1-spezifischen Antikörpern (grün) und Maus-spezifischem Antikörper (rot) gefärbt. Nach 40 Minuten kommt es zu einer sichtbaren Kolokalisation von internalisiertem CD63 mit EEA1 (Abb. 15; e, j, o). Die Internalisierung von gB in frühe Endosomen erfolgt auch in Abwesenheit des YTQV Motivs.



**Abb. 15: Internalisierung von gB $\Delta$ 877-904 gebundenem Antikörper von der Zelloberfläche in frühe Endosomen.** gB $\Delta$ 877-904 transfizierte IMR90S Zellen wurden für 10 min mit dem gB-spezifischen *2c/2 mAb* Mausantikörper auf Eis inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen für 0 min, 20 min, 40 min und 60 min im Brutschrank inkubiert, fixiert und immunfluoreszenzgefärbt. Als Kontrolle dienten untransfizierte IMR90S Zellen, die für 10 min mit CD63-spezifischem Mausantikörper auf Eis und anschließend 40 min im Brutschrank inkubiert wurden. In beiden Fällen erfolgte die Färbung mit anti-EEA1-Antikörper / anti-Kaninchen-Alexa488 (grün) und anti-Maus-Alexa594 Sekundärantikörper (rot). Die Bilder wurden mit dem LSM-510 Meta aufgenommen (Vergrößerung 1:1000, optische Schichtdicke 1  $\mu\text{m}$ , Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ ). Die Position der Zellkerne wurden mit N gekennzeichnet.

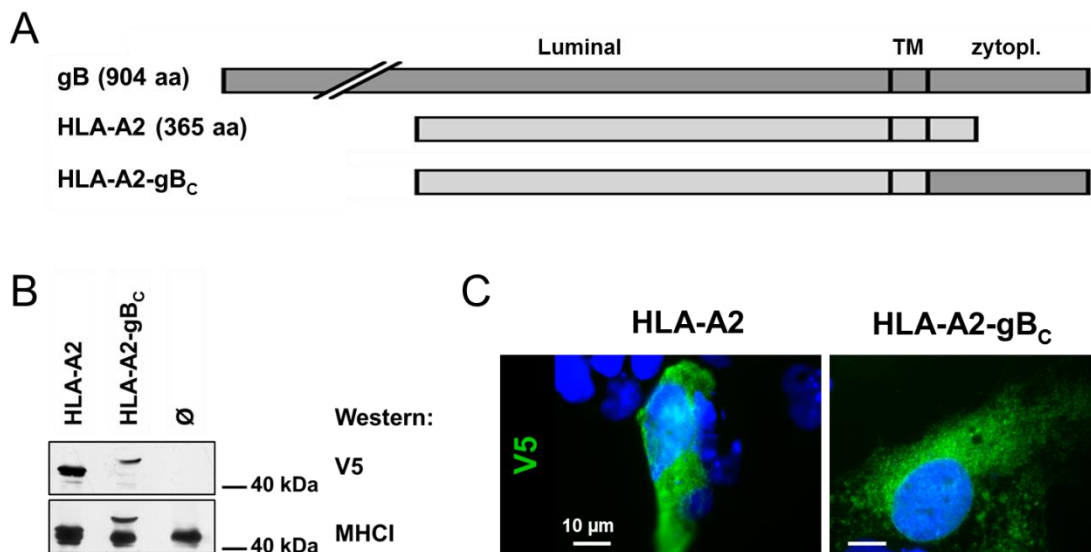
### 3.2.4 Einfluss der Trimerisierung auf den Transport von gB

Die Trimerisierung von gB wird durch zahlreiche Interaktionen der Protomere untereinander vermittelt (Heldwein et al. 2006). Die zytoplasmatische Domäne von gB liegt ebenfalls in trimerisierter Form vor, wobei die Trimerisierung durch die ersten 50 Aminosäuren der zytoplasmatischen Domäne vermittelt wird (Chowdary und Heldwein 2010). Um die Bedeutung der Trimerisierung des zytoplasmatischen Teils von gB für die Sortierung in endosomale Kompartimente genauer zu untersuchen, wurde ein Fusionsprotein aus der luminalen und der Transmembrandomäne von HLA-A2 und der zytoplasmatischen Domäne von gB hergestellt (HLA-A2-gB<sub>C</sub>; Abb. 16A). Während gB ein Homotrimer ist (Heldwein et al. 2006), besteht MHC Klasse I aus einer polymorphen, schweren Kette, die mit  $\beta_2$ -Mikroglobulin dimerisiert (Neefjes et al. 2011).

Zur Kontrolle der Expression wurden IMR90S Zellen mit HLA-A2 oder dem Fusionskonstrukt HLA-A2-gB<sub>C</sub> transfiziert, die Zelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine per Immundetektion nachgewiesen (Abb. 16B). Dabei wurde zum einen ein V5-spezifischer Antikörper (Abb. 16B, erste Reihe) und zum anderen ein MHC Klasse I-spezifischer Antikörper verwendet (Abb. 16B, zweite Reihe). Letzterer erkennt zusätzlich endogenes MHC Klasse I (untere Bande). Dadurch, dass die zytoplasmatische Domäne von gB größer ist als die von HLA-A2 (vgl. Abb. 16A zweite Zeile), lassen sich endogenes MHC Klasse I und Fusionsprotein unterscheiden.

IMR90S Zellen wurden mit HLA-A2 oder HLA-A2-gB<sub>C</sub> transfiziert und die fixierten Zellen mit anti-V5-Antikörper immunfluoreszenzgefärbt (Abb. 16C). HLA-A2 zeigt eine gleichmäßige, stellenweise leicht netzartige Verteilung über die ganze Zelle (Abb. 16C, links). Die Färbung des HLA-A2-gB<sub>C</sub> ähnelt der des HLA-A2 (Abb. 16C, rechts). Eine Bildung sichtbar vergrößerter Vesikel ist nicht erkennbar. Die monomere zytoplasmatische Domäne von gB führt zu keiner Vergrößerung endosomaler Kompartimente.

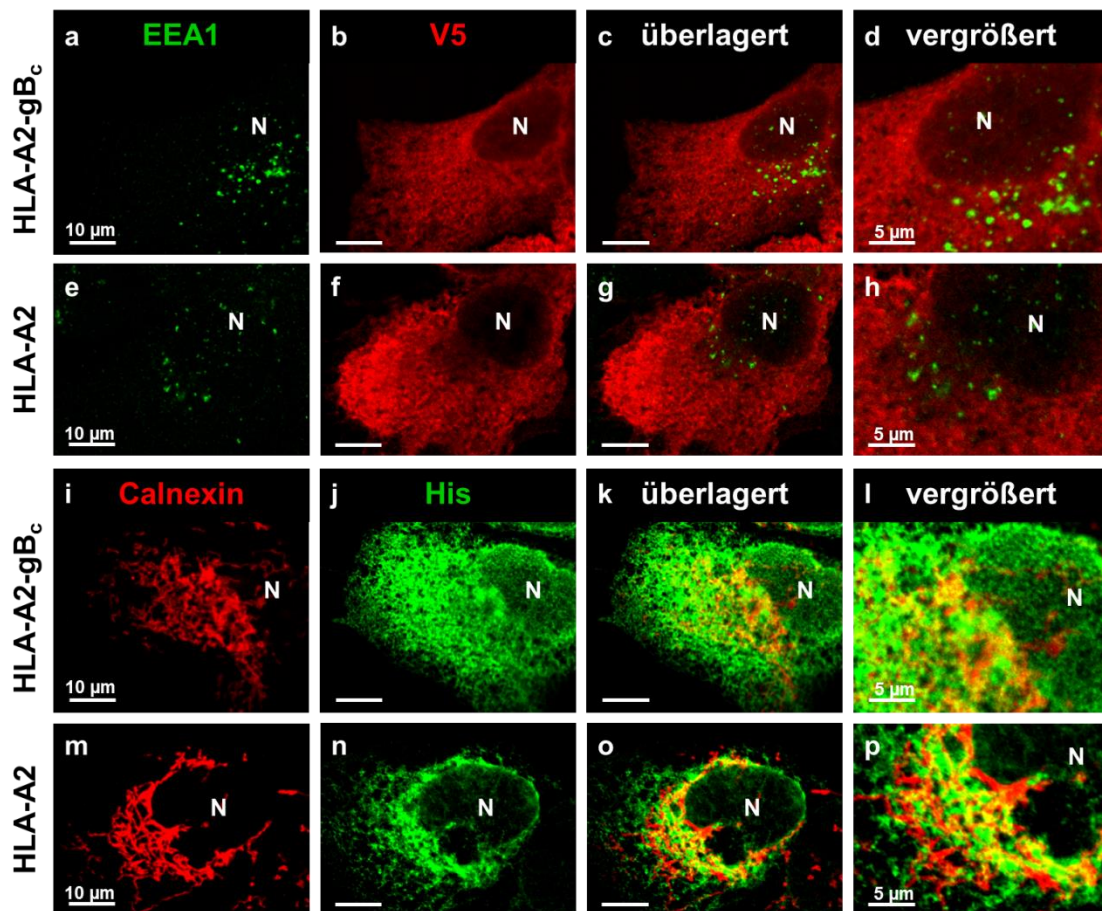




**Abb. 16: Expression eines Fusionsproteins mit der zytoplasmatischen Domäne von gB.** (A) Die Struktur eines Fusionsproteins aus gB (erste Zeile) und HLA-A2 (zweite Zeile) wurde schematisch dargestellt. Das HLA-A2-gB<sub>c</sub> Konstrukt (dritte Zeile) besteht aus der Ektodomäne ("luminal") und der Transmembrandomäne ("TM") von HLA-A2 (Aminosäure 1 - 332) und der zytoplasmatischen Domäne ("zytopl.") von gB (Aminosäure 796 - 904). (B) Die Lysate von HLA-A2 oder HLA-A2-gB<sub>c</sub> transfizierten oder untransfizierten IMR90S Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und entweder mit anti-V5-Antikörper (gegen den V5-Tag der Konstrukte; erste Reihe) oder dem MHC I-spezifischen Antikörper *HC10* (zweite Reihe) und anti-Maus-HRP angefärbt. (C) HLA-A2 oder HLA-A2-gB<sub>c</sub> transfizierte IMR90S Zellen wurden mit anti-V5-Antikörper / anti-Maus-Alexa488 (grün) fluoreszenzgefärbt, die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Bilder wurden mit dem Axiophot Mikroskop aufgenommen (Vergrößerung 1:1000, Balken entspricht 10 µm).

Um zu untersuchen, ob das Fusionsprotein ins frühe Endosom transportiert wird, wurden IMR90S Zellen mit HLA-A2 oder HLA-A2-gB<sub>c</sub> transfiziert und mit dem frühendosomalen Marker EEA1 und dem ER-Marker Calnexin angefärbt (Abb. 17). EEA1 (grün) und HLA-A2-gB<sub>c</sub> (rot) zeigen keine Kofärbung in EEA positiven Vesikeln (Abb. 17, a-d). Die Kontrollfärbungen mit HLA-A2 transfizierten IMR90S Zellen zeigt ebenfalls keine Kolokalisation mit EEA1 (Abb. 17, e-h). Mit dem ER-Marker Calnexin kolokalisieren sowohl HLA-A2-gB<sub>c</sub> (i-l) als auch HLA-A2 (m-p).

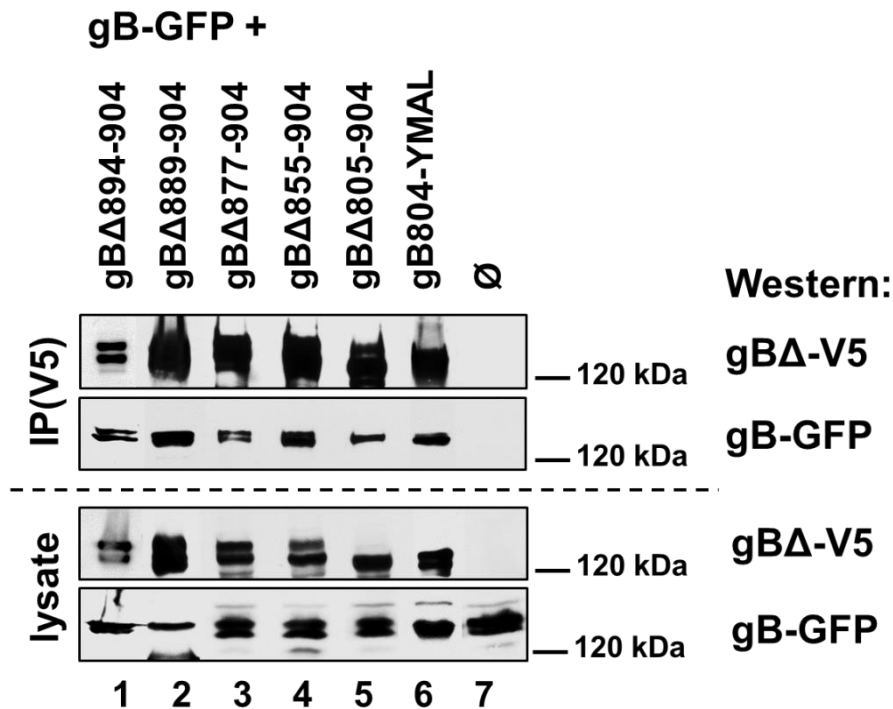
HLA-A2-gB<sub>c</sub> zeigt trotz des angehängten zytoplasmatischen Teils von gB keine Kofärbung mit EEA1, sondern kolokalisiert wie HLA-A2 deutlich mit dem ER-Marker Calnexin. Monomere der zytoplasmatischen Domäne von gB reichen folglich nicht für die Bildung stark vergrößerter Vesikel aus.



**Abb. 17: Kofärbung des HLA-A2-gB<sub>c</sub> Fusionsproteins mit EEA1 und Calnexin.** Nach der Transfektion mit HLA-A2-gB<sub>c</sub> (a-d, i-l) oder HLA-A2 (e-h, m-p) wurden IMR90S Zellen für die Immunfluoreszenz gefärbt. Für die Färbung wurden anti-EEA1 Antikörper / anti-Kaninchen-Alexa-488 (grün) und anti-V5-Antikörper (gegen den V5-Tag der Konstrukte) / anti-Maus-Alexa594 (rot) verwendet (a-h). Außerdem wurde eine Färbung mit anti-His-Antikörper (gegen den His-Tag der Konstrukte) und anti-Kaninchen-Alexa488 (grün) und anti-Calnexin / anti-Maus-Alexa594 (rot, i-p) durchgeführt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Die Aufnahmen wurden mit dem LSM-510 Meta Mikroskop aufgenommen (Vergrößerung 1:1000, optische Schichtdicke von 1 μm). Die Positionen der Zellkerne wurden mit N gekennzeichnet, Die Länge des Balkens entspricht 10 μm und im vergrößert dargestellten Bildausschnitt 5 μm.

Um die Rolle der Trimerisierung genauer zu untersuchen, wurde zunächst festgestellt, inwieweit sich Heterotrimere aus gB und gB-Deletionskonstrukten bilden können. IMR90S Zellen wurden mit gB-GFP und gBΔ895-904, gBΔ889-904, gBΔ877-904, gBΔ855-904, gBΔ805-904 oder gB804-YMAL transfiziert. Die Deletionskonstrukte wurden mittels anti-V5-Antikörper aus den Zelllysaten präzipitiert (Abb. 18, Spalte 1 - 6), gB-GFP transfizierte Zellen dienten als Negativkontrolle (Abb. 18, Spalte 7). Die Expression aller Konstrukte konnte in den Lysaten nachgewiesen werden (Abb. 18, Reihe 3 und 4). gB-GFP ließ sich mit allen gB-Deletionskonstrukten kopräzipitieren (Abb. 18, Spalte 1 - 6, zweitoberste Reihe). Protomere von gB-GFP und

gB-Deletionskonstrukten interagieren folglich unabhängig von der Deletion der zytoplasmatischen Domäne miteinander.



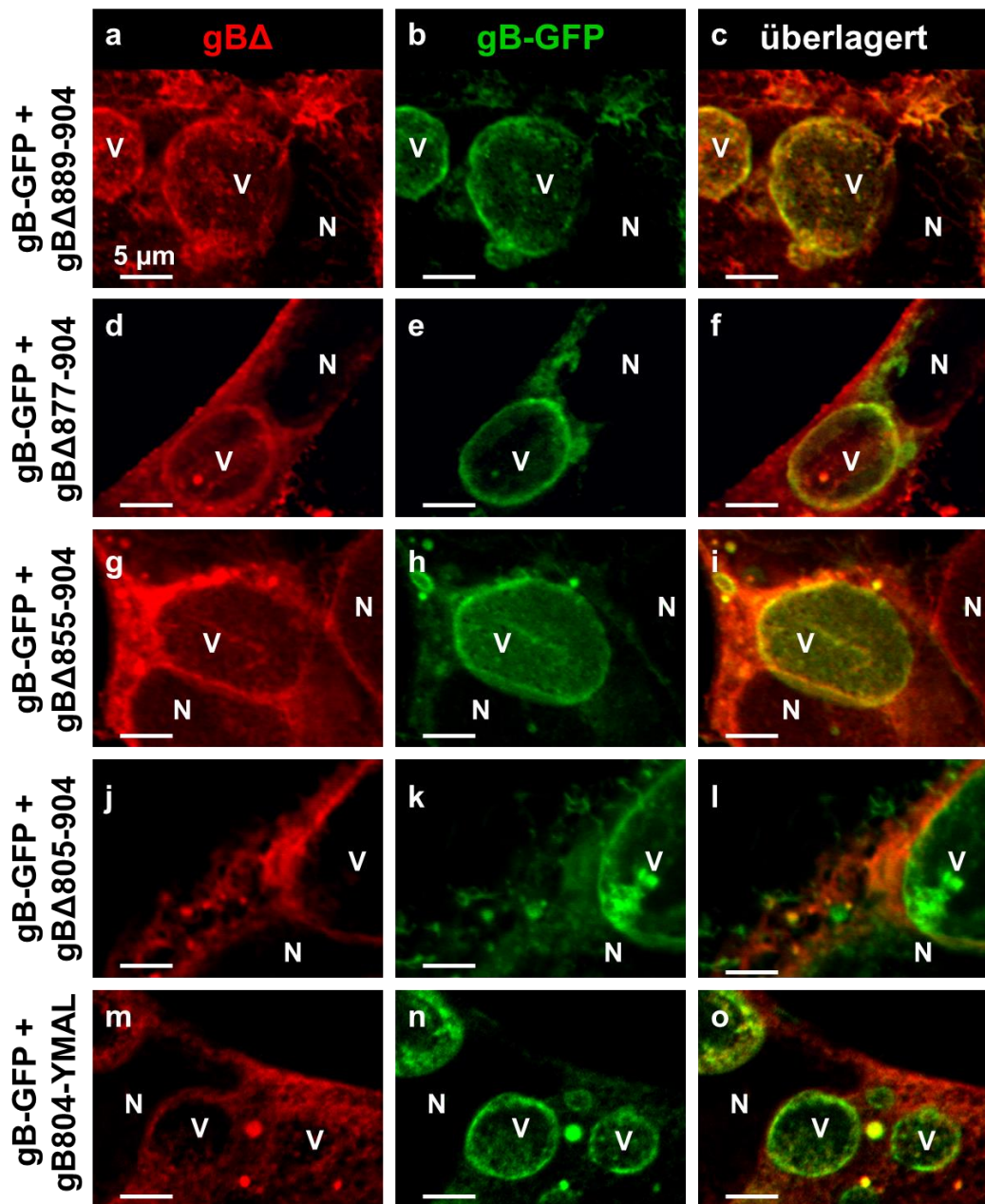
**Abb. 18: Koisolierung von gB-GFP mit gB-Deletionsmutanten.** IMR90S Zellen wurden mit gB-GFP und gBΔ895-904, gBΔ889-904, gBΔ877-904, gBΔ855-904, gBΔ805-904 oder gB804-YMAL transfiziert. Aus den Zelllysaten wurden die Deletionskonstrukte mit Hilfe eines anti-V5-Antikörpers immunpräzipitiert und Lysate und Präzipitate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Deletionskonstrukte wurden mit Hilfe des anti-V5-Antikörpers / anti-Maus-HRP nachgewiesen (Reihe eins und drei). Der GFP-spezifische Antikörper 3H9 / anti-Ratte-HRP wurde verwendet um gB-GFP nachzuweisen (Reihe zwei und vier).

Als nächstes wurde untersucht, inwieweit Heterotrimere aus gB-GFP und gB-Deletionskonstrukten in stark vergrößerte gB induzierte Vesikel transportiert werden. Dazu wurden IMR90S Zellen mit gB-GFP und gBΔ889-904, gBΔ877-904, gBΔ855-904, gBΔ805-904 oder gB804-YMAL kotransfiziert und eine Immunfluoreszenzfärbung der gB-Deletionskonstrukte mit V5-spezifischem Antikörper (rot) durchgeführt (Abb. 19).

Das in den Zellen exprimierte gB-GFP (grün) bewirkt die Bildung leicht vergrößerter spätendosomaler und stark vergrößerter frühendosomaler Vesikel (Abb. 19, b, e, h, k, n; vgl. Abb. 6 u. 8). Die Deletionskonstrukte gBΔ889-904 und gBΔ877-904, denen das <sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup> Motiv fehlt und die, alleine exprimiert, nicht im frühen Endosom zu finden sind, koloalisieren mit gB-GFP in stark vergrößerten gB-GFP induzierten Vesikeln

(Abb. 19, a-c und d-f). Gleiches gilt für das gB $\Delta$ 855-904 Konstrukt, dem <sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup> Motiv und Di-Leucin Motiv fehlen (g-i). Der Transport von Heterotrimeren aus gB-GFP und gB $\Delta$ 889-904, gB $\Delta$ 877-904 oder gB $\Delta$ 855-904 in stark vergrößerte Vesikel zeigt, dass weder das dreifache Vorhandensein des <sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup> Motivs noch des Di-Leucin Motivs für die Lokalisation des Heterotrimers in stark vergrößerten Vesikeln erforderlich ist.

Das gB $\Delta$ 805-904 Konstrukt enthält nur die ersten acht Aminosäuren des zytoplasmatischen Teils und wird, alleine exprimiert, nicht aus dem ER exportiert. Auch bei einer Kotransfektion des Konstrukts mit gB-GFP ist gB $\Delta$ 805-904 nicht in vergrößerten frühendosomalen Vesikeln lokalisiert (j-l). Das gB804-YMAL Konstrukt, welches in spätes Endosom und Exosomen transportiert wird, zeigt ebenfalls keine Kolo-kalisation mit gB-GFP in stark vergrößerten Vesikeln (m-o). Heterotrimere aus gB-GFP und gB-Deletionskonstrukten, die das YMAL Motiv enthalten, lassen sich folglich nur dann in stark vergrößerten Vesikeln nachweisen, wenn sich das Motiv an der richtigen Position innerhalb der zytoplasmatischen Domäne befindet (<sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup>) und die ersten 50 Aminosäuren der zytoplasmatischen Domäne vorhanden sind.

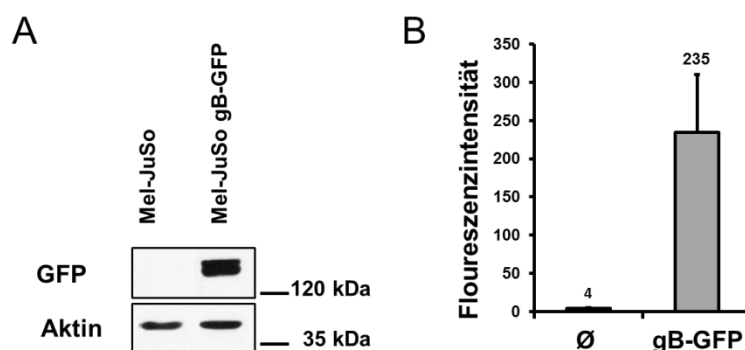


**Abb. 19: Nachweis von gB-Deletionskonstrukten in gB induzierten Vesikeln.** IMR90S Zellen, die gB-GFP und gBΔ889-904, gBΔ877-904, gBΔ855-904, gBΔ805-904 oder gB804-YMAL koexprimieren, wurden mit anti-V5-Antikörper und anti-Maus-Alexa594 Antikörper (rot) immunfluoreszenzgefärbt und mit dem LSM-510 Meta Mikroskop untersucht (Vergrößerung 1:1000, optische Schichtdicke von 1  $\mu$ m, Balken entspricht 5  $\mu$ m). Die Positionen der Zellkerne wurden mit N gekennzeichnet, die der stark vergrößerten Vesikel mit V.

### 3.3 Beeinflussung des MHC Klasse II Prozessierungswegs durch gB Expression

#### 3.3.1 MHC Klasse II und Invariante Kette kolokalisieren mit gB-GFP in leicht und stark vergrößerten Vesikeln

In Anwesenheit von gB kommt es in kotransfizierten COS-7 Zellen zu morphologischen Veränderung der Verteilung von HLA-DR, HLA-DM und Invarianter Kette (Ii) (Neumann et al. 2003). Um die Verteilung von HLA-DR und anderen am Klasse II Weg beteiligten Molekülen in einer stabilen Mel JuSo gB-GFP Zelllinie zu untersuchen, wurden Mel JuSo Zellen mit gB-GFP transfiziert und dem Medium 24 Stunden nach der Transfektion das Antibiotikum Geneticin G418 zugegeben. Auf diese Weise wurden Zellen selektiert, die das Neomycin-Resistenzgen des Vektors exprimieren. Die erhaltenen Klone wurden expandiert und Lysate von untransfizierten Mel JuSo Zellen und Mel JuSo gB-GFP Zellen wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und die Westernblots mit spezifischen Antikörpern gegen GFP (Abb. 20A, erste Reihe) und Aktin (zweite Reihe) analysiert. Während in den Lysaten der Mel JuSo Zellen keinerlei Expression von GFP-Proteinen nachweisbar ist (erste Spalte), findet sich in den Lysaten der Mel JuSo gB-GFP Zelllinie eine spezifische Bande auf der für gB-GFP erwarteten Höhe. Beide Proben sind von der eingesetzten Proteinmenge her vergleichbar (Aktin; Abb. 20A, zweite Reihe).

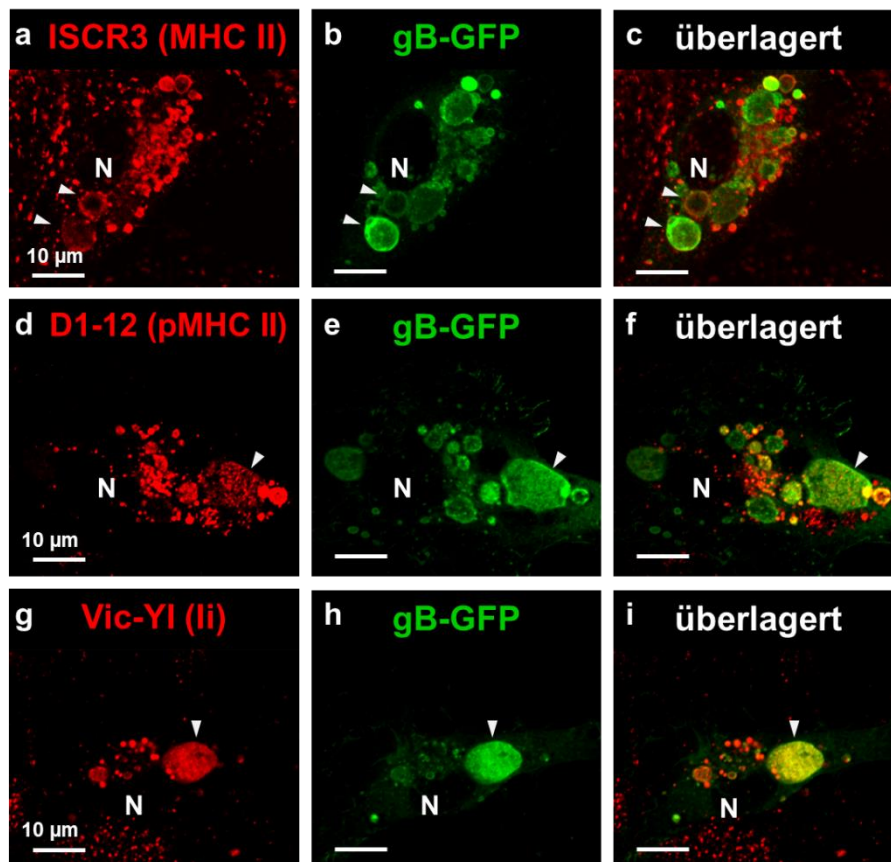


**Abb. 20: Charakterisierung der stabilen Mel JuSo gB-GFP Zelllinie.** Links: Lysate von Mel JuSo und Mel JuSo gB-GFP Zellen wurden per SDS-Gelelektrophorese getrennt und mit dem GFP-spezifischen Antikörper 3H9 bzw. dem Aktin-spezifischen Antikörper AC-40 und anti-Maus-HRP / ECL-Reagenz angefärbt. Rechts: Mel JuSo und Mel JuSo gB-GFP Zellen wurden mit Propidium-Iodid angefärbt, um tote Zellen von der Messung ausschließen zu können und im Durchflusszytometer analysiert. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität aus drei Messungen wurde ermittelt und im Diagramm aufgeführt.

Die Fluoreszenzintensität der Mel JuSo gB-GFP Zelllinie wurde im Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 20B). Die Mittelwerte aus drei Messungen wurden zusammengefasst und die Standardabweichung berechnet. Während Mel JuSo Zellen nur eine geringe Eigenfluoreszenz zeigen, besitzen Mel JuSo gB-GFP Zellen durch die stabile Expression des GFP-Konstruktes eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität.

Der charakterisierte Mel JuSo gB-GFP Zellklon bildet deutlich vergrößerte Vesikel und wurde für die Immunfluoreszenzfärbung (rot) von Proteinen des MHC II Prozessierungsweges verwendet (Abb. 21). Die Färbung von MHC Klasse II Proteinen mit Hilfe des *ISCR3* Antikörpers erfolgt unabhängig von der Interaktion mit der Invarianten Kette. Es zeigt sich eine deutliche Kolokalisation von gB und MHC II mit gB positiven Vesikeln, wobei MHC Klasse II sowohl in schwach als auch in stark vergrößerten gB induzierten Vesikeln zu finden ist (Abb. 21, a-c). Die Intensität der Färbungen von MHC Klasse II und gB-GFP innerhalb der Vesikel ist dabei relativ heterogen. Kleine, deutlich MHC Klasse II gefärbte Vesikel weisen eine schwache gB Färbung auf. In größeren Vesikeln findet man eine unterschiedlich starke gB-GFP Färbung, bei etwa gleich starker MHC II Färbung (a-c, weiße Pfeile). Der Anteil der *ISCR3* Färbung, der mit gB-GFP kofärbt wird durch den Mander-Koeffizienten  $M_1$  angegeben. Er beträgt durchschnittlich  $0,43 \pm 0,06$  (für zehn Zellen). Auch die Färbung mit *D1-12* Antikörper, der primär Peptid beladenes HLA-DR erkennt, zeigt eine Kolokalisation von Peptid beladenem MHC II (pMHC II) mit gB-GFP sowohl in kleineren als auch in großen Vesikeln (Abb. 21, d-f). Während die kleinen Vesikel eine deutliche pMHC II Färbung zeigen, ist die Färbung in den stark vergrößerten Vesikeln schwächer (weißer Pfeil). Der Mander-Koeffizient liegt hier durchschnittlich bei  $M_1 = 0,26 \pm 0,02$ , der Anteil von pMHC II, der mit gB-GFP kolokalisiert, ist folglich niedriger als der nicht Peptid beladene Anteil von MHC II, der mit gB-GFP kolokalisiert.

Die Kofärbung von Invarianter Kette (mittels *Vic-YI*) mit gB-GFP ist sowohl in leicht als auch in stark vergrößerten Vesikeln deutlich zu sehen (Abb. 21, g-i). Insgesamt kolokalisiert ein größerer Anteil von Ii mit gB-GFP ( $M_1 = 0,56 \pm 0,08$ ), als es bei MHC II Fall ist. MHC II, pMHC II und Ii akkumulieren in leicht und stark vergrößerten gB induzierten Vesikeln, wobei der Grad der Kolokalisation bei Ii höher ist als bei MHC II.

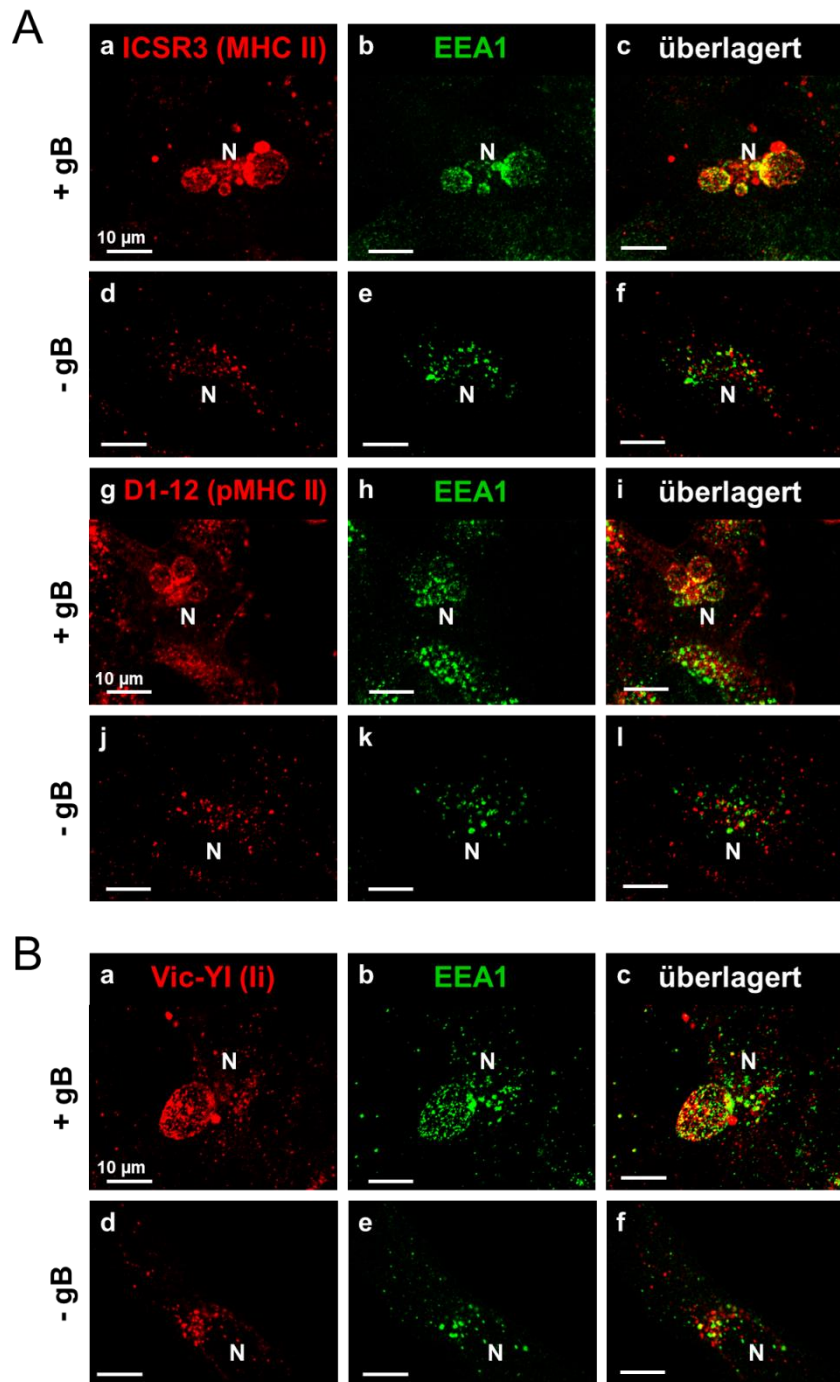


**Abb. 21: Kolokalisation von MHC II oder Invarianter Kette (Ii) mit gB-GFP in gB-induzierten Vesikeln.** Stabile Mel JuSo gB-GFP Zellen wurden mit dem MHC II-spezifischen Antikörper *ISCR3* (a-c), dem pMHC II-spezifischen Antikörper *D1-12* (d-f) oder dem Ii-spezifischen Antikörper *Vic-YI* (g-i) und anti-Maus-Alexa594 (rot) immunfluoreszenzgefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem LSM-510 Meta Mikroskop aufgenommen (Vergrößerung 1:1000, optische Schichtdicke 1  $\mu\text{m}$ , Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ ). Die Position der Zellkerne wurde mit N gekennzeichnet, die Position stark vergrößerter Vesikel wurde mit einem weißen Pfeil markiert.

### 3.3.2 MHC Klasse II und Invariante Kette kolokalisieren mit gB in EEA1 positiven Vesikeln

Als nächstes sollten die gB induzierten Vesikel, in denen es zu einer Kolokalisation mit Proteinen des MHC II Prozessierungsweges kommt, genauer charakterisiert werden. Dazu wurden Mel JuSo Zellen gB transfiziert und mit Antikörpern gegen den frühendosomalen Marker EEA1 (grün) und gegen MHC II oder pMHC II (rot) immunfluoreszenzgefärbt (Abb. 22A). In gB transfizierten Mel JuSo Zellen sind MHC II (a-c) und pMHC II (g-i) in vergrößerten EEA1 positiven Vesikeln nachweisbar. Ein Teil des MHC II bzw. pMHC II befindet sich auch in EEA1 negativen, kleinen und moderat vergrößerten Vesikeln.





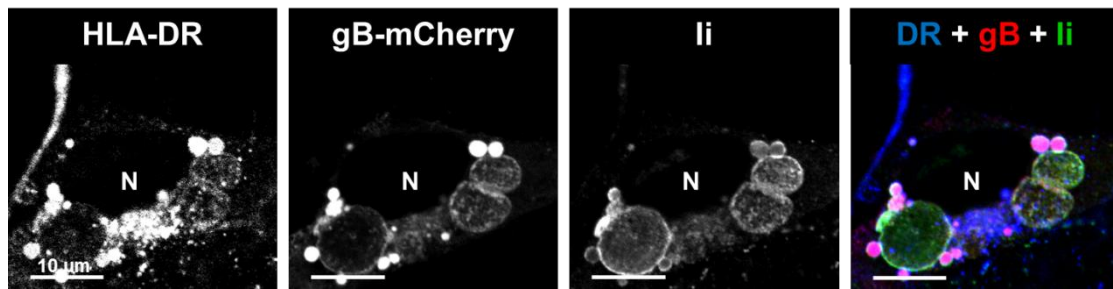
**Abb. 22: Kofärbung von MHC II, pMHC II oder Invarianter Kette mit EEA1 in untransfizierten und gB transfizierten Mel JuSo.** (A) Transient gB transfizierte und untransfizierte Mel JuSo Zellen wurden mit dem MHC II-spezifischen Antikörper *ICSR3* (erste und zweite Reihe), dem pMHC II-spezifischen Antikörper *D1-12* (dritte und vierte Reihe) und anti-Maus-Alexa594 Sekundärantikörper (rot) immunfluoreszenzgefärbt. Die Kofärbung wurde mit anti-EEA1 / anti-Kaninchen-Alexa488 (grün) durchgeführt. (B) Transient gB transfizierte und untransfizierte Mel JuSo Zellen wurden mit dem Ii-spezifischen Antikörper *Vic-YI* / anti-Maus-Alexa594 (rot) und anti-EEA1 / anti-Kaninchen-Alexa488 (grün) kofärbt und mit dem LSM-510 Meta Mikroskop untersucht (Vergrößerung 1:1000, optische Schichtdicke 1 µm, Balken entspricht 10 µm). Die Position der Zellkerne wurde mit N gekennzeichnet.

In untransfizierten Zellen zeigen MHC II und pMHC II nur sehr vereinzelt eine Kolokalisation mit EEA1 (Abb. 22A, d-f und j-l). In gB-exprimierenden Zellen lokalisieren sowohl MHC II als auch pMHC II vermehrt in frühendosomal, vergrößerten Vesikeln.

Um die Auswirkung der gB Transfektion auf die Lokalisation der Invarianten Kette zu untersuchen, wurden untransfizierte oder gB transfizierte Mel JuSo Zellen mit Antikörpern gegen EEA1 (grün) und Ii (rot) immunfluoreszenzgefärbt (Abb. 22B). Die Invariante Kette kolokalisiert in gB transfizierten Zellen mit EEA1 in stark vergrößerten frühen Endosomen (Abb. 22B, a-c), während in untransfizierten Zellen nur eine geringere Kolokalisation zu beobachten ist (d-f). Die Ergebnisse legen nahe, dass gB zu einer Umverteilung von Klasse II Molekülen in frühendosomale Kompartimente führt.

Um die Verteilung von HLA-DR und Invarianter Kette bei gB-Transfektion direkt vergleichen zu können, wurden Mel JuSo Zellen mit gB-mCherry (rot) transfiziert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit dem Ii-spezifischen Antikörper *Vic-Y1* (grün) und einem direkt gekoppelten anti-HLA-DR Antikörper (blau) durchgeführt (Abb. 23). gB-mCherry, HLA-DR und Ii kolokalisieren in leicht und stark vergrößerten Vesikeln. HLA-DR zeigt eine starke Färbung in leicht vergrößerten gB-mCherry positiven Vesikeln, während die stark vergrößerten Vesikel nur schwach angefärbt sind. Zusätzlich dazu findet sich HLA-DR in kleinen vesikulären Strukturen (rechte untere Bildecke) und an der Zelloberfläche. Die Fluoreszenzintensität der Ii Färbung ist in kleinen und großen, gB-mCherry positiven Vesikeln etwa gleich hoch.

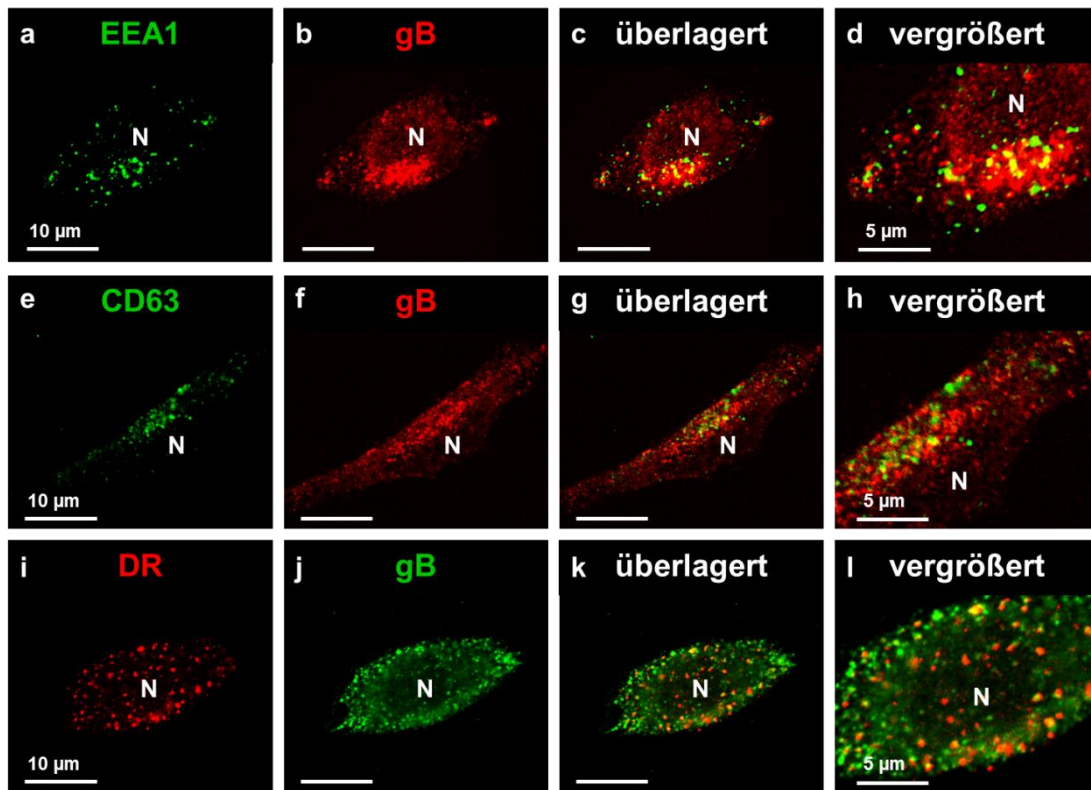
Sowohl MHC Klasse II als auch die Invariante Kette zeigen eine Kolokalisation mit gB induzierten, frühendosomal Vesikeln, während sich in untransfizierten Zellen eine Lokalisation von MHC Klasse II und Ii im frühen Endosom mittels Immunfluoreszenz nur sehr schwach nachweisen lässt (Abb. 22). Dabei ist die Intensität der Färbung der Invarianten Kette innerhalb der stark vergrößerten gB positiven Vesikeln höher als die Intensität der Färbung von HLA-DR (Abb. 23).



**Abb. 23: Dreifachfärbung von MHC II und Invarianter Kette mit gB-mCherry transfizierten Mel JuSo Zellen.** Mel JuSo Zellen, die transient mit gB-mCherry transfiziert wurden, wurden mit dem li-spezifischen Antikörper *Vic-Y1* / anti-Maus-Alexa488 (grün) und einem direkt an den Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin gekoppelten anti-HLA-DR Antikörper (tiefrot, dargestellt in blau) immunfluoreszenzgefärbt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des LSM-510 Meta Mikroskops (Vergrößerung 1:1000, optische Schichtdicke 1 µm). Die Position des Zellkern wurde mit N gekennzeichnet, die Länge des Balkens entspricht 10 µm.

### 3.3.3 Kofärbungen von endosomalen Markern oder DR mit gB in HSV-1 infizierten Zellen

Um zu bestimmen, ob die bei einer gB Transfektion beobachtete endosomale Verteilung und Kollokalisierung mit MHC II auch in HSV-1 infizierten Zellen zu finden ist, wurden Mel JuSo Zellen mit HSV-1 infiziert (Abb. 24). 24 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und mit dem gB-spezifischen Antikörper *2c/2 mAb* (rot) und Antikörpern für die endosomalen Marker EEA1 und CD63 immunfluoreszenzgefärbt (grün; Abb. 24, a-h). Die gB Färbung findet sich überwiegend auf der Zelloberfläche und in perinukleären Membranen. gB zeigt sowohl eine Kofärbung mit EEA1 (a-d) als auch mit CD63 (e-h), welche besonders gut in der Vergrößerung erkennbar ist (d, h). Bei einer HSV-1 Infektion ist gB, wie nach gB Transfektion, in frühen und späten Endosomen zu finden. Im folgenden Experiment wurden mit HSV-1 infizierte Mel JuSo Zellen mit gB-spezifischem (grün) und DR-spezifischem Antikörper (rot) immunfluoreszenz-gefärbt (i-l). Es konnte gezeigt werden, dass nach der Infektion eine deutliche Kollokalisierung von gB mit HLA-DR vorhanden ist. Die Lokalisation von gB in Vesikeln früh- und spätendosomalen Ursprungs und die Kollokalisierung mit HLA-DR lässt sich für gB folglich auch nach einer HSV-1 Infektion nachweisen. Die für die gB-Transfektion ermittelten Ergebnisse haben somit auch für die HSV-1 Infektion eine biologische Relevanz.



**Abb. 24: Kofärbung von gB und EEA1, CD63 oder HLA-DR in HSV-1 infizierten Zellen.** Mel JuSo Zellen wurden mit HSV-1 Stamm 17<sup>+</sup> Virus infiziert, nach 24 h fixiert und gB mit 2c/2 mAb und Alexa594 gekoppeltem anti-Maus Antikörper angefärbt (a-d und e-h). Die Kofärbung erfolgte mit direkt gekoppeltem CD63-Alexa488 Antikörper (a-d) oder EEA1-spezifischem Antikörper / anti-Kaninchen-Alexa488 (e-h). Außerdem wurden gB-spezifischer 2c/2 mAb / anti-Maus-Alexa488 Antikörper und HLA-DR-spezifischer Ratten-Antikörper / anti-Ratte-Alexa594 Antikörper verwendet (i-l). Die Aufnahmen wurden mit dem LSM-510 Meta Mikroskop aufgenommen (Vergrößerung 1:1000, optische Schichtdicke von 1 µm, Balken entspricht 10 µm). Die Positionen der Zellkerne wurden mit N gekennzeichnet.

## 4 Diskussion

Das humanpathogene Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) persistiert nach der Primärinfektion ein Leben lang im Wirtsorganismus, da zahlreiche Immunevasionsstrategien eine vollständige Elimination des Virus verhindern. Das HSV-1 Glykoprotein B (HSV-1 gB) ist an der Fusion des Virus mit der Wirtszellmembran (Atanasiu et al. 2010; Cairns et al. 2011; Gallagher et al. 2014), der Bildung der sekundären Virushülle (Johnson et al. 2011) und der Synzytienbildung beteiligt (Gáspár et al. 2001; Pentcheva und Edidin 2001). Aufgrund seiner Schlüsselrolle beim viralen Eintritt ist gB ein wichtiges Ziel für neutralisierende Antikörper. Außerdem spielt gB eine Rolle bei der viralen Immunevasion von HSV-1. gB interagiert mit Proteinen des MHC II Prozessierungsweges und verändert ihre zelluläre Lokalisation (Neumann et al. 2003). Nach der Ablösung der Invarianten Kette führt es zu einer vermehrten Sortierung von MHC II in Exosomen (Sievers et al. 2002; Temme et al. 2010).

Bisherige Untersuchungen von zytoplasmatischen Deletionen und Mutationen von gB setzten den Schwerpunkt auf die Rolle des zytoplasmatischen Teils bei der Internalisierung von gB oder der Synzytienbildung in Zusammenarbeit mit anderen viralen Proteinen (Beitia Ortiz de Zarate et al. 2004; Chowdary und Heldwein 2010). Eine Untersuchung der Signalmotive von gB im Kontext des endosomalen Transports von gB könnte Hinweise auf den Mechanismus liefern, mit dem gB die Sortierung innerhalb des MHC Klasse II Prozessierungsweges manipuliert.

### 4.1 gB induzierte morphologische Veränderung frühendosomaler und spätendosomaler Vesikel

Die Expression von HSV-1 gB oder gB Orthologen anderer Herpesviruspezies führt zur Bildung vergrößerter intrazellulärer Vesikel (Bocuk 2012). Die Größe und Anzahl gB induzierter Vesikel variiert zwischen verschiedenen Zelllinien (Bocuk 2012). Die Bildung dieser stark vergrößerten Vesikel erfolgt zwischen 12 h und 24 h nach der Transfektion und hat nur einen geringen zytotoxischen Effekt (vgl. Abb. 4 und 5).

In der Vergangenheit wurde für gB nach Transfektion oder Virusinfektion bereits eine Kolokalisation mit Markern des Trans-Golgi-Netzwerk (Beitia Ortiz de Zarate et al. 2004; Beitia Ortiz de Zarate et al. 2007), des frühen (Fan et al. 2002; Avitabile et al.

2004) und des späten Endosoms (Calistri et al. 2007; Temme et al. 2010) nachgewiesen. Dabei wurde eine Vergrößerung endosomaler Kompartimente nach gB Transfektion beobachtet (Fan et al. 2002; Calistri et al. 2007; Temme et al. 2010; Bocuk 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass gB in frühendosomalen und spätendosomalen Vesikeln akkumuliert. Stark vergrößerte gB induzierte Vesikel sind frühendosomalen Ursprungs. Sie koloalisieren mit den frühendosomalen Markern Rab5, EEA1 und Transferrin-Rezeptor (vgl. Abb. 6). Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Ergebnissen, wonach deutlich vergrößerte gB induzierte Vesikel mit endosomalen Markern cofärben (Avitabile et al. 2004; Bocuk 2012). Durch die Überexpression von Rab5 oder EEA1 kann es zu einer Vergrößerung des frühendosomalen Kompartiments kommen (Nielsen et al. 1999; Bergeland et al. 2008). Die Größe der durch Überexpression von GFP Rab5 oder GFP EEA1 verursachten frühendosomalen Vesikel ist wesentlich geringer, als die durch gB induzierte Vergrößerung (vgl. Abb. 6, d,h).

Die Bildung von Autophagosomen erfolgt aus Membranfragmenten, die vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) stammen, unter Beteiligung von Rab5 (Li et al. 2013). Bei den gB induzierten Rab5 positiven Vesikeln handelt es sich jedoch nicht um Autophagosomen, da es keine Kofärbung der Vesikel mit dem ER-Marker Calnexin gibt (vgl. Abb. 7).

Die Akkumulation von gB am frühen Endosom und die gB induzierte Vergrößerung frühendosomaler Vesikel könnte einen Effekt bei der Bildung der viralen Hülle haben, denn gB kann neben anderen viralen Glykoproteinen eine Funktion bei der sekundären Behüllung übernehmen (Johnson et al. 2011). Die sekundäre Behüllung des HSV-1 Kapsids findet entweder am Trans-Golgi-Netzwerk oder am Endosom statt (Mettenleiter et al. 2006; Hollinshead et al. 2012). Kapsidproteine akkumulieren am frühen Endosom und die sekundäre Behüllung benötigt Rab5 (Hollinshead et al. 2012). Die Bildung intraluminaler Vesikel beginnt bereits im frühen Endosom (Huotari und Helenius 2011) und die sekundäre Behüllung von HSV-1 setzt eine funktionierende ESCRT-Maschinerie voraus (Calistri et al. 2007; Crump et al. 2007; Pawliczek und Crump 2009). ESCRT-III und VPS4 lassen sich in aufgereinigten Viruspartikeln nachweisen (Pawliczek und Crump 2009). Auch der korrekte Transport von gB ist von Vps4 und damit einer funktionierenden ESCRT-Maschinerie abhängig (Calistri et al. 2007). Es wäre also denkbar, dass die Bildung vergrößerter gB induzierter Vesikel frühendosomalen Ursprungs eine Bedeutung für die

Virusfreisetzung hat. Beispielsweise könnte durch die Stimulation der frühendosomal Fusion die Akkumulation von viralen Glykoproteinen gefördert und Membranen für die sekundäre Behüllung bereitgestellt werden. Bei HSV-1 Infektionen ist zwar eine Kolokalisation von gB in frühendosomal Vesikeln vorhanden, diese sind aber nicht so stark vergrößert wie nach gB Transfektion (vgl. Abb. 24), was dafür sprechen könnte, dass die sekundäre Behüllung die Vesikelvergrößerung limitiert. Andererseits gehen *Hollinshead et al. 2012* von einem tubulären Kompartiment als Ort der sekundären Behüllung aus, dass zwar frühendosomal Ursprungs, jedoch nicht mehr positiv für frühendosomale Marker wie EEA1 ist. Da die Funktion von gB bei der sekundären Behüllung nicht essentiell ist (Johnson et al. 2011), könnten andere virale Proteine ebenfalls zur Veränderung der Morphologie früher Endosomen beitragen.

Leicht vergrößerte gB induzierte Vesikel sind spätendosomal Ursprungs und positiv für die spätendosomal Marker CD63 und Rab7b (vgl. Abb. 8). Es gibt keine Kolokalisation des HSV Kapsids mit CD63 (Hollinshead et al. 2012) was dafür spricht, dass gB die Akkumulation von gB in frühen und späten Endosomen unterschiedliche Funktionen hat. gB transfizierte Zellen zeigen im Vergleich zu untransfizierten Zellen eine erhöhte Exosomensekretion (Temme et al. 2010) und nach HSV-1 Infektion werden ebenfalls große Mengen von Exosomen (so genannte L-Partikel) sekretiert, die virale Glyko- und Tegumentproteine enthalten, aber kein Kapsid (Loret et al. 2008). In MHC II exprimierenden Zellen akkumulieren gB und MHC II in leicht vergrößerten spätendosomal Vesikeln und werden verstärkt in intraluminale Vesikel sortiert und über Exosomen abgegeben (Temme et al. 2010). Die Rolle der gB und MHC II positiven Exosomen für den Verlauf der HSV-1 Infektion ist noch unklar, sie könnten jedoch eine Rolle bei der viralen Immunevasion spielen. MHC II positive Exosomen epithelialen Ursprungs können Toleranz in CD4+ T-Zellen induzieren, welche wiederum eine zentrale Rolle bei der Immunantwort gegen HSV sind (Koelle et al. 1998; Smith et al. 2004; Östman et al. 2005).

## **4.2 gB verursacht die Vergrößerung von frühen endosomal Vesikeln**

Eine Vergrößerung frühendosomaler Vesikel kann viele Ursachen haben, beispielsweise die Überexpression oder verstärkte Aktivierung von einzelnen

Komponenten der frühendosomalen Fusionsmaschinerie (Gorvel et al. 1991; Stenmark et al. 1994; Gengyo-Ando et al. 2007; Bergeland et al. 2008). Eine andere Ursache für die Vergrößerung frühendosomaler Vesikel ist die Verzögerung der endosomalen Reifung. Die Überexpression der Invarianten Kette führt zur beispielsweise zur Bildung vergrößerter frühendosomaler Vesikel und zu verzögerter frühendosomaler Reifung (Gorvel et al. 1995; Nordeng et al. 2002). Diese Verzögerung der Reifung ist auch unter physiologischen Bedingungen wie der erhöhten Expression von Ii während der Reifung von DCs zu beobachten (Engering et al. 1998) und führt zu einer verlängerten Halbwertszeit von MHC II (Landsverk et al. 2011).

Modellsysteme mit stark vergrößerten Vesikeln, wie gB transfizierte IMR90S Zellen, lassen sich nutzen, um zu untersuchen, auf welche Weise es zur Bildung vergrößerter Vesikel kommt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die starke Vergrößerung gB induzierter Vesikel sich durch den PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin hemmen lässt und somit Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) abhängig ist (vgl. Abb. 9). PI3P wird für die frühendosomale Vesikelfusion und die Bildung intraluminaler Vesikel benötigt (Gillooly et al. 2001). Die Abhängigkeit der gB induzierten Vesikelvergrößerung von PI3P ermöglicht Rückschlüsse auf den durch gB manipulierten Signalweg.

Aktives Rab5 stimuliert die Bildung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) durch die PI3-Kinase VPS34 und die Bindung des Rab5 Effektor EEA1 ("Early Endosomal Antigen 1") (Christoforidis et al. 1999; Shin et al. 2005). EEA1 und Rabenosyn-5 wirken durch die Bindung von Rab5 mit ihrer N-terminal gelegenen Rab5 Bindedomäne und der Bindung von PI3P mit ihrer C-terminal gelegenen FYVE-Domäne auf verschiedenen Membranen als Tether und können die Annäherung beider Membranen vermitteln (Nielsen et al. 2000; Ohya et al. 2009; Rahajeng et al. 2010). Andere Rab5-Effektoren wie der Tetherkomplex CORVET ("class C core vacuole/endosome tethering") spielen eine von PI3P unabhängige Rolle bei der frühendosomalen Fusion (Balderhaar et al. 2013). Die gB induzierte frühendosomale Vesikelvergrößerung hängt also wahrscheinlich von der durch EEA1 oder Rabenosyn-5 vermittelten Fusion ab und nicht von einem anderen Signalweg der frühendosomalen Vesikelfusion.

Die Tatsache, dass sich die gB induzierte Vesikelvergrößerung durch Wortmannin hemmen lässt, ermöglicht nicht nur Rückschlüsse auf den möglicherweise manipulierten Signalweg, sondern auch auf die Position im Signalweg an der diese Manipulation stattfinden könnte. Nachdem Vesikel- und Zielmembran durch Tether



gebunden wurden, kommt es zur Aktivierung der SNAREs auf beiden Membranen. Durch die Interaktion des SNARE-Komplexes geraten die Membranen in unmittelbare physikalische Nähe und verschmelzen miteinander. Sowohl die SNAREs als auch NSF ("ATPase N-Ethylmaleimid sensitives Fusionsprotein"), welches den SNARE-Komplex löst, sind von ATP abhängig und werden durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert (Hong und Lev 2014). Beispielsweise bildet Rabenosyn-5 einen stabilen Komplex mit dem SM ("Sec1/Munc18") Protein Vps45, welches wiederum direkt mit SNAREs interagiert (Nielsen et al. 2000; Rahajeng et al. 2010). Die Aktivierung von SNAREs erfolgt in der Signalkaskade also später als die PI3P abhängige Wirkung der Tether, sodass ein direkter Einfluss auf die Regulation der Aktivität der SNAREs unabhängig von PI3P wäre. Die Beeinflussung der Vesikelfusion durch gB erfolgt somit an einem früheren Punkt der Signalkaskade.

Um den Mechanismus zu verstehen, mit dem gB die Bildung vergrößerter frühendosomaler Vesikel induziert, werden weitere Experimente benötigt. Bisherige Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Manipulation der frühendosomalen Fusionsmaschinerie die Ursache der Vesikelvergrößerung ist, und durch die Beeinflussung der Tether EEA1 oder Rabenosyn-5 oder in der Signalkaskade zuvor aktivierter Proteine erfolgt.

### **4.3 Die Rolle zytoplasmatischer Sortierungssignale beim endosomalen Transport von gB**

Der zytoplasmatische Teil von gB besitzt zwei Tyrosin-basierte Motive (<sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup> und <sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup>) und ein Di-Leucin Motiv (<sup>871</sup>LL<sup>872</sup>), die in der Familie der Herpesviren konserviert sind (Fan et al. 2002; Heineman et al. 2004; Beitia Ortiz de Zarate et al. 2004; Garcia et al. 2013). Di-Leucin und Y-basierte Motive (ein Tyrosin, gefolgt von zwei beliebigen Aminosäuren und einer Aminosäure mit großem hydrophobem Rest; YXX $\phi$ ) sind endosomale Sortierungssignale (Marks et al. 1996; Kozik et al. 2010). Darüber hinaus kann das Tyrosin-basierte Motiv als Sortierungssignal für die Clathrin abhängige Endozytose und für den Transport zum endosomalen sekretorischen Weg dienen (Pandey 2009).

Das C-terminaler gelegene Y-basierte Motiv (<sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup>) ist wichtig für die Internalisierung des gB (Favoreel et al. 2002; Fan et al. 2002; Beitia Ortiz de Zarate et

al. 2004). In PRV wird das C-terminaler gelegene Tyrosin-basierte Motiv durch AP-2 gebunden, was zur Clathrin abhängigen Endozytose führt (van Minnebruggen et al. 2004). Bei einer Deletion oder Mutation des Motivs in HSV-1 kommt es zu einer verzögerten Internalisierung von gB, nicht jedoch zu einem vollständigen Ausbleiben der Endozytose (Beitia Ortiz de Zarate et al. 2004; Beitia Ortiz de Zarate et al. 2007). Nach der Internalisierung erfolgt der Transport von gB ins frühe Endosomen auch in Abwesenheit des <sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup> Motivs (vgl. Abb. 15). Dabei ist die Internalisierung des Deletionskonstrukts gegenüber der des gB-GFP leicht verzögert (vgl. Abb. 14 und 15).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von <sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup> für den endosomalen Transport genauer untersucht werden. Eine Lokalisation im frühen Endosom und eine Induktion stark vergrößerter Vesikel lassen sich bei dem gB $\Delta$ 895-904 Konstrukt nachweisen, dem die letzten zehn Aminosäuren von gB fehlen, nicht jedoch bei dem gB $\Delta$ 889-904, bei dem zusätzlich der Sequenzbereich <sup>889</sup>YTQV<sup>894</sup> deletiert ist (vgl. Abb. 12). Für die Akkumulation von gB im frühen Endosom und die Stimulation der frühendosomalen Fusion wird folglich der <sup>889</sup>YTQV<sup>894</sup> Sequenzbereich benötigt. Die Tatsache, dass Deletionskonstrukte ohne den <sup>889</sup>YTQV<sup>894</sup> Sequenzbereich nicht in ausreichender Menge im frühen Endosom verbleiben, um in der Immunfluoreszenz nachweisbar zu sein und es bei fehlendem <sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup> Motivs - zumindest nach Internalisierung - zu einem Transport zum frühen Endosom kommt, deutet daraufhin, dass es sich bei dem <sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup> um ein Retentionssignal des frühen Endosoms handelt. Es lässt sich allerdings nicht ausschließen, dass der Effekt durch die verlangsamte Internalisierung bei fehlendem <sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup> Sequenzmotiv zu Stande kommt.

Das Di-Leucin Motiv (<sup>871</sup>LL<sup>872</sup>) besteht aus zwei Leucinresten und ist verstärkt von polaren und geladenen Aminosäuren umgeben (Kozik et al. 2010). Das Di-Leucin-basierte Motiv des HSV-1 gB besitzt eine Asparaginsäure hinter dem Di-Leucin Motiv, sodass es sich um eine nicht-klassische Variante des Motivs handelt (Kozik et al. 2010). Während das gB $\Delta$ 855-904 Konstrukt ausschließlich das <sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup> enthält, enthalten die Deletionskonstrukte gB $\Delta$ 889-904 und gB $\Delta$ 877-904 zusätzlich das Di-Leucin Motiv. Dabei wurde das gB $\Delta$ 889-904 so deletiert, dass die Asparaginsäure (D<sup>878</sup>) noch im Konstrukt enthalten ist, im gB $\Delta$ 877-904 Konstrukt fehlt sie jedoch. Die Deletion der Asparaginsäure führt zu keiner Veränderung in der endosomalen Verteilung der Konstrukte. Beide werden zur Zelloberfläche, in späte Endosomen und

Exosomen sortiert (vgl. Abb. 11 und 12). Das gB $\Delta$ 855-904 Konstrukt, dem das Di-Leucin Motiv fehlt, zeigt ebenfalls eine Kolo-kalisation mit spätendosomalen Markern, sodass für das Di-Leucin Motiv im Rahmen dieser Arbeit keine Funktion für den endosomalen Transport nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise besitzt das Di-Leucin Motiv eine Funktion beim retrograden Transport vom Recycling-Endosom zum Trans-Golgi-Netzwerk nach erfolgreicher Internalisierung (Beitia Ortiz de Zarate et al. 2004). Im Kontext einer viralen Infektion haben Mutationen oder Deletionen im Sequenzbereich des Di-Leucin Motivs starke Auswirkungen auf die fusiogene Aktivität von gB bei der Synzytienbildung und eine Mutation oder Deletion des Di-Leucin Motivs führt zur verstärkten Synzytienbildung (Foster et al. 2001; Chowdary und Heldwein 2010).

Für das Tyrosin-basierte Motiv (<sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup>) wurde zusammen mit einem C-terminal gelegenen EXXE Motiv in verschiedenen Viren eine Rolle beim Transport von und zum Golgi beschrieben (Heineman et al. 2000; Heineman und Hall 2001; Heineman et al. 2004). Das YMAL Motiv wird in HSV-1 weder für die Internalisierung, noch im Zusammenhang mit verstärkter Zell-Zellfusion benötigt (Chowdary und Heldwein 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das YMAL Motiv alleine ausreichend ist, um den Export von gB aus dem Golgi zu bewirken und zu einer Lokalisation in späten Endosomen und Exosomen zu führen. Dazu wurde ein gB $\Delta$ 855-904 Konstrukt untersucht, bei dem der zytoplasmatische Teil nach Aminosäure 855 deletiert ist, sodass das <sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup> Motiv enthalten ist jedoch nicht das EXXE Motiv (<sup>857</sup>ERTE<sup>860</sup>). Als Positivkontrolle diente das gB804-YMAL Konstrukt, bei dem der zytoplasmatische Teil bis auf die ersten acht Aminosäuren deletiert und das YMAL Motiv angehängt wurde. Beide Konstrukte sind partiell Endo-H resistent, werden also aus dem ER zum Golgi exportiert und lassen sich auf der Zelloberfläche nachweisen (vgl. Abb. 10). Eine komplette Deletion des zytoplasmatischen Teils (gB $\Delta$ 805-904) verhindert jedoch den Export des Konstrukts aus dem ER. Diese Ergebnisse decken sich nicht mit früher publizierten Ergebnissen (Beitia Ortiz de Zarate et al. 2004), wonach ein gB-Deletionskonstrukt, welches zwischen <sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup> und <sup>857</sup>ERTE<sup>860</sup> Motiv deletiert wurde, im ER verbleibt.

gB $\Delta$ 855-904 und gB804-YMAL Konstrukt kolo-kalisieren mit dem spätendosomalen Marker CD63 und lassen sich in Exosomen nachweisen (vgl. Abb. 12 und 13). Beim Transport in intraluminale Vesikel wird der zytoplasmatische Teil von gB

ubiquitinyliert, wobei eine Deletion der letzten 37 Aminosäuren zu einer deutlich geringeren Ubiquitinylierung führt (Calistri et al. 2007). Da das gB804-YMAL Konstrukt neben dem YMAL Motiv nur acht weitere Aminosäuren des zytoplasmatischen Teils (und keine vorhergesagte Ubiquitinylierungsstelle) enthält ist es unwahrscheinlich, dass der Transport dieses Konstrukts von einer Ubiquitinylierung der zytoplasmatischen Domäne abhängt. Möglicherweise kann gB Ubiquitin unabhängig in intraluminale Vesikel transportiert werden, beispielsweise über Tetraspanin-reiche Mikrodomänen. Tetraspanine interagieren durch ihre extrazellulären Domänen untereinander und mit zahlreichen weiteren Proteinen wie Integrinen, Transportproteinen, Rezeptoren und Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie (Hemler 2005). Daher wäre eine Interaktion des luminalen Teils von gB mit Tetraspaninen oder anderen Proteinen denkbar, die zur Sortierung von gB in Tetraspanin-reiche Mikrodomänen und in intraluminale Vesikel führt. Es bleibt also offen, ob YMAL als Transportmotiv für späte Endosomen und Exosomen dient oder ob es den ER-Export vermittelt und der endosomale Transport unter Beteiligung von luminalen Bereichen des gB stattfindet.

Bei der Infektion von Zellen mit HSV-1 Virus, kolokalisiert gB mit früh- und spätendosomalen Markern (vgl. Abb. 24). Zytoplasmatische Deletionskonstrukte von gB beeinflussen die zelluläre Verteilung von gB, die virale Infektiosität und die Fähigkeit zur Synzytienbildung (Beitia Ortiz de Zarate et al. 2007; Calistri et al. 2007), womit die generelle Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das virale System gegeben ist.

#### **4.4 Die Trimerisierung des zytoplasmatischen Teils ist notwendig für den endosomalen Transport von gB**

Das gB bildet ein stabiles Heterotrimer, wobei die Trimerisierung durch zahlreiche Interaktionen der Protomere untereinander vermittelt wird (Heldwein et al. 2006; Stampfer et al. 2010). Die zytoplasmatische Domäne von gB trimerisiert ebenfalls, wofür die ersten 50 Aminosäuren der Domäne benötigt werden (Chowdary und Heldwein 2010). Mit Hilfe eines Fusionsproteins aus der luminalen und Transmembrandomäne von HLA-A2 und der zytoplasmatischen Domäne von gB wurde die Bedeutung der Trimerisierung auf die endosomale Verteilung untersucht. HLA-A2 bildet nach Peptidbeladung Cluster im ER und dimere oder tetramere Cluster

auf der Plasmamembran von Antigen präsentierenden Zellen (Pentcheva und Edidin 2001; Gáspár et al. 2001); eine trimere Struktur der zytoplasmatischen Domäne wie im wildtyp gB ist nicht gegeben. Ein Valin oder Alanin als letzte Aminosäure der zytoplasmatischen Domäne von MHC Klasse I dient als ER Exportsignal, ein verlangsamter Transport zur Plasmamembran erfolgt jedoch auch bei einer Deletion der zytoplasmatischen Domäne (Boyle et al. 2006; Cho et al. 2011).

Das Fusionsprotein HLA-A2-gB<sub>c</sub> gleicht in seiner zellulären Verteilung der des HLA-A2, und lässt sich mittels Immunfluoreszenz nicht in frühendosomalen Vesikeln nachweisen (vgl. Abb. 16 und 17). Die für MHC Klasse I Moleküle typische Verteilung des HLA-A2-gB<sub>c</sub> Fusionsproteins lässt darauf schließen, dass die monomere zytoplasmatische Domäne des gB nicht ausreicht, um den Transport des Fusionsproteins ins frühe Endosom zu gewährleisten. Eine essentielle Rolle der Trimerisierung der zytoplasmatischen Domäne für den korrekten Transport wurde auch für andere Proteine beschrieben. Beispielsweise ist die Trimerisierung der Invarianten Kette und das Vorhandensein zytoplasmatischer Signalmotive in allen drei Protomeren für den effizienten Transport des Proteins zum Endosom notwendig (Arneson und Miller 1995; Nordeng et al. 2002).

Bei der Koexpression von gB-GFP und gB-Deletionskonstrukten bilden sich Heterotrimere (vgl. Abb. 18), in denen Sequenzen der zytoplasmatischen Domäne nur ein- oder zweifach vorhanden sind. Diese Heterotrimere werden in stark vergrößerte, frühendosomale Vesikel transportiert, sofern alle Protomere das <sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup> Motiv und die ersten 50 Aminosäuren des zytoplasmatischen Teils enthalten (vgl. Abb. 19). Heterotrimere aus gB-GFP und gB804-YMAL Konstrukt werden nicht in stark vergrößerte Vesikel sortiert, obwohl das YMAL Sequenzmotiv in jedem Protomer vorliegt. Das könnte daran liegen, dass sich das YMAL Motiv in gB804-YMAL an einer anderen Position befindet, als im wildtyp gB, sodass die ersten 50 Aminosäuren des zytoplasmatischen Teils ebenfalls eine Bedeutung für die Sortierung der Heterotrimere in stark vergrößerte Vesikel haben könnten. Dieser Bereich bildet Loops sowie eine  $\alpha$ -helikale Struktur und vermittelt die Trimerisierung der zytoplasmatischen Domäne (Ruel et al. 2006; Chowdary und Heldwein 2010). Fehlen Di-Leucin (<sup>871</sup>LL<sup>872</sup>) oder/und <sup>889</sup>YTQV<sup>892</sup> Motiv sind Heterotrimere aus gB-GFP und gB-Deletionskonstrukten in stark vergrößerten, gB induzierten Vesikeln nachweisbar. Ein dreifaches Vorhandensein dieser Motive wird für die Lokalisation in stark vergrößerten Vesikeln nicht benötigt.

Eine Aussage über die Rolle der Trimerisierung für die Entstehung vergrößerter Vesikel kann nicht getroffen werden, da bei der Koexpression von gB-GFP und gB-Deletionskonstrukten gB-GFP Homotrimere gebildet werden, die - unabhängig von der möglichen Wirkung der Heterotrimere - vergrößerte Vesikel induzieren. Abschließend lässt sich festhalten, dass der Transport von gB in frühe Endosomen von der korrekten Faltung und Trimerisierung der zytoplasmatischen Domäne, nicht jedoch vom dreifachen Vorhandensein der <sup>889</sup>YTQVPN<sup>892</sup> oder <sup>871</sup>LL<sup>872</sup> Sequenz abhängig ist.

## **4.5 gB beeinflusst die zelluläre Verteilung von Proteinen des MHC Klasse II Prozessierungsweges**

Eine HSV-1 Infektion führt zu einer verringerten Oberflächenexpression von MHC I und MHC II Molekülen und einer verringerten Bildung SDS-stabiler HLA-DR Moleküle (Neumann und Koch 2006). Der luminal Teil von gB enthält einen Sequenzbereich, der homolog zu einem Sequenzmotiv der Invarianten Kette ist und in der MHC II Peptidbindungsgrube binden kann (Sievers et al. 2002). Nach der Degeneration der Invarianten Kette führt gB zu einer veränderten Sortierung der HLA-DR Komplexe. Diese finden sich nicht auf der Zelloberfläche, sondern werden effizient in Exosomen sortiert (Temme et al. 2010). Die Exosomensekretion in gB transfizierten Zellen ist höher als in unbehandelten Zellen und die Exosomen enthalten größere Mengen an MHC II (Temme et al. 2010).

In stabilen Mel Juso gB-GFP Zellen kolokalisieren MHC Klasse II Proteine in leicht und stark vergrößerten gB positiven Vesikeln (vgl. Abb. 21). Dabei ist der Grad der Kolokalisation, der sich durch den Mander-Koeffizienten berechnen lässt, für das gesamte MHC II höher, als für Peptid beladenes MHC II (pMHC II) (MHC II:  $M_1 = 0,43 \pm 0,06$ ; pMHC II:  $M_1 = 0,26 \pm 0,02$ ). Da der Grad der Kolokalisation ein relativer Wert ist, ist der mit gB kolokalisierende Anteil von pMHC II niedriger als der mit gB kolokalisierende Anteil von MHC II, welches noch an die Invariante Kette gebunden ist. Auch nach Infektion mit HSV-1 gibt es eine deutliche Kolokalisation von gB mit HLA-DR in vesikulären Strukturen (Abb. 23), die Ergebnisse sind also prinzipiell auf das virale System übertragbar.

Wie MHC II kolokalisiert auch die Invariante Kette in Mel Juso gB-GFP Zellen mit gB-GFP (vgl. Abb. 21), wobei etwas mehr als die Hälfte der exprimierten Invarianten

Kette eine Kolokalisation mit gB zeigt ( $M_1 = 0,56 \pm 0,08$ ). Dabei führt gB sowohl für MHC II, als auch für li zu einer verstärkten Akkumulation in EEA1 positiven Vesikeln (vgl. Abb. 22A). gB beeinflusst also sowohl die frühendosomale Lokalisation von MHC II nach dem proteolytischen Abbau der Invarianten Kette, als auch die der MHC II / li Komplexe. Das ist insofern bemerkenswert, als dass eine direkte Interaktion von gB mit MHC II n nach dem proteolytischen Abbau von li stattfindet und gB und li nicht direkt miteinander interagieren (Neumann et al. 2003; Temme et al. 2010). Die Beeinflussung der Lokalisation von MHC II / li Komplexen durch gB erfolgt somit wahrscheinlich indirekt. Der Einfluss von gB auf die frühendosomale Vesikelfusion könnte dabei eine Rolle spielen und damit einen generellen Effekt sowohl auf MHC II / li Komplexe, als auch auf pMHC II haben. Ergebnisse für die Untersuchung der Auswirkungen von li auf den frühendosomal Transport zeigten, dass li durch seine Wirkung auf die Morphologie und Reifung früher Endosomen nicht nur den Transport von MHC II / li Komplexen, sondern auch den von pMHC II beeinflusst (Landsverk et al. 2011).

Eine Dreifachfärbung von gB-mCherry, HLA-DR und li zeigt, dass HLA-DR stärker in kleinen gB-mCherry positiven als in stark vergrößerten gB-mCherry positiven Vesikeln kolokalisiert (vgl. Abb. 23). Dabei handelt es sich um EEA1-negative Vesikel (vgl. Abb. 22A). Da gB und HLA-DR auch in CD63 positiven Vesikeln kolokalisieren (Temme et al. 2010), handelt es sich wahrscheinlich um spätendosomale Kompartimente.

Die Intensität der li Expression ist in kleinen und großen gB-mCherry induzierten Vesikeln gleich groß (vgl. Abb. 23). Dieser Effekt könnte experimenteller Natur sein: Dadurch, dass die Invariante Kette im späten Endosom abgebaut wird und somit nicht mehr in der Immunfluoreszenz nachweisbar ist, könnte prozentual gesehen, ein höherer Anteil des angefärbten li in frühen Endosomen lokalisiert sein, als es bei MHC II der Fall ist.

Eine andere Erklärung wäre, dass die Auswirkung auf die Verteilung von li unabhängig von der Bildung von MHC II / li Komplexen ist. Dafür spricht, ein größerer Anteil der Invarianten Kette mit gB kolokalisiert, als es bei MHC II der Fall ist (vgl. Abb. 21;  $M_1 = 0,56 \pm 0,08$ ). Außerdem interagiert gB zwar direkt mit HLA-DR und HLA-DM, aber nicht mit li (Neumann et al. 2003; Temme et al. 2010), weshalb eine Manipulation des endosomal Transport von li (oder des li / MHC II-Komplexes), auf einem anderen Mechanismus beruhen könnte.

Ein hypothetisches Modell für die Manipulation des MHC Klasse II Prozessierungsweges durch gB wäre, dass gB einen doppelten Einfluss auf den MHC Klasse II Prozessierungsweg hat: Zum einem die bereits durch *Temme et al. 2010* beschriebene Bildung von Sortierung von MHC II in Exosomen und zum anderen die Verzögerung des Transports von MHC II / Ii Komplexen aus dem frühen Endosom durch einen indirekten Effekt, die möglicherweise mit einer erhöhten Fusion frühendosomaler Vesikel zusammenhängt und wiederum zu einer verzögerten Peptidbeladung führen könnte.



## 5 Zusammenfassung

Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) ist ein weit verbreitetes humanpathogenes Virus. Nach einer Infektion kommt es durch Immunevasionsstrategien zu einer lebenslangen Persistenz des Virus im Wirtsorganismus. Das HSV-1 Glykoprotein B (gB) spielt eine Rolle bei der Verschmelzung der Virushülle mit der Wirtszellmembran. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung zytoplasmatischer Signalmotive bei der Sortierung von gB in endosomale Vesikel untersucht. gB findet sich zum einen in leicht vergrößerten Vesikeln spätendosomal Ursprungs und zum anderen in Vesikeln frühendosomal Ursprungs. Die frühendosomalen Vesikel zeigen eine deutliche Vergrößerung, die von der Bildung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat abhängig ist und sich durch den PI3-Kinaseinhibitor Wortmannin hemmen lässt. Für den endosomalen Transport des gB spielen die Signalmotive der zytoplasmatischen Domäne eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass das Tyrosin-basierte Motiv <sup>849</sup>YMAL<sup>852</sup> den Export aus dem ER ermöglicht und ausreichend für den Transport von gB in späte Endosomen und in Exosomen ist. Der Sequenzbereich <sup>889</sup>YTQVPN<sup>894</sup>, der das Tyrosin-basierte Motiv YTQV, enthält ist für die Akkumulation von gB im frühen Endosom und für die erhöhte Fusion frühendosomaler Vesikel verantwortlich. Für die Akkumulation von gB in frühendosomalen, vergrößerten Vesikeln sind darüber hinaus die Trimerisierung der zytoplasmatischen Domäne wichtig. Der Transport von gB in frühe Endosomen nach Internalisierung erfolgt auch in Abwesenheit des <sup>889</sup>YTQVPN<sup>894</sup> Sequenzbereichs, wobei es zu keiner Vergrößerung des Kompartiments kommt. In gB exprimierenden Mel JuSo Zellen zeigen HLA-DR und Invariante Kette eine deutliche Kollokalisierung mit gB. Diese Kollokalisierung konnte in gB induzierten Vesikeln frühendosomal Ursprungs nachgewiesen werden, während in untransfizierten Zellen keine nennenswerte Kollokalisierung von HLA-DR oder Invarianter Kette mit dem frühendosomalen Marker EEA1 zu finden ist. In HSV-1 infizierten Zellen kommt es, wie bei einer gB Transfektion, sowohl zu einer Kollokalisierung von gB mit früh- und spätendosomalen Markern, als auch zu einer Kollokalisierung mit HLA-DR. Die Akkumulation von gB in frühen Endosomen hat einen Einfluss auf die Lokalisation von MHC II und Invarianter Kette und nimmt Einfluss auf die Peptidbeladung von MHC Klasse II.

## 6 Literatur

**Accolla, R.S.; Gross, N.; Carrel, S. und Corte, G. 1981.** Distinct forms of both alpha and beta subunits are present in the human Ia molecular pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78(7): S. 4549–4551.

**Adams, T.E.; Bodmer, J.G. und Bodmer, W.F. 1983.** Production and characterization of monoclonal antibodies recognizing the alpha-chain subunits of human Ia alloantigens. *Immunology* 50(4): S. 613–624.

**Adell, M.A.Y.; Vogel, G.F.; Pakdel, M.; Müller, M.; Lindner, H.; Hess, M.W. und Teis, D. 2014.** Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation. *J. Cell. Biol.* 205(1): S. 33–49.

**Ahmed, M.; Lock, M.; Miller, C.G. und Fraser, N.W. 2002.** Regions of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript that protect cells from apoptosis in vitro and protect neuronal cells in vivo. *J. Virol.* 76(2): S. 717–729.

**Alam, S.L.; Langelier, C.; Whitby, F.G.; Koirala, S.; Robinson, H.; Hill, C.P. und Sundquist, W.I. 2006.** Structural basis for ubiquitin recognition by the human ESCRT-II EAP45 GLUE domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(11): S. 1029–1030.

**Almqvist, N.; Lönnqvist, A.; Hultkrantz, S.; Rask, C. und Telemo, E. 2008.** Serum-derived exosomes from antigen-fed mice prevent allergic sensitization in a model of allergic asthma. *Immunology* 125(1): S. 21–27.

**Amici, C.; Rossi, A.; Costanzo, A.; Ciafrè, S.; Marinari, B.; Balsamo, M.; Levrero, M. und Santoro, M.G. 2006.** Herpes simplex virus disrupts NF-kappaB regulation by blocking its recruitment on the IkappaBalpha promoter and directing the factor on viral genes. *J. Biol. Chem.* 281(11): S. 7110–7117.

**Anders, A.-K.; Call, M.J.; Schulze, M.-S.E.D.; Fowler, K.D.; Schubert, D.A.; Seth, N.P.; Sundberg, E.J. und Wucherpfennig, K.W. 2011.** HLA-DM captures partially empty HLA-DR molecules for catalyzed removal of peptide. *Nat. Immunol.* 12(1): S. 54–61.

**Anderson, K.S. und Cresswell, P. 1994.** A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J.* 13(3): S. 675–682.

**Anderson, M.S. und Miller, J.H. 1992.** Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89(6): S. 2282–2286.

**Arduino, P.G. und Porter, S.R. 2008.** Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med* 37(2): S. 107–121.

**Arneson, L.S. und Miller, J.H. 1995.** Efficient endosomal localization of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes requires multimerization of the invariant chain targeting sequence. *J. Cell. Biol.* 129(5): S. 1217–1228.

**Atanasiu, D.; Saw, W.T.; Cohen, G.H. und Eisenberg, R.J. 2010.** Cascade of events governing cell-cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH/gL, and gB. *J. Virol.* 84(23): S. 12292–12299.

**Avitabile, E.; Forghieri, C. und Campadelli-Fiume, G. 2007.** Complexes between herpes simplex virus glycoproteins gD, gB, and gH detected in cells by complementation of split enhanced green fluorescent protein. *J. Virol.* 81(20): S. 11532–11537.

**Avitabile, E.; Forghieri, C. und Campadelli-Fiume, G. 2009.** Cross talk among the glycoproteins involved in herpes simplex virus entry and fusion: the interaction between gB and gH/gL does not necessarily require gD. *J. Virol.* 83(20): S. 10752–10760.

**Avitabile, E.; Lombardi, G.; Gianni, T.; Capri, M. und Campadelli-Fiume, G. 2004.** Coexpression of UL20p and gK inhibits cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH-gL, and wild-type gB or an endocytosis-defective gB mutant and downmodulates their cell surface expression. *J. Virol.* 78(15): S. 8015–8025.

**Babst, M.; Wendland, B.; Estepa, E.J. und Emr, S.D. 1998.** The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* 17(11): S. 2982–2993.

- Bache, K.G.; Brech, A.; Mehlum, A. und Stenmark, H. 2003.** Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J. Cell. Biol.* 162(3): S. 435–442.
- Backovic, M.; Longnecker, R. und Jardetzky, T.S. 2009.** Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(8): S. 2880–2885.
- Baghian, A.; Huang, L.; Newman, S.; Jayachandra, S. und Kousoulas, K.G. 1993.** Truncation of the carboxy-terminal 28 amino acids of glycoprotein B specified by herpes simplex virus type 1 mutant amb1511-7 causes extensive cell fusion. *J. Virol.* 67(4): S. 2396–2401.
- Bakela, K.; Kountourakis, N.; Aivaliotis, M. und Athanassakis, I. 2015.** Soluble MHC-II proteins promote suppressive activity in CD4+ T cells. *Immunology* 144(1): S. 158–169.
- Bakke, O. und Dobberstein, B. 1990.** MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63(4): S. 707–716.
- Balderhaar, H.J.; Lachmann, J.; Yavavli, E.; Bröcker, C.; Lürick, A. und Ungermann, C. 2013.** The CORVET complex promotes tethering and fusion of Rab5/Vps21-positive membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110(10): S. 3823–3828.
- Barnstable, C.J.; Bodmer, W.F.; Brown, G.; Galfre, G.; Milstein, C.; Williams, A.F. und Ziegler, A. 1978.** Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens—new tools for genetic analysis. *Cell* 14(1): S. 9–20.
- Barois, N.; de Saint-Vis, B.; Lebecque, S.; Geuze, H.J. und Kleijmeer, M.J. 2002.** MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation. *Traffic* 3(12): S. 894–905.
- Barr, F.A. und Lambright, D.G. 2010.** Rab GEFs and GAPs. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 22(4): S. 461–470.
- Beitia Ortiz de Zarate, I.; Cantero-Aguilar, L.; Longo, M.; Berlioz-Torrent, C. und Rozenberg, F. 2007.** Contribution of endocytic motifs in the cytoplasmic tail of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B to virus replication and cell-cell fusion. *J. Virol.* 81(24): S. 13889–13903.
- Beitia Ortiz de Zarate, I.; Kaelin, K. und Rozenberg, F. 2004.** Effects of mutations in the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B on intracellular transport and infectivity. *J. Virol.* 78(3): S. 1540–1551.
- Bello-Morales, R.; Crespillo, A.J.; Fraile-Ramos, A.; Tabarés, E.; Alcina, A. und López-Guerrero, J.A. 2012.** Role of the small GTPase Rab27a during herpes simplex virus infection of oligodendrocytic cells. *BMC Microbiol.* 12: S. 265.
- Bergeland, T.; Haugen, L.; Landsverk, O.J.; Stenmark, H. und Bakke, O. 2008.** Cell-cycle-dependent binding kinetics for the early endosomal tethering factor EEA1. *EMBO Rep.* 9(2): S. 171–178.
- Bijlmakers, M.J.; Bénaroch, P. und Ploegh, H.L. 1994a.** Assembly of HLA DR1 molecules translated in vitro: binding of peptide in the endoplasmic reticulum precludes association with invariant chain. *EMBO J.* 13(11): S. 2699–2707.
- Bijlmakers, M.J.; Bénaroch, P. und Ploegh, H.L. 1994b.** Mapping functional regions in the luminal domain of the class II-associated invariant chain. *J. Exp. Med.* 180(2): S. 623–629.
- Bobrie, A.; Colombo, M.; Raposo, G. und Théry, C. 2011.** Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic* 12(12): S. 1659–1668.
- Bocuk, D. 2012.** Einfluss des Glykoprotein B verschiedener Herpesviren auf die Morphologie endosomaler Vesikel. *Diplomarbeit Universität Bonn.*
- Boehm, U.; Klamp, T.; Groot, M. und Howard, J.C. 1997.** Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 15: S. 749–795.
- Bolte, S. und Cordelieres, F.P. 2006.** A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224(Pt 3): S. 213–232.
- Bonnerot, C.; Marks, M.S.; Cosson, P.; Robertson, E.J.; Bikoff, E.K.; Germain, R.N. und Bonifacino, J.S. 1994.** Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *EMBO J.* 13(4): S. 934–944.
- Bosch, B.; Berger, A.C.; Khandelwal, S.; Heipertz, E.L.; Scharf, B.; Santambrogio, L. und Roche, P.A. 2013.** Disruption of multivesicular body vesicles does not affect major histocompatibility complex (MHC) class II-peptide complex formation and antigen presentation by dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 288(34): S. 24286–24292.

- Boyle, L.H.; Gillingham, A.K.; Munro, S. und Trowsdale, J. 2006.** Selective export of HLA-F by its cytoplasmic tail. *J Immunol* 176(11): S. 6464–6472.
- Brachet, V.; Péhau-Arnaudet, G.; Desaynard, C.; Raposo, G. und Amigorena, S. 1999.** Early endosomes are required for major histocompatibility complex class II transport to peptide-loading compartments. *Mol. Biol. Cell.* 10(9): S. 2891–2904.
- Brown, J.H.; Jardetzky, T.S.; Gorga, J.C.; Stern, L.J.; Urban, R.G.; Strominger, J.L. und Wiley, D.C. 1993.** Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364(6432): S. 33–39.
- Buchkovich, N.J.; Henne, W.M.; Tang, S. und Emr, S.D. 2013.** Essential N-terminal insertion motif anchors the ESCRT-III filament during MVB vesicle formation. *Dev. Cell* 27(2): S. 201–214.
- Buschow, S.I.; Nolte-’t Hoen, E.N.; van Niel, G.; Pols, M.S.; ten Broeke, T.; Lauwen, M.; Ossendorp, F.A.; Melief, C.J.; Raposo, G.; Wubbolts, R.; Wauben, M.H.M. und Stoorvogel, W. 2009.** MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic* 10(10): S. 1528–1542.
- Cairns, T.M.; Whitbeck, J.C.; Lou, H.; Heldwein, E.E.; Chowdary, T.K.; Eisenberg, R.J. und Cohen, G.H. 2011.** Capturing the herpes simplex virus core fusion complex (gB-gH/gL) in an acidic environment. *J. Virol.* 85(13): S. 6175–6184.
- Calistri, A.; Sette, P.; Salata, C.; Cancellotti, E.; Forghieri, C.; Comin, A.; Göttlinger, H.G.; Campadelli-Fiume, G.; Palù, G. und Parolin, C. 2007.** Intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies. *J. Virol.* 81(20): S. 11468–11478.
- Cantisani, M.; Falanga, A.; Incoronato, N.; Russo, L.; Simone, A. de; Morelli, G.; Berisio, R.; Galdiero, M. und Galdiero, S. 2013.** Conformational modifications of gB from herpes simplex virus type 1 analyzed by synthetic peptides. *J Med Chem* 56(21): S. 8366–8376.
- Carpp, L.N.; Ciuffo, L.F.; Shanks, S.G.; Boyd, A. und Bryant, N.J. 2006.** The Sec1p/Munc18 protein Vps45p binds its cognate SNARE proteins via two distinct modes. *J. Cell. Biol.* 173(6): S. 927–936.
- Castellino, F. und Germain, R.N. 1995.** Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity* 2(1): S. 73–88.
- Castellino, F.; Han, R. und Germain, R.N. 2001.** The transmembrane segment of invariant chain mediates binding to MHC class II molecules in a CLIP-independent manner. *Eur. J. Immunol.* 31(3): S. 841–850.
- Chavrier, P.; Parton, R.G.; Hauri, H.P.; Simons, K. und Zerial, M. 1990.** Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62(2): S. 317–329.
- Chicz, R.M.; Urban, R.G.; Lane, W.S.; Gorga, J.C.; Stern, L.J.; Vignali, D.A. und Strominger, J.L. 1992.** Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 358(6389): S. 764–768.
- Cho, S.; Ryoo, J.; Jun, Y. und Ahn, K. 2011.** Receptor-mediated ER export of human MHC class I molecules is regulated by the C-terminal single amino acid. *Traffic* 12(1): S. 42–55.
- Chowdary, T.K. und Heldwein, E.E. 2010.** Syncytial phenotype of C-terminally truncated herpes simplex virus type 1 gB is associated with diminished membrane interactions. *J. Virol.* 84(10): S. 4923–4935.
- Christoforidis, S.; McBride, H.M.; Burgoyne, R.D. und Zerial, M. 1999.** The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397(6720): S. 621–625.
- Claesson, L.; Larhammar, D.; Rask, L. und Peterson, P.A. 1983.** cDNA clone for the human invariant gamma chain of class II histocompatibility antigens and its implications for the protein structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80(24): S. 7395–7399.
- Cocchi, F.; Menotti, L.; Mirandola, P.; Lopez, M. und Campadelli-Fiume, G. 1998.** The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin subfamily related to the poliovirus receptor has the attributes of a bona fide receptor for herpes simplex virus types 1 and 2 in human cells. *J. Virol.* 72(12): S. 9992–10002.

- Colombo, M.; Moita, C.F.; van Niel, G.; Kowal, J.; Vigneron, J.; Bénaroch, P.; Manel, N.; Moita, L.F.; Théry, C. und Raposo, G. 2013.** Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell. Sci.* 126(Pt 24): S. 5553–5565.
- Connolly, S.A. und Longnecker, R. 2012.** Residues within the C-terminal arm of the herpes simplex virus 1 glycoprotein B ectodomain contribute to its refolding during the fusion step of virus entry. *J. Virol.* 86(12): S. 6386–6393.
- Crump, C.M.; Yates, C. und Minson, T. 2007.** Herpes simplex virus type 1 cytoplasmic envelopment requires functional Vps4. *J. Virol.* 81(14): S. 7380–7387.
- Cunningham, A.L.; Turner, R.R.; Miller, A.C.; Para, M.F. und Merigan, T.C. 1985.** Evolution of recurrent herpes simplex lesions. An immunohistologic study. *J. Clin. Invest.* 75(1): S. 226–233.
- Dargan, D.J. und Subak-Sharpe, J.H. 1997.** The effect of herpes simplex virus type 1 L-particles on virus entry, replication, and the infectivity of naked herpesvirus DNA. *Virology* 239(2): S. 378–388.
- Davis-Poynter, N.; Bell, S.; Minson, T. und Browne, H. 1994.** Analysis of the contributions of herpes simplex virus type 1 membrane proteins to the induction of cell-cell fusion. *J. Virol.* 68(11): S. 7586–7590.
- de Gassart, A.; Camosseto, V.; Thibodeau, J.; Ceppi, M.; Catalan, N.; Pierre, P. und Gatti, E. 2008.** MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(9): S. 3491–3496.
- Denzin, L.K. und Cresswell, P. 1995.** HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82(1): S. 155–165.
- Denzin, L.K.; Hammond, C. und Cresswell, P. 1996.** HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J. Exp. Med.* 184(6): S. 2153–2165.
- Denzin, L.K.; Robbins, N.F.; Carboy-Newcomb, C. und Cresswell, P. 1994.** Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1(7): S. 595–606.
- Denzin, L.K.; Sant'Angelo, D.B.; Hammond, C.; Surman, M.J. und Cresswell, P. 1997.** Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. *Science* 278(5335): S. 106–109.
- Deshpande, S.P.; Kumaraguru, U. und Rouse, B.T. 2000.** Dual role of B cells in mediating innate and acquired immunity to herpes simplex virus infections. *Cell. Immunol.* 202(2): S. 79–87.
- Dollery, S.J.; Delboy, M.G. und Nicola, A.V. 2010.** Low pH-induced conformational change in herpes simplex virus glycoprotein B. *J. Virol.* 84(8): S. 3759–3766.
- Duclos, S.; Diez, R.; Garin, J.; Papadopoulou, B.; Descoteaux, A.; Stenmark, H. und Desjardins, M. 2000.** Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell. Sci.* 113 Pt 19: S. 3531–3541.
- Dufour, F.; Sasseville, A.M.-J.; Chabaud, S.; Massie, B.; Siegel, R.M. und Langelier, Y. 2011.** The ribonucleotide reductase R1 subunits of herpes simplex virus types 1 and 2 protect cells against TNFalpha- and FasL-induced apoptosis by interacting with caspase-8. *Apoptosis* 16(3): S. 256–271.
- Dumas, J.J.; Merithew, E.; Sudharshan, E.; Rajamani, D.; Hayes, S.; Lawe, D.; Corvera, S. und Lambright, D.G. 2001.** Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. *Mol. Cell.* 8(5): S. 947–958.
- Eathiraj, S.; Pan, X.; Ritacco, C. und Lambright, D.G. 2005.** Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. *Nature* 436(7049): S. 415–419.
- Edgar, J.R.; Eden, E.R. und Futter, C.E. 2014.** Hrs- and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles. *Traffic* 15(2): S. 197–211.
- Eis-Hübinger, A.M.; Schmidt, D.S. und Schneeweis, K.E. 1993.** Anti-glycoprotein B monoclonal antibody protects T cell-depleted mice against herpes simplex virus infection by inhibition of virus replication at the inoculated mucous membranes. *J. Gen. Virol.* 74(3): S. 379–385.
- Engering, A.J.; Richters, C.D.; Fluitsma, D.M.; van Pelt, A M; Kamperdijk, E.W.; Hoefsmit, E.C. und Pieters, J. 1998.** MHC class II and invariant chain biosynthesis and transport during maturation of human precursor dendritic cells. *Int. Immunol.* 10(11): S. 1713–1723.

- Falanga, A.; Tarallo, R.; Vitiello, G.; Vitiello, M.; Perillo, E.; Cantisani, M.; D'Errico, G.; Galdiero, M. und Galdiero, S. 2012.** Biophysical characterization and membrane interaction of the two fusion loops of glycoprotein B from herpes simplex type I virus. *PLoS ONE* 7(2): S. e32186.
- Fan, Z.; Grantham, M.L.; Smith, M.S.; Anderson, E.S.; Cardelli, J.A. und Muggeridge, M.I. 2002.** Truncation of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B increases its cell surface expression and activity in cell-cell fusion, but these properties are unrelated. *J. Virol.* 76(18): S. 9271–9283.
- Farnsworth, A.; Wisner, T.W.; Webb, M.; Roller, R.J.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J. und Johnson, D.C. 2007.** Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(24): S. 10187–10192.
- Favoreel, H.W.; van Minnebruggen, G.; Nauwynck, H.J.; Enquist, L.W. und Pensaert, M.B. 2002.** A tyrosine-based motif in the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein B is important for both antibody-induced internalization of viral glycoproteins and efficient cell-to-cell spread. *J. Virol.* 76(13): S. 6845–6851.
- Feldman, L.T.; Ellison, A.R.; Voytek, C.C.; Yang, L.; Krause, P. und Margolis, T.P. 2002.** Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(2): S. 978–983.
- Ferrante, A.; Anderson, M.W.; Klug, C.S. und Gorski, J. 2008.** HLA-DM mediates epitope selection by a "compare-exchange" mechanism when a potential peptide pool is available. *PLoS ONE* 3(11): S. e3722.
- Fling, S.P.; Arp, B. und Pious, D. 1994.** HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* 368(6471): S. 554–558.
- Forgac, M. 2007.** Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(11): S. 917–929.
- Foster, T.P.; Melancon, J.M. und Kousoulas, K.G. 2001.** An alpha-helical domain within the carboxyl terminus of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein B (gB) is associated with cell fusion and resistance to heparin inhibition of cell fusion. *Virology* 287(1): S. 18–29.
- Freisewinkel, I.M.; Schenck, K. und Koch, N. 1993.** The segment of invariant chain that is critical for association with major histocompatibility complex class II molecules contains the sequence of a peptide eluted from class II polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(20): S. 9703–9706.
- Früh, K.; Ahn, K.; Djaballah, H.; Sempé, P.; van Endert, P.M.; Tampé, R.; Peterson, P.A. und Yang, Y. 1995.** A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* 375(6530): S. 415–418.
- Furuta, K.; Walseng, E. und Roche, P.A. 2013.** Internalizing MHC class II-peptide complexes are ubiquitinated in early endosomes and targeted for lysosomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110(50): S. 20188–20193.
- Gallagher, J.R.; Atanasiu, D.; Saw, W.T.; Paradisgarten, M.J.; Whitbeck, J.C.; Eisenberg, R.J. und Cohen, G.H. 2014.** Functional fluorescent protein insertions in herpes simplex virus gB report on gB conformation before and after execution of membrane fusion. *PLoS Pathog.* 10(9): S. e1004373.
- Garcia, N.J.; Chen, J. und Longnecker, R. 2013.** Modulation of Epstein-Barr virus glycoprotein B (gB) fusion activity by the gB cytoplasmic tail domain. *MBio* 4(1): S. e00571-12.
- Gáspár, R.J.; Bagossi, P.; Bene, L.; Matkó, J.; Szöllösi, J.; Tözsér, J.; Fésüs, L.; Waldmann, T.A. und Damjanovich, S. 2001.** Clustering of class I HLA oligomers with CD8 and TCR: three-dimensional models based on fluorescence resonance energy transfer and crystallographic data. *J Immunol* 166(8): S. 5078–5086.
- Gengyo-Ando, K.; Kuroyanagi, H.; Kobayashi, T.; Murate, M.; Fujimoto, K.; Okabe, S. und Mitani, S. 2007.** The SM protein VPS-45 is required for RAB-5-dependent endocytic transport in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Rep.* 8(2): S. 152–157.
- Geraghty, R.J.; Krummenacher, C.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J. und Spear, P.G. 1998.** Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 280(5369): S. 1618–1620.
- Ghosh, P.; Amaya, M.; Mellins, E. und Wiley, D.C. 1995.** The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378(6556): S. 457–462.
- Gill, D.J.; Teo, H.; Sun, J.; Perisic, O.; Veprintsev, D.B.; Emr, S.D. und Williams, R.L. 2007.** Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J.* 26(2): S. 600–612.

- Gillooly, D.J.; Simonsen, A. und Stenmark, H. 2001.** Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. *Biochem. J.* 355(Pt 2): S. 249–258.
- Glazier, K.S.; Hake, S.B.; Tobin, H.M.; Chadburn, A.; Schattner, E.J. und Denzin, L.K. 2002.** Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. *J. Exp. Med.* 195(8): S. 1063–1069.
- Gluzman, Y. 1981.** SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23(1): S. 175–182.
- Gorvel, J.P.; Escola, J.M.; Stang, E. und Bakke, O. 1995.** Invariant chain induces a delayed transport from early to late endosomes. *J. Biol. Chem.* 270(6): S. 2741–2746.
- Gorvel, J.-P.; Chavrier, P.; Zerial, M. und Gruenberg, J. 1991.** rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64(5): S. 915–925.
- Gould, S.J.; Booth, A.M. und Hildreth, J.E. 2003.** The Trojan exosome hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(19): S. 10592–10597.
- Grubor-Bauk, B.; Arthur, J.L. und Mayrhofer, G. 2008.** Importance of NKT cells in resistance to herpes simplex virus, fate of virus-infected neurons, and level of latency in mice. *J. Virol.* 82(22): S. 11073–11083.
- Grünewald, K.; Desai, P.; Winkler, D.C.; Heymann, J.B.; Belnap, D.M.; Baumeister, W. und Steven, A.C. 2003.** Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* 302(5649): S. 1396–1398.
- Guce, A.I.; Mortimer, S.E.; Yoon, T.; Painter, C.A.; Jiang, W.; Mellins, E.D. und Stern, L.J. 2013.** HLA-DO acts as a substrate mimic to inhibit HLA-DM by a competitive mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20(1): S. 90–98.
- Haanes, E.J.; Nelson, C.M.; Soule, C.L. und Goodman, J.L. 1994.** The UL45 gene product is required for herpes simplex virus type 1 glycoprotein B-induced fusion. *J. Virol.* 68(9): S. 5825–5834.
- Hannah, B.P.; Heldwein, E.E.; Bender, F.C.; Cohen, G.H. und Eisenberg, R.J. 2007.** Mutational evidence of internal fusion loops in herpes simplex virus glycoprotein B. *J. Virol.* 81(9): S. 4858–4865.
- Harding, C.; Heuser, J. und Stahl, P. 1983.** Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell. Biol.* 97(2): S. 329–339.
- Heineman, T.C.; Connolly, P.; Hall, S.L. und Assefa, D. 2004.** Conserved cytoplasmic domain sequences mediate the ER export of VZV, HSV-1, and HCMV gB. *Virology* 328(1): S. 131–141.
- Heineman, T.C. und Hall, S.L. 2001.** VZV gB endocytosis and Golgi localization are mediated by YXXphi motifs in its cytoplasmic domain. *Virology* 285(1): S. 42–49.
- Heineman, T.C.; Krudwig, N. und Hall, S.L. 2000.** Cytoplasmic Domain Signal Sequences That Mediate Transport of Varicella-Zoster Virus gB from the Endoplasmic Reticulum to the Golgi. *J. Virol.* 74(20): S. 9421–9430.
- Heldwein, E.E.; Lou, H.; Bender, F.C.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J. und Harrison, S.C. 2006.** Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313(5784): S. 217–220.
- Hemler, M.E. 2005.** Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6(10): S. 801–811.
- Henne, W.M.; Buchkovich, N.J. und Emr, S.D. 2011.** The ESCRT pathway. *Dev. Cell* 21(1): S. 77–91.
- Henne, W.M.; Buchkovich, N.J.; Zhao, Y. und Emr, S.D. 2012.** The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. *Cell* 151(2): S. 356–371.
- Herold, B.C.; WuDunn, D.; Soltys, N. und Spear, P.G. 1991.** Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J. Virol.* 65(3): S. 1090–1098.
- Hill, A.; Jugovic, P.; York, I.; Russ, G.; Bennink, J.; Yewdell, J.; Ploegh, H. und Johnson, D. 1995.** Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 375(6530): S. 411–415.
- Hollinshead, M.; Johns, H.L.; Sayers, C.L.; Gonzalez-Lopez, C.; Smith, G.L. und Elliott, G. 2012.** Endocytic tubules regulated by Rab GTPases 5 and 11 are used for envelopment of herpes simplex virus. *EMBO J.* 31(21): S. 4204–4220.
- Hong, W. und Lev, S. 2014.** Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends Cell Biol.* 24(1): S. 35–43.

- Horiuchi, H.; Lippé, R.; McBride, H.M.; Rubino, M.; Woodman, P.; Stenmark, H.; Rybin, V.; Wilm, M.; Ashman, K.; Mann, M. und Zerial, M. 1997. A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* 90(6): S. 1149–1159.
- Hornell, T.M.C.; Burster, T.; Jahnsen, F.L.; Pashine, A.; Ochoa, M.T.; Harding, J.J.; Macaubas, C.; Lee, A.W.; Modlin, R.L. und Mellins, E.D. 2006. Human dendritic cell expression of HLA-DO is subset specific and regulated by maturation. *J Immunol* 176(6): S. 3536–3547.
- Hunt, D.F.; Michel, H.; Dickinson, T.A.; Shabanowitz, J.; Cox, A.L.; Sakaguchi, K.; Appella, E.; Grey, H.M. und Sette, A. 1992. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science* 256(5065): S. 1817–1820.
- Huotari, J. und Helenius, A. 2011. Endosome maturation. *EMBO J.* 30(17): S. 3481–3500.
- Jin, L.; Peng, W.; Perng, G.-C.; Brick, D.J.; Nesburn, A.B.; Jones, C. und Wechsler, S.L. 2003. Identification of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript sequences that both inhibit apoptosis and enhance the spontaneous reactivation phenotype. *J. Virol.* 77(11): S. 6556–6561.
- Johnson, D.C. und Baines, J.D. 2011. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat. Rev. Microbiol.* 9(5): S. 382–394.
- Johnson, D.C.; Wisner, T.W. und Wright, C.C. 2011. Herpes simplex virus glycoproteins gB and gD function in a redundant fashion to promote secondary envelopment. *J. Virol.* 85(10): S. 4910–4926.
- Johnson, J.P.; Demmer-Dieckmann, M.; Meo, T.; Hadam, M.R. und Riethmüller, G. 1981. Surface antigens of human melanoma cells defined by monoclonal antibodies. I. Biochemical characterization of two antigens found on cell lines and fresh tumors of diverse tissue origin. *Eur. J. Immunol.* 11(10): S. 825–831.
- Johnstone, R.M.; Adam, M.; Hammond, J.R.; Orr, L. und Turbide, C. 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262(19): S. 9412–9420.
- Karlsson, L.; Surh, C.D.; Sprent, J. und Peterson, P.A. 1991. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* 351(6326): S. 485–488.
- Katzmann, D.J.; Babst, M. und Emr, S.D. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106(2): S. 145–155.
- Katzmann, D.J.; Stefan, C.J.; Babst, M. und Emr, S.D. 2003. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J. Cell. Biol.* 162(3): S. 413–423.
- Kaufman, J.F.; Auffray, C.; Korman, A.J.; Shackelford, D.A. und Strominger, J. 1984. The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell* 36(1): S. 1–13.
- Kelly, A.P.; Monaco, J.J.; Cho, S.G. und Trowsdale, J. 1991. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* 353(6344): S. 571–573.
- Kim, J.Y.; Mandarino, A.; Chao, M.V.; Mohr, I. und Wilson, A.C. 2012. Transient reversal of episome silencing precedes VP16-dependent transcription during reactivation of latent HSV-1 in neurons. *PLoS Pathog.* 8(2): S. e1002540.
- Kleijmeer, M.J.; Ramm, G.; Schuurhuis, D.; Griffith, J.D.; Rescigno, M.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Rudensky, A.Y.; Ossendorp, F.A.; Melief, C.J.; Stoorvogel, W. und Geuze, H.J. 2001. Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J. Cell. Biol.* 155(1): S. 53–63.
- Knickelbein, J.E.; Khanna, K.M.; Yee, M.B.; Baty, C.J.; Kinchington, P.R. und Hendricks, R.L. 2008. Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science* 322(5899): S. 268–271.
- Kobayashi, T.; Beuchat, M.-H.; Chevallier, J.; Makino, A.; Mayran, N.; Escola, J.-M.; Lebrand, C.; Cosson, P.; Kobayashi, T. und Gruenberg, J. 2002. Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J. Biol. Chem.* 277(35): S. 32157–32164.
- Kobayashi, T.; Stang, E.; Fang, K.S.; Moerloose, P. de; Parton, R.G. und Gruenberg, J. 1998. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392(6672): S. 193–197.
- Koch, N. und Hämmerling, G.J. 1986. The HLA-D-associated invariant chain binds palmitic acid at the cysteine adjacent to the membrane segment. *J. Biol. Chem.* 261(7): S. 3434–3440.



- Koch, N.; Zacharias, M.; König, A.; Temme, S.; Neumann, J. und Springer, S. 2011.** Stoichiometry of HLA class II-invariant chain oligomers. *PLoS ONE*. 6(2): S. e17257.
- Koelle, D.M.; Posavad, C.M.; Barnum, G.R.; Johnson, M.L.; Frank, J.M. und Corey, L. 1998.** Clearance of HSV-2 from recurrent genital lesions correlates with infiltration of HSV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 101(7): S. 1500–1508.
- Kozik, P.; Francis, R.W.; Seaman, M.N.J. und Robinson, M.S. 2010.** A screen for endocytic motifs. *Traffic* 11(6): S. 843–855.
- Kropshofer, H.; Arndt, S.O.; Moldenhauer, G.; Hämmerling, G.J. und Vogt, A.B. 1997.** HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* 6(3): S. 293–302.
- Kropshofer, H.; Vogt, A.B.; Moldenhauer, G.; Hammer, J.; Blum, J.S. und Hämmerling, G.J. 1996.** Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J.* 15(22): S. 6144–6154.
- Lakadamyali, M.; Rust, M.J. und Zhuang, X. 2006.** Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* 124(5): S. 997–1009.
- Lamb, C.A.; Yoshimori, T. und Tooze, S.A. 2013.** The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14(12): S. 759–774.
- Landsverk, O.J.; Barois, N.; Gregers, T.F. und Bakke, O. 2011.** Invariant chain increases the half-life of MHC II by delaying endosomal maturation. *Immunol. Cell Biol.* 89(5): S. 619–629.
- Lanier, L.L.; Gutman, G.A.; Lewis, D.E.; Griswold, S.T. und Warner, N.L. 1982.** Monoclonal antibodies against rat immunoglobulin kappa chains. *Hybridoma* 1(2): S. 125–131.
- Lapaque, N.; Jahnke, M.; Trowsdale, J. und Kelly, A.P. 2009.** The HLA-DRalpha chain is modified by polyubiquitination. *J. Biol. Chem.* 284(11): S. 7007–7016.
- Lata, S.; Schoehn, G.; Jain, A.; Pires, R.; Piehler, J.; Göttliger, H.G. und Weissenhorn, W. 2008.** Helical Structures of ESCRT-III are Disassembled by VPS4. *Science* 321(5894): S. 1354–1357.
- Lenassi, M.; Cagney, G.; Liao, M.; Vaupotic, T.; Bartholomeeusen, K.; Cheng, Y.; Krogan, N.J.; Plemenitas, A. und Peterlin, B.M. 2010.** HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. *Traffic* 11(1): S. 110–122.
- Li, Y.; Zhao, Y.; Hu, J.; Xiao, J.; Qu, L.; Wang, Z.; Ma, D. und Chen, Y. 2013.** A novel ER-localized transmembrane protein, EMC6, interacts with RAB5A and regulates cell autophagy. *Autophagy* 9(2): S. 150–163.
- Liljedahl, M.; Kuwana, T.; Fung-Leung, W.P.; Jackson, M.R.; Peterson, P.A. und Karlsson, L. 1996.** HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* 15(18): S. 4817–4824.
- Lippé, R.; Miaczynska, M.; Rybin, V.; Runge, A. und Zerial, M. 2001.** Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Mol. Biol. Cell.* 12(7): S. 2219–2228.
- Liu, S.-H.; Marks, M.S. und Brodsky, F.M. 1998.** A Dominant-negative Clathrin Mutant Differentially Affects Trafficking of Molecules with Distinct Sorting Motifs in the Class II Major Histocompatibility Complex (MHC) Pathway. *J. Cell. Biol.* 140(5): S. 1023–1037.
- Liu, T.; Khanna, K.M.; Chen, X.; Fink, D.J. und Hendricks, R.L. 2000.** Cd8+ T Cells Can Block Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Reactivation from Latency in Sensory Neurons. *J. Exp. Med.* 191(9): S. 1459–1466.
- Loret, S.; Guay, G. und Lippé, R. 2008.** Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* 82(17): S. 8605–8618.
- Lotteau, V.; Teyton, L.; Peleraux, A.; Nilsson, T.; Karlsson, L.; Schmid, S.L.; Quaranta, V. und Peterson, P.A. 1990.** Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348(6302): S. 600–605.
- Manickan, E. und Rouse, B.T. 1995.** Roles of different T-cell subsets in control of herpes simplex virus infection determined by using T-cell-deficient mouse-models. *J. Virol.* 69(12): S. 8178–8179.
- Marks, M.S.; Blum, J.S. und Cresswell, P. 1990.** Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J. Cell. Biol.* 111(3): S. 839–855.

- Marks, M.S.; Woodruff, L.; Ohno, H. und Bonifacino, J.S. 1996.** Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J. Cell. Biol.* 135(2): S. 341–354.
- Matsuo, H.; Chevallier, J.; Mayran, N.; Le Blanc, I.; Ferguson, C.; Fauré, J.; Blanc, N.S.; Matile, S.; Dubochet, J.; Sadoul, R.; Parton, R.G.; Vilbois, F. und Gruenberg, J. 2004.** Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303(5657): S. 531–534.
- Maurer, U.E.; Zeev-Ben-Mordehai, T.; Pandurangan, A.P.; Cairns, T.M.; Hannah, B.P.; Whitbeck, J.C.; Eisenberg, R.J.; Cohen, G.H.; Topf, M.; Huiskonen, J.T. und Grünewald, K. 2013.** The structure of herpesvirus fusion glycoprotein B-bilayer complex reveals the protein-membrane and lateral protein-protein interaction. *Structure* 21(8): S. 1396–1405.
- Mayle, K.M.; Le, A.M. und Kamei, D.T. 2012.** The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1820(3): S. 264–281.
- McCormick, P.J.; Martina, J.A. und Bonifacino, J.S. 2005.** Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(22): S. 7910–7915.
- McLauchlan, J.; Addison, C.; Craigie, M.C. und Rixon, F.J. 1992.** Noninfectious L-particles supply functions which can facilitate infection by HSV-1. *Virology* 190(2): S. 682–688.
- McWilliam, H.; Li, W.; Uludag, M.; Squizzato, S.; Park, Y.M.; Buso, N.; Cowley, A.P. und Lopez, R. 2013.** Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 41(W1): S. W597-600.
- Medici, M.A.; Sciortino, M.T.; Perri, D.; Amici, C.; Avitabile, E.; Ciotti, M.; Balestrieri, E.; de Smaele, E.; Franzoso, G. und Mastino, A. 2003.** Protection by herpes simplex virus glycoprotein D against Fas-mediated apoptosis: role of nuclear factor kappaB. *J. Biol. Chem.* 278(38): S. 36059–36067.
- Mettenleiter, T.C.; Klupp, B.G. und Granzow, H. 2006.** Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr. Opin. Microbiol.* 9(4): S. 423–429.
- Mieczynska, M.; Pelkmans, L. und Zerial, M. 2004.** Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 16(4): S. 400–406.
- Mikloska, Z. und Cunningham, A.L. 1998.** Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 2): S. 353–361.
- Mishra, A.; Eathiraj, S.; Corvera, S. und Lambright, D.G. 2010.** Structural basis for Rab GTPase recognition and endosome tethering by the C2H2 zinc finger of Early Endosomal Autoantigen 1 (EEA1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(24): S. 10866–10871.
- Möbius, W.; van Donselaar, E.; Ohno-Iwashita, Y.; Shimada, Y.; Heijnen, H.F.; Slot, J.W. und Geuze, H.J. 2003.** Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic* 4(4): S. 222–231.
- Montgomery, R.I.; Warner, M.S.; Lum, B.J. und Spear, P.G. 1996.** Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87(3): S. 427–436.
- Morris, P.; Shaman, J.; Attaya, M.; Amaya, M.; Goodman, S.; Bergman, C.; Monaco, J.J. und Mellins, E.D. 1994.** An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* 368(6471): S. 551–554.
- Muggeridge, M.I. 2012.** Glycoprotein B of herpes simplex virus 2 has more than one intracellular conformation and is altered by low pH. *J. Virol.* 86(12): S. 6444–6456.
- Müller, D.B.; Raftery, M.J.; Kather, A.; Giese, T. und Schönrich, G. 2004.** Frontline: Induction of apoptosis and modulation of c-FLIPL and p53 in immature dendritic cells infected with herpes simplex virus. *Eur. J. Immunol.* 34(4): S. 941–951.
- Muntasell, A.; Berger, A.C. und Roche, P.A. 2007.** T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *EMBO J.* 26(19): S. 4263–4272.
- Murray, J.T.; Panaretou, C.; Stenmark, H.; Mieczynska, M. und Backer, J.M. 2002.** Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic* 3(6): S. 416–427.
- Nakagawa, T.; Roth, W.; Wong, P.; Nelson, A.; Farr, A.; Deussing, J.; Villadangos, J.A.; Ploegh, H.L.; Peters, C. und Rudensky, A.Y. 1998.** Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280(5362): S. 450–453.
- Nakanishi, Y.; Lu, B.; Gerard, C. und Iwasaki, A. 2009.** CTL mobilization to virus-infected tissue requires CD4+ T cell help. *Nature* 462(7272): S. 510–513.

- Navaroli, D.M.; Bellvé, K.D.; Standley, C.; Lifshitz, L.M.; Cardia, J.; Lambright, D.G.; Leonard, D.; Fogarty, K.E. und Corvera, S. 2012. Rabenosyn-5 defines the fate of the transferrin receptor following clathrin-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(8): S. 471–480.
- Neefjes, J.; Jongasma, M.L.M.; Paul, P. und Bakke, O. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 11(12): S. 823–836.
- Neumann, J.; Eis-Hübinger, A.M. und Koch, N. 2003. Herpes simplex virus type 1 targets the MHC class II processing pathway for immune evasion. *J Immunol* 171(6): S. 3075–3083.
- Neumann, J. und Koch, N. 2006. A novel domain on HLA-DRbeta chain regulates the chaperone role of the invariant chain. *J. Cell. Sci.* 119(Pt 20): S. 4207–4214.
- Nichols, W.W.; Murphy, D.G.; Cristofalo, V.J.; Toji, L.H.; Greene, A.E. und Dwight, S.A. 1977. Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* 196(4285): S. 60–63.
- Nielsen, E.; Christoforidis, S.; Uttenweiler-Joseph, S.; Miaczynska, M.; Dewitte, F.; Wilm, M.; Hoflack, B. und Zerial, M. 2000. Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J. Cell. Biol.* 151(3): S. 601–612.
- Nielsen, E.; Severin, F.; Backer, J.M.; Hyman, A.A. und Zerial, M. 1999. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat. Cell Biol.* 1(6): S. 376–382.
- Nolte-'t Hoen, E.N.M.; Buschow, S.I.; Anderton, S.M.; Stoorvogel, W. und Wauben, Marca H M 2009. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood* 113(9): S. 1977–1981.
- Nordeng, T.W.; Gregers, T.F.; Kongsvik, T.L.; Méresse, S.; Gorvel, J.-P.; Jourdan, F.; Motta, A. und Bakke, O. 2002. The cytoplasmic tail of invariant chain regulates endosome fusion and morphology. *Mol. Biol. Cell.* 13(6): S. 1846–1856.
- Ohya, T.; Miaczynska, M.; Coskun, U.; Lommer, B.; Runge, A.; Drechsel, D.; Kalaidzidis, Y. und Zerial, M. 2009. Reconstitution of Rab- and SNARE-dependent membrane fusion by synthetic endosomes. *Nature* 459(7250): S. 1091–1097.
- Östman, S.; Taube, M. und Telemo, E. 2005. Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent. *Immunology* 116(4): S. 464–476.
- Pan, B.T.; Teng, K.; Wu, C.; Adam, M. und Johnstone, R.M. 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell. Biol.* 101(3): S. 942–948.
- Pandey, K.N. 2009. Functional roles of short sequence motifs in the endocytosis of membrane receptors. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*. 14: S. 5339–5360.
- Pashine, A.; Busch, R.; Belmares, M.P.; Munning, J.N.; Doebele, R.C.; Buckingham, M.; Nolan, G.P. und Mellins, E.D. 2003. Interaction of HLA-DR with an Acidic Face of HLA-DM Disrupts Sequence-Dependent Interactions with Peptides. *Immunity* 19(2): S. 183–192.
- Pawliczek, T. und Crump, C.M. 2009. Herpes simplex virus type 1 production requires a functional ESCRT-III complex but is independent of TSG101 and ALIX expression. *J. Virol.* 83(21): S. 11254–11264.
- Pegtel, D.M.; Cosmopoulos, K.; Thorley-Lawson, D.A.; van Eijndhoven, M.A.J.; Hopmans, E.S.; Lindenberg, J.L.; de Gruijl, Tanja D; Würdinger, T. und Middeldorp, J.M. 2010. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(14): S. 6328–6333.
- Pentcheva, T. und Edidin, M. 2001. Clustering of peptide-loaded MHC class I molecules for endoplasmic reticulum export imaged by fluorescence resonance energy transfer. *J Immunol* 166(11): S. 6625–6632.
- Perez-Hernandez, D.; Gutiérrez-Vázquez, C.; Jorge, I.; López-Martín, S.; Ursa, A.; Sánchez-Madrid, F.; Vázquez, J. und Yáñez-Mó, M. 2013. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J. Biol. Chem.* 288(17): S. 11649–11661.
- Petersen, S.H.; Odintsova, E.; Haigh, T.A.; Rickinson, A.B.; Taylor, G.S. und Berditchevski, F. 2011. The role of tetraspanin CD63 in antigen presentation via MHC class II. *Eur. J. Immunol.* 41(9): S. 2556–2561.
- Pfeffer, S.R. und Rothman, J.E. 1987. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu. Rev. Biochem.* 56: S. 829–852.

- Pierre, P.; Denzin, L.K.; Hammond, C.; Drake, J.R.; Amigorena, S.; Cresswell, P. und Mellman, I. 1996. HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. *Immunity* 4(3): S. 229–239.
- Pierre, P.; Turley, S.J.; Gatti, E.; Hull, M.; Meltzer, J.; Mirza, A.; Inaba, K.; Steinman, R.M. und Mellman, I. 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388(6644): S. 787–792.
- Pober, J.S.; Collins, T.; Gimbrone, M.J.; Cotran, R.S.; Gitlin, J.D.; Fiers, W.; Clayberger, C.; Krensky, A.M.; Burakoff, S.J. und Reiss, C.S. 1983. Lymphocytes recognize human vascular endothelial and dermal fibroblast Ia antigens induced by recombinant immune interferon. *Nature* 305(5936): S. 726–729.
- Pos, W.; Sethi, D.K.; Call, M.J.; Schulze, M.-S.E.D.; Anders, A.-K.; Pyrdol, J. und Wucherpfennig, K.W. 2012. Crystal structure of the HLA-DM-HLA-DR1 complex defines mechanisms for rapid peptide selection. *Cell* 151(7): S. 1557–1568.
- Prechtel, A.T.; Turza, N.M.; Kobelt, D.J.; Eisemann, J.I.; Coffin, R.S.; McGrath, Y.; Hacker, C.; Ju, X.; Zenke, M. und Steinkasserer, A. 2005. Infection of mature dendritic cells with herpes simplex virus type 1 dramatically reduces lymphoid chemokine-mediated migration. *J. Gen. Virol.* 86(Pt 6): S. 1645–1657.
- Quaranta, V.; Majdic, O.; Stingl, G.; Liszka, K.; Honigsmann, H. und Knapp, W. 1984. A human Ia cytoplasmic determinant located on multiple forms of invariant chain (gamma, gamma 2, gamma 3). *J Immunol* 132(4): S. 1900–1905.
- Radivojac, P.; Vacic, V.; Haynes, C.; Cocklin, R.R.; Mohan, A.; Heyen, J.W.; Goebel, M.G. und Iakoucheva, L.M. 2010. Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins* 78(2): S. 365–380.
- Radtke, K.; Kieneke, D.; Wolfstein, A.; Michael, K.; Steffen, W.; Scholz, T.; Karger, A. und Sodeik, B. 2010. Plus- and Minus-End Directed Microtubule Motors Bind Simultaneously to Herpes Simplex Virus Capsids Using Different Inner Tegument Structures. *PLoS Pathog.* 6(7):
- Rahajeng, J.; Caplan, S. und Naslavsky, N. 2010. Common and distinct roles for the binding partners Rabenosyn-5 and Vps45 in the regulation of endocytic trafficking in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 316(5): S. 859–874.
- Raiborg, C.; Bremnes, B.; Mehlum, A.; Gillooly, D.J.; D'Arrigo, A.; Stang, E. und Stenmark, H. 2001. FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J. Cell. Sci.* 114(Pt 12): S. 2255–2263.
- Rao, P.; Pham, H.T.; Kulkarni, A.; Yang, Y.; Liu, X.; Knipe, D.M.; Cresswell, P. und Yuan, W. 2011. Herpes simplex virus 1 glycoprotein B and US3 collaborate to inhibit CD1d antigen presentation and NKT cell function. *J. Virol.* 85(16): S. 8093–8104.
- Raposo, G.; Nijman, H.W.; Stoorvogel, W.; Liejendekker, R.; Harding, C.V.; Melief, C.J. und Geuze, H.J. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183(3): S. 1161–1172.
- Riberdy, J.M.; Newcomb, J.R.; Surman, M.J.; Barbosa, J.A. und Cresswell, P. 1992. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360(6403): S. 474–477.
- Riese, R.J.; Wolf, P.R.; Brömme, D.; Natkin, L.R.; Villadangos, J.A.; Ploegh, H.L. und Chapman, H.A. 1996. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4(4): S. 357–366.
- Roche, P.A. und Cresswell, P. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345(6276): S. 615–618.
- Roche, P.A.; Marks, M.S. und Cresswell, P. 1991. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354(6352): S. 392–394.
- Rodionov, D.G. und Bakke, O. 1998. Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain. *J. Biol. Chem.* 273(11): S. 6005–6008.
- Rubino, M.; Miaczynska, M.; Lippé, R. und Zerial, M. 2000. Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J. Biol. Chem.* 275(6): S. 3745–3748.
- Rudensky, A.Y.; Preston-Hurlburt, P.; Hong, S.C.; Barlow, A. und Janeway, C.A.J. 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353(6345): S. 622–627.

- Ruel, N.; Zago, A. und Spear, P.G. 2006. Alanine substitution of conserved residues in the cytoplasmic tail of herpes simplex virus gB can enhance or abolish cell fusion activity and viral entry. *Virology* 346(1): S. 229–237.
- Sagou, K.; Uema, M. und Kawaguchi, Y. 2010. Nucleolin is required for efficient nuclear egress of herpes simplex virus type 1 nucleocapsids. *J. Virol.* 84(4): S. 2110–2121.
- Sanderson, F.; Kleijmeer, M.J.; Kelly, A.P.; Verwoerd, D.; Tulp, A.; Neefjes, J.; Geuze, H.J. und Trowsdale, J. 1994. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* 266(5190): S. 1566–1569.
- Sato, M.; Sato, K.; Fonarev, P.; Huang, C.-J.; Liou, W. und Grant, B.D. 2005. Caenorhabditis elegans RME-6 is a novel regulator of RAB-5 at the clathrin-coated pit. *Nat. Cell Biol.* 7(6): S. 559–569.
- Satoh, T.; Arai, J.; Suenaga, T.; Wang, J.; Kogure, A.; Uehori, J.; Arase, N.; Shiratori, I.; Tanaka, S.; Kawaguchi, Y.; Spear, P.G.; Lanier, L.L. und Arase, H. 2008. PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell* 132(6): S. 935–944.
- Schmid, D.S. 1988. The human MHC-restricted cellular response to herpes simplex virus type 1 is mediated by CD4+, CD8- T cells and is restricted to the DR region of the MHC complex. *J Immunol* 140(10): S. 3610–3616.
- Schu, P.V.; Takegawa, K.; Fry, M.J.; Stack, J.H.; Waterfield, M.D. und Emr, S.D. 1993. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 260(5104): S. 88–91.
- Segura, E.; Guérin, C.; Hogg, N.; Amigorena, S. und Théry, C. 2007. CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J Immunol* 179(3): S. 1489–1496.
- Sharma, S.; Wisner, T.W.; Johnson, D.C. und Heldwein, E.E. 2013. HCMV gB shares structural and functional properties with gB proteins from other herpesviruses. *Virology* 435(2): S. 239–249.
- Shelly, S.S.; Cairns, T.M.; Whitbeck, J.C.; Lou, H.; Krummenacher, C.; Cohen, G.H. und Eisenberg, R.J. 2012. The membrane-proximal region (MPR) of herpes simplex virus gB regulates association of the fusion loops with lipid membranes. *MBio* 3(6): S. e00429-12.
- Shen, J.; Tareste, D.C.; Paumet, F.; Rothman, J.E. und Melia, T.J. 2007. Selective Activation of Cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 Proteins. *Cell* 128(1): S. 183–195.
- Shen, W.; Sa e Silva, Mariana; Jaber, T.; Vitvitskaia, O.; Li, S.; Henderson, G. und Jones, C. 2009. Two small RNAs encoded within the first 1.5 kilobases of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript can inhibit productive infection and cooperate to inhibit apoptosis. *J. Virol.* 83(18): S. 9131–9139.
- Sherman, M.A.; Weber, D.A. und Jensen, P.E. 1995. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* 3(2): S. 197–205.
- Shields, S.B.; Oestreich, A.J.; Winistorfer, S.C.; Nguyen, D.; Payne, J.A.; Katzmann, D.J. und Piper, R. 2009. ESCRT ubiquitin-binding domains function cooperatively during MVB cargo sorting. *J. Cell. Biol.* 185(2): S. 213–224.
- Shih, S.C.; Katzmann, D.J.; Schnell, J.D.; Sutanto, M.; Emr, S.D. und Hicke, L. 2002. Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 4(5): S. 389–393.
- Shim, S.; Merrill, S.A. und Hanson, P.I. 2008. Novel Interactions of ESCRT-III with LIP5 and VPS4 and their Implications for ESCRT-III Disassembly. *Mol. Biol. Cell.* 19(6): S. 2661–2672.
- Shin, H.-W.; Hayashi, M.; Christoforidis, S.; Lacas-Gervais, S.; Hoepfner, S.; Wenk, M.R.; Modregger, J.; Uttenweiler-Joseph, S.; Wilm, M.; Nystuen, A.; Frankel, W.N.; Solimena, M.; Camilli, P. de und Zerial, M. 2005. An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J. Cell. Biol.* 170(4): S. 607–618.
- Shin, J.-S.; Ebersold, M.; Pypaert, M.; Delamarre, L.; Hartley, A. und Mellman, I. 2006. Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature* 444(7115): S. 115–118.
- Shukla, D.; Liu, J.; Blaiklock, P.; Shworak, N.W.; Bai, X.; Esko, J.D.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J.; Rosenberg, R.D. und Spear, P.G. 1999. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99(1): S. 13–22.

- Sievers, E.; Neumann, J.; Raftery, M.; Schönrich, G.; Eis-Hübinger, A.M. und Koch, N. 2002.** Glycoprotein B from strain 17 of herpes simplex virus type I contains an invariant chain homologous sequence that binds to MHC class II molecules. *Immunology* 107(1): S. 129–135.
- Silverman, J.L.; Greene, N.G.; King, D.S. und Heldwein, E.E. 2012.** Membrane requirement for folding of the herpes simplex virus 1 gB cytodomain suggests a unique mechanism of fusion regulation. *J. Virol.* 86(15): S. 8171–8184.
- Simonsen, A.; Lippé, R.; Christoforidis, S.; Gaullier, J.M.; Brech, A.; Callaghan, J.; Toh, B.-H.; Murphy, C.; Zerial, M. und Stenmark, H. 1998.** EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394(6692): S. 494–498.
- Singer, P.A.; Lauer, W.; Dembic, Z.; Mayer, W.E.; Lipp, J.; Koch, N.; Hämmerling, G.J.; Klein, J. und Dobberstein, B. 1984.** Structure of the murine Ia-associated invariant (Ii) chain as deduced from a cDNA clone. *EMBO J.* 3(4): S. 873–877.
- Sloan, V.S.; Cameron, P.; Porter, G.; Gammon, M.; Amaya, M.; Mellins, E.D. und Zaller, D.M. 1995.** Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 375(6534): S. 802–806.
- Smith, C.M.; Wilson, N.S.; Waithman, J.; Villadangos, J.A.; Carbone, F.R.; Heath, W.R. und Belz, G.T. 2004.** Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat. Immunol.* 5(11): S. 1143–1148.
- Stam, N.J.; Spits, H. und Ploegh, H.L. 1986.** Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products. *J Immunol* 137(7): S. 2299–2306.
- Stampfer, S.D.; Lou, H.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J. und Heldwein, E.E. 2010.** Structural basis of local, pH-dependent conformational changes in glycoprotein B from herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 84(24): S. 12924–12933.
- Stang, E.; Guerra, C.B.; Amaya, M.; Paterson, Y.; Bakke, O. und Mellins, E.D. 1998.** DR/CLIP (class II-associated invariant chain peptides) and DR/peptide complexes colocalize in prelysosomes in human B lymphoblastoid cells. *J Immunol* 160(10): S. 4696–4707.
- Stenmark, H.; Aasland, R.; Toh, B.-H. und D'Arrigo, A. 1996.** Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J. Biol. Chem.* 271(39): S. 24048–24054.
- Stenmark, H.; Parton, R.G.; Steele-Mortimer, O.; Lütcke, A.; Gruenberg, J. und Zerial, M. 1994.** Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* 13(6): S. 1287–1296.
- Stenmark, H.; Vitale, G.; Ullrich, O. und Zerial, M. 1995.** Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell* 83(3): S. 423–432.
- Strubin, M.; Berte, C. und Mach, B. 1986.** Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* 5(13): S. 3483–3488.
- Stumptner, P. und Bénaroch, P. 1997.** Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *EMBO J.* 16(19): S. 5807–5818.
- Sundquist, W.I.; Schubert, H.L.; Kelly, B.N.; Hill, G.C.; Holton, J.M. und Hill, C.P. 2004.** Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein. *Mol. Cell.* 13(6): S. 783–789.
- Tannous, A.; Pisoni, G.B.; Hebert, D.N. und Molinari, M. 2014.** N-linked sugar-regulated protein folding and quality control in the ER. *Semin Cell Dev Biol.*
- Teis, D.; Saksena, S. und Emr, S.D. 2008.** Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev. Cell* 15(4): S. 578–589.
- Temme, S.; Eis-Hübinger, A.M.; McLellan, A.D. und Koch, N. 2010.** The herpes simplex virus-1 encoded glycoprotein B diverts HLA-DR into the exosome pathway. *J Immunol* 184(1): S. 236–243.
- ten Broeke, T.; van Niel, G.; Wauben, M.H.M.; Wubbolts, R. und Stoorvogel, W. 2011.** Endosomally stored MHC class II does not contribute to antigen presentation by dendritic cells at inflammatory conditions. *Traffic* 12(8): S. 1025–1036.
- Teo, H.; Gill, D.J.; Sun, J.; Perisic, O.; Veprintsev, D.B.; Vallis, Y.; Emr, S.D. und Williams, R.L. 2006.** ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell* 125(1): S. 99–111.
- The MHC sequencing consortium 1999.** Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature* 401(6756): S. 921–923.

- Théry, C.; Boussac, M.; Véron, P.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Raposo, G.; Garin, J. und Amigorena, S. 2001.** Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166(12): S. 7309–7318.
- Théry, C.; Duban, L.; Segura, E.; Véron, P.; Lantz, O. und Amigorena, S. 2002.** Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* 3(12): S. 1156–1162.
- Thompson, R.L. und Sawtell, N.M. 2011.** The herpes simplex virus type 1 latency associated transcript locus is required for the maintenance of reactivation competent latent infections. *J. Neurovirol.* 17(6): S. 552–558.
- Trajkovic, K.; Hsu, C.; Chiantia, S.; Rajendran, L.; Wenzel, D.; Wieland, F.; Schwille, P.; Brügger, B. und Simons, M. 2008.** Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319(5867): S. 1244–1247.
- Ullrich, O.; Horiuchi, H.; Bucci, C. und Zerial, M. 1994.** Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* 368(6467): S. 157–160.
- Umbach, J.L.; Kramer, M.F.; Jurak, I.; Karnowski, H.W.; Coen, D.M. und Cullen, B.R. 2008.** MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 454(7205): S. 780–783.
- Valadi, H.; Ekström, K.; Bossios, A.; Sjöstrand, M.; Lee, J.J. und Lötvall, J.O. 2007.** Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9(6): S. 654–659.
- van den Hoorn, T.; Paul, P.; Janssen, L.; Janssen, H. und Neefjes, J. 2012.** Dynamics within tetraspanin pairs affect MHC class II expression. *J. Cell. Sci.* 125(Pt 2): S. 328–339.
- van Lint, A.L.; Murawski, M.R.; Goodbody, R.E.; Severa, M.; Fitzgerald, K.A.; Finberg, R.W.; Knipe, D.M. und Kurt-Jones, E.A. 2010.** Herpes simplex virus immediate-early ICP0 protein inhibits Toll-like receptor 2-dependent inflammatory responses and NF-kappaB signaling. *J. Virol.* 84(20): S. 10802–10811.
- van Niel, G.; Charrin, S.; Simoes, S.; Romao, M.; Rochin, L.; Saftig, P.; Marks, M.S.; Rubinstein, E. und Raposo, G. 2011.** The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev. Cell* 21(4): S. 708–721.
- van Niel, G.; Wubbolts, R. und Stoorvogel, W. 2008.** Endosomal sorting of MHC class II determines antigen presentation by dendritic cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 20(4): S. 437–444.
- van Niel, G.; Wubbolts, R.; ten Broeke, T.; Buschow, S.I.; Ossendorp, F.A.; Melief, C.J.; Raposo, G.; van Balkom, Bas W und Stoorvogel, W. 2006.** Dendritic cells regulate exposure of MHC class II at their plasma membrane by oligoubiquitination. *Immunity* 25(6): S. 885–894.
- van Nispen tot Pannerden, H.E.; Geerts, W.J.; Kleijmeer, M.J. und Heijnen, H.F. 2010.** Spatial organization of the transforming MHC class II compartment. *Biol. Cell.* 102(11): S. 581–591.
- Villadangos, J.A.; Cardoso, M.; Steptoe, R.J.; van Berkel, D.; Pooley, J.; Carbone, F.R. und Shortman, K. 2001.** MHC Class II Expression Is Regulated in Dendritic Cells Independently of Invariant Chain Degradation. *Immunity* 14(6): S. 739–749.
- Vitu, E.; Sharma, S.; Stampfer, S.D. und Heldwein, E.E. 2013.** Extensive mutagenesis of the HSV-1 gB ectodomain reveals remarkable stability of its postfusion form. *J. Mol. Biol.* 425(11): S. 2056–2071.
- Wagner, E.K.; Devi-Rao, G.; Feldman, L.T.; Dobson, A.T.; Zhang, Y.F.; Flanagan, W.M. und Stevens, J.G. 1988.** Physical characterization of the herpes simplex virus latency-associated transcript in neurons. *J. Virol.* 62(4): S. 1194–1202.
- Walseng, E.; Furuta, K.; Bosch, B.; Weih, K.A.; Matsuki, Y.; Bakke, O.; Ishido, S. und Roche, P.A. 2010.** Ubiquitination regulates MHC class II-peptide complex retention and degradation in dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(47): S. 20465–20470.
- Wang, J.; Fan, Q.; Satoh, T.; Aarii, J.; Lanier, L.L.; Spear, P.G.; Kawaguchi, Y. und Arase, H. 2009.** Binding of herpes simplex virus glycoprotein B (gB) to paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha depends on specific sialylated O-linked glycans on gB. *J. Virol.* 83(24): S. 13042–13045.
- Warmerdam, P.A.; Long, E.O. und Roche, P.A. 1996.** Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J. Cell. Biol.* 133(2): S. 281–291.

- Watanabe, M.; Suzuki, T.; Taniguchi, M. und Shinohara, N. 1983.** Monoclonal anti-Ia murine alloantibodies crossreactive with the Ia-homologues of other mammalian species including humans. *Transplantation* 36(6): S. 712–718.
- Weber, D.A.; Evavold, B.D. und Jensen, P.E. 1996.** Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* 274(5287): S. 618–620.
- Weber, T.; Zemelman, B.V.; McNew, J.A.; Westermann, B.; Gmachl, M.; Parlati, F.; Söllner, T.H. und Rothman, J.E. 1998.** SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92(6): S. 759–772.
- Wisner, T.W.; Wright, C.C.; Kato, A.; Kawaguchi, Y.; Mou, F.; Baines, J.D.; Roller, R.J. und Johnson, D.C. 2009.** Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J. Virol.* 83(7): S. 3115–3126.
- Wollert, T. und Hurley, J.H. 2010.** Molecular Mechanism of Multivesicular Body Biogenesis by ESCRT Complexes. *Nature* 464(7290): S. 864–869.
- Wubbolts, R.; Leckie, R.S.; Veenhuizen, P.T.M.; Schwarzmann, G.; Möbius, W.; Hoernschemeyer, J.; Slot, J.-W.; Geuze, H.J. und Stoorvogel, W. 2003.** Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* 278(13): S. 10963–10972.
- Yasukawa, M. und Zarleng, J.M. 1984.** Human cytotoxic T cell clones directed against herpes simplex virus-infected cells. I. Lysis restricted by HLA class II MB and DR antigens. *J Immunol* 133(1): S. 422–427.
- York, I.A.; Roop, C.; Andrews, D.W.; Riddell, S.R.; Graham, F.L. und Johnson, D.C. 1994.** A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. *Cell* 77(4): S. 525–535.
- Zeigerer, A.; Gilleron, J.; Bogorad, R.L.; Marsico, G.; Nonaka, H.; Seifert, S.; Epstein-Barash, H.; Kuchimanchi, S.; Peng, C.G.; Ruda, V.M.; Del Conte-Zerial, P.; Hengstler, J.G.; Kalaidzidis, Y.; Koteliansky, V. und Zerial, M. 2012.** Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature* 485(7399): S. 465–470.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

∅	nicht transfiziert / unbehandelt	Da	Dalton (1D = 1,66 x 10 <sup>-24</sup> g)
°C	Grad Celsius	DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
<b>A</b>		dest.	Destilliert
aa	Aminosäure ("amino acid")	d.h.	das heißt
A	Ampere	DMEM	Dulbecco´s MEM
A	Purinbase Adenin	DMSO	Dimethylsulfoxid
Abb.	Abbildung	DNA	Desoxyribonukleinsäure ("desoxyribonucleic acid")
Ad	addiere bis zur Menge	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
Amp	Ampicillin	dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
APC	Antigen präsentierende Zelle ("antigen presenting cell")	<b>E</b>	
APS	Ammoniumperoxisulfat	EBV	Epstein Barr Virus
ATP	Adenosintriphosphat	ECL	verstärkte Chemilumineszenz ("enhanced chemiluminescence")
<b>B</b>		E.coli	Escherichia coli
bp	Basenpaar	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
bzw.	beziehungsweise	EEA1	Early Endosomal Antigen 1
<b>C</b>		E <sub>H</sub>	EndoH verdaute Probe
C	Pyrimidinbase Cytosin	EndoH	Endoglykosidase H
CLIP	Class II Invariant Chain Peptide	ER	Endoplasmatisches Retikulum
c	zenti	ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
ca.	circa	et al.	und andere ("et alteri")
CD	immunphänotypisches Oberflächenmerkmal einer Zelle ("Cluster of differentiation")	etc.	et cetera
cDNA	mittels RT aus RNA gewonnene DNA ("complementary DNA")	<b>F</b>	
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	FACS	Durchflusszytometrie ("fluorescence-activated cell sorting")
<b>D</b>		F <sub>c</sub>	Bereich der schweren Kette eines Antikörpers ("fragment crystallisable")
		FCS	Fötales Kälberserum ("fetal

	calf serum")	IgG	Immunglobulin G
FSC	Forward Scatter	IgM	Immunglobulin M
fw	vorwärts ("forward")	li	invariante Kette
<b>G</b>		IL	Interleukin
g	Gramm	ILV	Intraluminale Vesikel
G	Purinbase Guanin	IP	Immunpräzipitation
gB	Glykoprotein B	<b>K</b>	
gC	Glykoprotein C	k	kilo
gD	Glykoprotein D	KAc	Kaliumacetat
gE	Glykoprotein E	kb	Kilobasen
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	kDa	Kilodalton
gH	Glykoprotein H		
gK	Glykoprotein K	<b>L</b>	
gL	Glykoprotein L	l	Liter
gM	Glykoprotein M	LAT	Latenz-assoziiertes Transkript
GTP	Guanosintriphosphat	LB	Luria Bertani
<b>H</b>		LBPA	Lysobisphosphatidsäure
h	Stunde ("hour")	LSM	Laser Scanning Mikroskop
HCl	Salzsäure (in Wasser gelöster Chlorwasserstoff)	<b>M</b>	
H <sub>2</sub> O	Wasser	M	Molarität
HCMV	Humanes Zytomegalievirus	m	Meter
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure	μ-	mikro (1 x 10 <sup>-6</sup> )
HHV	Humanes Herpes Virus	m-	milli (1 x 10 <sup>-3</sup> )
His	Histidin	MIIC	MHC Klasse II Beladungs- kompartiment
HLA	Humanes Leukozyten Antigen ("human leucocyte antigen")	MEM	modified Eagle Medium
HRP	Meerrettischperoxidase ("horseradish peroxidase")	MHC	Haupthistokompatibilitäts- komplex ("major histo- compatibility complex")
HSV	Herpes Simplex Virus	min	Minute
HVEM	gD-Rezeptor ("herpesvirus entry mediator")	MVB	Multivesikuläre Bodies ("multivesicular bodies")
<b>I</b>		<b>N</b>	
IF	Immunfluoreszenz	n	nano (1 x 10 <sup>-9</sup> )
		NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natriumhydroxid	RNA	Ribonukleinsäure
NP40	Nonylphenoxyloxyethoxyethanol40	RNAse	Ribonuklease
		RSB	reduzierender Probenpuffer ("reducing sample buffer")
<b>O</b>		RT	Reverse Transkription
OD	optische Dichte		
		<b>S</b>	
<b>P</b>		s	Sekunde
p	piko ( $1 \times 10^{-12}$ )	s.	siehe
p-Wert	Signifikanzwert	s.a.	siehe auch
PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese	SDS	Sodiumdodecylsulfat
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ("phosphate-buffered saline")	SOC	Bakterielles Nährmedium ("Super Optimal broth with Catabolite repression")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")	SSC	Seitwärtsstreuung ("sideward scatter")
PEI	Polyethylenamin	ST	Tris-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd	SV40	Affenvirus 40 ("simian virus 40")
P <sub>F</sub>	PNGase F verdaute Probe		
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration	<b>T</b>	
PI	Propidium-Iodid	T	Pyrimidinbase Thymidin
pMHCII	Peptid-beladene MHCII-Moleküle	Tab.	Tabelle
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F	TAE	Tris-Acetat-EDTA
PrV	Pseudorabies Virus	Taq	Thermus aquaticus
		TEMED	Tetramethyldiamin
<b>Q</b>		TfR	Transferrin-Rezeptor
Q1	unteres Quartil	TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Q2	Mittleres Quartil / Median	T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur ("temperature of melting")
Q3	oberes Quartil	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
		Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
<b>R</b>		<b>U</b>	
r	Korrelationskoeffizient	U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
rev	rückwärts ("reverse")		

u.a. unter anderem  
ü.N. über Nacht  
UV Ultraviolett

**V**

V Volt  
v Volumen  
vgl. Vergleiche  
[v/v] Volumen/Volumen  
VZV Varizella Zoster Virus

**W**

w Gewicht ("weight")  
WB Westernblot  
wt Wildtyp  
[w/v] Gewicht/Volumen

**X, Y, Z**

x g Erdbeschleunigung = 9,81 m/s  
z.B. zum Beispiel