

Einfluss des Glykoprotein B aus Herpes Simplex Virus Typ 1 auf die intrazelluläre Verteilung und Exozytose von HLA Klasse II-Molekülen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Rheinische Friedrich- Wilhelms- Universität Bonn

vorgelegt von:
Sebastian Temme
aus Bonn, Deutschland

Bonn 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Immunbiologie am Institut für Genetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Betreuung von Frau Prof. Dr. A. M. Eis-Hübinger angefertigt.

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

Erscheinungsjahr: 2010

Dekan: Prof. Dr. U. G. Meißner

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. M. Eis-Hübinger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. N. Koch

Tag der mündlichen Prüfung: 4.11.2009

Veröffentlichungen

Temme S., Eis-Hübinger A. M., McLellan A. D., Koch N. 2010. The Herpes Simplex Virus-1 Encoded Glycoprotein B Diverts HLA-DR into the Exosome Pathway. *J Immunol.* 184(1):236-43.

Temme S. et al., A Novel MHC Class II Peptide Receptor; Manuskript in Bearbeitung

Ting Y. T., **Temme S.** , Koch N., McLellan A. D. 2009. A new monoclonal antibody recognizing a linear determinant on the HLA-DRalpha-chain N-terminus. *Hybridoma* 28 (6) : 423-9

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden auf folgenden Kongressen als Poster vorgestellt:

Temme S., Gondorf F., Kuckenberg P., Eis-Hübinger A. M., Bedorf J. McLellan A. and Koch N. 2009. HSV-1 encoded glycoprotein B targets the MHC II processing pathway. *Symposium Immune Regulation des Bonner Forums Biomedizin*

Temme S., Kuckenberg P., Bondong S., Bedorf J., Gondorf F., Eis-Hübinger A. M., Koch. 2007 N.. Targeting of the major histocompatibility complex by herpes simplex virus type-1 glycoprotein B. *37th annual meeting of the German Society for Immunology.*

Temme S., Koch N., Eis-Hübinger A.M. and Neumann J. 2005. Glycoprotein B targets MHC class-II subunit assembly. *Immunobiology* 210:6-8.

Leben entspricht der Erfolgsphase von Immunsystemen (Peter Sloterdijk)

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. N. Koch und Frau Prof. Dr. Eis-Hübinger bedanke ich mich für die Vergabe des Themas, die gute Betreuung dieser Arbeit und für die große Unterstützung bei allen Problemen und Fragestellungen.

Ein großes Dankeschön gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Immunbiologie für das nette Arbeitsklima und die Hilfe bei der täglichen Arbeit. Mein besonderer Dank gilt dabei vor allem Frau Angelika König, Daniel Schaefer und insbesondere Nadine Kämper.

Mein Dank gilt auch Jörg Bedorf vom Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Bonn für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen; Peter Wurst von der FACS-Core Facility am IMMEI für das FASC-Sorting und die Expertise bei durchflusszytometrischen Analysen; Dr. Susanne Koch aus der Dermatologie am Universitätsklinikum Bonn für die Hilfe bei der Durchflusszytometrie und vielem mehr; Alexander D. McLellan für die Hilfe bei der Verfassung der Veröffentlichung und der Arbeit mit den Exosomen; Dr. Traub für die Hilfe bei der Ultrazentrifuge und der Refraktometrie.

Danken möchte ich einigen ehemaligen Mitarbeitern dieser Abteilung für die Versorgung mit Hintergrundwissen, Materialien, Reagenzien, und Artikeln Alexandros Theodoridis, Dr. Johannes Winkler und Jörg Kessler.

Eine große Hilfe waren auch die fleißigen Korrekturleser Fabian Gondorf, Axel Stein und Sandra Herzog und wiederum Nadine Kämper.

Ich möchte mich auch bei meiner Familie, meinen Eltern und meinen Geschwistern bedanken, die mir die Möglichkeit des Studiums gegeben haben und mich während dieser Zeit immer tatkräftig unterstützt haben.

1. Einleitung	1
1.1 Der MHCII-Weg der Antigenpräsentation.....	1
1.1.1 Aufbau und Struktur von MHCII-Molekülen	1
1.1.2 Zusammenbau der MHCII-Komplexe	3
1.1.3 Transport der MHCII-Ii Komplexe in die MHCII-Beladungskompartimente	4
1.1.4 Proteolytischer Abbau von Ii und Beladung der MHCII-Moleküle	5
1.1.5 Transport der peptidbeladenen MHCII-Moleküle zur Zelloberfläche	5
1.1.6 Sortierung der MHCII-Moleküle in die multivesikulären Endosomen	6
1.1.7 Exosomen vermittelte Exozytose von MHCII-Molekülen	7
1.2 Biologie des Herpes Simplex Virus Typ-1	8
1.2.1 Struktur und Biogenese der HSV Partikel.....	10
1.2.2 Bindung und Fusion mit der Zielzelle	10
1.2.3 Immuneffektorreaktionen gegen Herpes Simplex Viren	11
1.2.4 Immunevasionsstrategien von Herpes Simplex Viren	11
1.2.5 Das HSV-1 kodierte Glykoprotein B (gB)	12
1.3 Fragestellung der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	14
2.1.1 Geräte.....	14
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.3 Verwendete Bakterienstämme	17
2.1.4 Verwendeter Virusstamm	17
2.1.5 Zelllinien	17
2.1.6 Antikörper	18
2.1.7 Verwendete Plasmide	20
2.2 Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1 Anzucht von <i>E. coli</i> Stämmen zur Plasmidpräparation	20
2.2.2 Präparation von Plasmid-DNS	20
2.2.3 Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration	21
2.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	21
2.2.5 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNS.....	21
2.2.6 Agarosegelelektrophorese	21
2.2.7 Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen.....	21
2.3 Zellbiologische Methoden	22
2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen	22
2.3.2 Transiente Proteinexpression in eukaryontischen Zellen.....	22
2.3.3 Stabile Proteinexpression in eukaryontischen Zellen	22
2.3.4 Gewinnung von Exosomen aus Zellkulturüberstand	22
2.3.5 Infektion von Zellen mit Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1)	23
2.4 Biochemische Methoden	23
2.4.1 Biosynthetische Markierung zellulärer Proteine	23
2.4.2 Herstellung von Zelllysaten	23
2.4.3 Immunpräzipitation.....	23
2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	24
2.4.5 Fluorographie	25
2.4.6 Western Blot-Analyse.....	25
2.4.7 Darstellung von "SDS-stabilen" MHCII-Molekülen	25

2.4.8	Behandlung mit Endoglykosidase H und N-Glykosidase F	25
2.4.9	Durchflusszytometrie von Zellen	26
2.4.10	Durchflusszytometrie von Exosomen.....	25
2.4.11	Immunfluoreszenzmikroskopie	27
2.4.12	Konfokale Laserscanning Mikroskopie	27
2.4.13	Auftrennung von Exosomen im Saccharosedichtegradienten.....	28
2.4.14	Endozytose-Assay	28
2.5	Verwendete Computerprogramme	28
3.	Ergebnisse	30
3.1	Erzeugung und Charakterisierung stabil mit HSV-1 gB transfizierter Zelllinien.....	30
3.2	Interaktion von gB mit MHCII-Molekülen in MJ-gB Zellen.....	31
3.3	Einfluss von Ii auf die N-Glykosylierung gB-assoziiierter MHCII-Moleküle.....	33
3.4	Kompetition von gB und Ii um die Bindung an MHCII-Moleküle	36
3.5	HSV-1 gB ist kein Chaperon für MHC Klasse II-Moleküle	38
3.6	gB bindet nicht an SDS-stabile MHCII-Moleküle	40
3.7	gB-Expression beeinflusst nicht den Anteil SDS-stabiler MHCII-Moleküle	42
3.8	MJ-gB Zellen besitzen eine erhöhte MHCII-Oberflächenexpression	44
3.9	In MJ-gB-Zellen ist gB, nicht aber HLA-DR ubiquitinyliert.....	47
3.10	MJ-gB-Zellen besitzen vergrößerte endosomale Kompartimente.....	49
3.11	gB-MHCII- Komplexe werden über Exosomen sezerniert.....	52
3.12	gB-Expression fördert die Exosomensekretion von MHCII-Molekülen	61
4.	Diskussion	63
4.1.	Einfluss der gB-Expression auf die subzelluläre Verteilung und die Exosomen-vermittelte Sekretion von MHCII-Molekülen	63
4.2	Einfluss von gB auf die MHCII-Oberflächenexpression	68
4.3	Interaktion von gB mit MHCII-Molekülen	70
4.4	Darstellung eines Modells über die Interaktion von gB und MHCII-Molekülen und der Sortierung von gB-MHCII-Komplexen in Exosomen	73
5.	Zusammenfassung	74
6.	Literaturverzeichnis	75
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	89

1. Einleitung

Das Immunsystem ist ein Verbund aus Organen, Zellen und Proteinen, die daran beteiligt sind, den Körper vor dem Einfluss pathogener Mikroorganismen oder entarteten körpereigenen Zellen zu schützen. Die Organe des Immunsystems, d.h. das Knochenmark, der Thymus, die Milz und die Lymphknoten, dienen zur Bildung bzw. zur Stimulation der Immunzellen. Im Knochenmark entstehen B-Zellen und im Thymus T-Zellen. Diese B- und T-Zellen werden während einer Infektion in den Lymphknoten oder der Milz aktiviert. Die Zellen und Proteinanteile des Immunsystems werden in angeborene (innate) und erworbene (adaptive) Komponenten unterteilt. Das adaptive Immunsystem, zu dem auch die B- und T-Zellen gehören, hat die Möglichkeit sich innerhalb relativ kurzer Zeit an den Erreger anzupassen und bildet zudem ein immunologisches Gedächtnis aus. Bei wiederholter Infektion mit dem gleichen Erreger reagiert das adaptive System daher sehr schnell und hochspezifisch. Das angeborene System reagiert zwar gewöhnlich schneller als das adaptive System, ist aber weniger spezifisch. Das angeborene Immunsystem ist sehr wichtig, da es die Aktivierung des adaptiven Systems einleitet und die Zeitspanne bis zur Aktivierung von B- und T-Zellen überbrückt. Die wichtigste Schnittstelle zwischen adaptivem und angeborenem System stellen die Dendritischen Zellen (DCs) dar. DCs finden sich in nahezu allen Organen und ihre Aufgabe ist es, pathogene Mikroorganismen zu erkennen und eine adaptive Immunantwort gegen diese Erreger einzuleiten (Moser M., 2003). Zur Erkennung von Krankheitserregern besitzen DCs Rezeptoren, die zum angeborenen Immunsystem gehören und bestimmte konservierte Strukturen von pathogenen Krankheitserregern binden, die als PAMPs (**P**athogen **A**ssociated **M**olecular **P**attern) bezeichnet werden. Die auf den Immunzellen vorhandenen entsprechenden Rezeptoren werden PRRs genannt (**P**attern **R**ecognition **R**eceptors). Erfolgt eine Bindung von PAMPs an die PRRs, kommt es zur Aktivierung der Immunzelle und zur Internalisierung, Prozessierung und Präsentation von Antigenen über MHCII- bzw. MHCI-Molekülen (Vyas J. M. *et al.*, 2008). Bei MHCI- und MHCII-Molekülen handelt es sich um hochpolymorphe Transmembranproteine, die intrazellulär mit Peptiden von Krankheitserregern beladen werden und diese auf der Zelloberfläche präsentieren, was eine Voraussetzung zur Aktivierung von T-Zellen ist. T-Zellen lassen sich grob in CD4+ und CD8+ Zellen unterteilen. Während CD4+ T-Zellen MHCII-Peptidkomplexe erkennen, binden CD8+-Zellen an peptidbeladene MHCI-Moleküle. CD4+-T-Zellen werden auch Helferzellen genannt, da sie in die Aktivierung von CD8+ T-Zellen und B-Zellen involviert sind. Über DCs aktivierte CD4+ T-Zellen interagieren mit B-Zellen und stimulieren deren Entwicklung zu antikörpersezernierenden Plasmazellen. Patienten oder Mäuse, die keine funktionellen MHCII-Moleküle besitzen, zeigen bei Infektionen daher keine effiziente Antikörperproduktion (Viville S. *et al.*, 1993). Ferner haben CD4+ Zellen Bedeutung bei der Aktivierung von Makrophagen oder der Bildung von Gedächtnis T-Zellen.

1.1 Der MHCII-Weg der Antigenpräsentation

1.1.1 Aufbau und Struktur von MHCII-Molekülen

MHCII-Moleküle sind hochpolymorphe, heterodimere Typ-1 Transmembranproteine, die aus einer α - und β -Untereinheit mit einem Molekulargewicht (MW) von 35 kDa bzw. 30 kDa aufgebaut sind (Cresswell P., 1994). Jede Kette besteht aus zwei extrazellulären Domänen ($\alpha 1$ - $\alpha 2$ bzw. $\beta 1$ - $\beta 2$), einer Transmembranregion und einem zytoplasmatischen Bereich. Die $\alpha 1$ - und $\beta 1$ -Domänen der α - und β -Kette bilden die Peptidbindungsgrube. Beim Menschen

findet man drei verschiedene MHCII-Isoformen HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP (Bei der Maus zwei: I-A und I-E). Das besondere Merkmal der MHCII-Moleküle ist der große Polymorphismus. Dieser ermöglicht die Präsentation eines sehr großen Spektrums von antigenen Peptiden. Interessant ist, dass der Polymorphismus der drei MHCII-Isoformen nicht identisch ist. Während bei HLA-DR nur die β -Ketten polymorph sind, existieren bei DP und DQ sowohl von den α - als auch von den β -Untereinheiten zahlreiche Allotypen (s. Tab. 1 nach Robinson J. *et al.*, 2003; IMGT/HLA Database Release 2.25.2, 11 May 2009).

Tab. 1: Polymorphismus humaner MHCII-Moleküle¹

Gen	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
Allele	3	690	34	95	27	131
Proteine	2	556	25	69	16	115

Da MHCII-Moleküle darauf spezialisiert sind, ein möglich breites Spektrum an Peptiden binden zu können, befinden sich die polymorphen Bereiche der MHCII-Moleküle überwiegend im Bereich der Peptidbindungsgrube. Diese besteht aus acht beta-Faltblatt Strukturen, welche den Boden der Grube bilden und zwei alpha-Helices, die die Grube seitlich begrenzen (s. Abb. 1.1 B und C). Peptide, die von MHCII-Molekülen gebunden werden, haben gewöhnlich eine Länge von ca. 12-17 Aminosäuren und können auf beiden Seiten der Peptidbindungsgrube herausragen. Die Stabilisierung der Bindung des Peptids an das MHCII-Molekül erfolgt durch Wasserstoffbrücken zwischen dem Peptidrückgrat und der Grube. Zudem besitzt die Peptidbindungsgrube Taschen, in welche Aminosäureseitenketten des Peptides binden (Stern L. J. *et al.*, 1994). Diese Vertiefungen sind für die Allel-spezifische Bindung von Peptiden verantwortlich (Rammensee H. G., *et al.*, 1995).

¹ <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html> ; Robinson J. *et al.*, 2003; IMGT/HLA Database Release 2.25.2, 11 May 2009

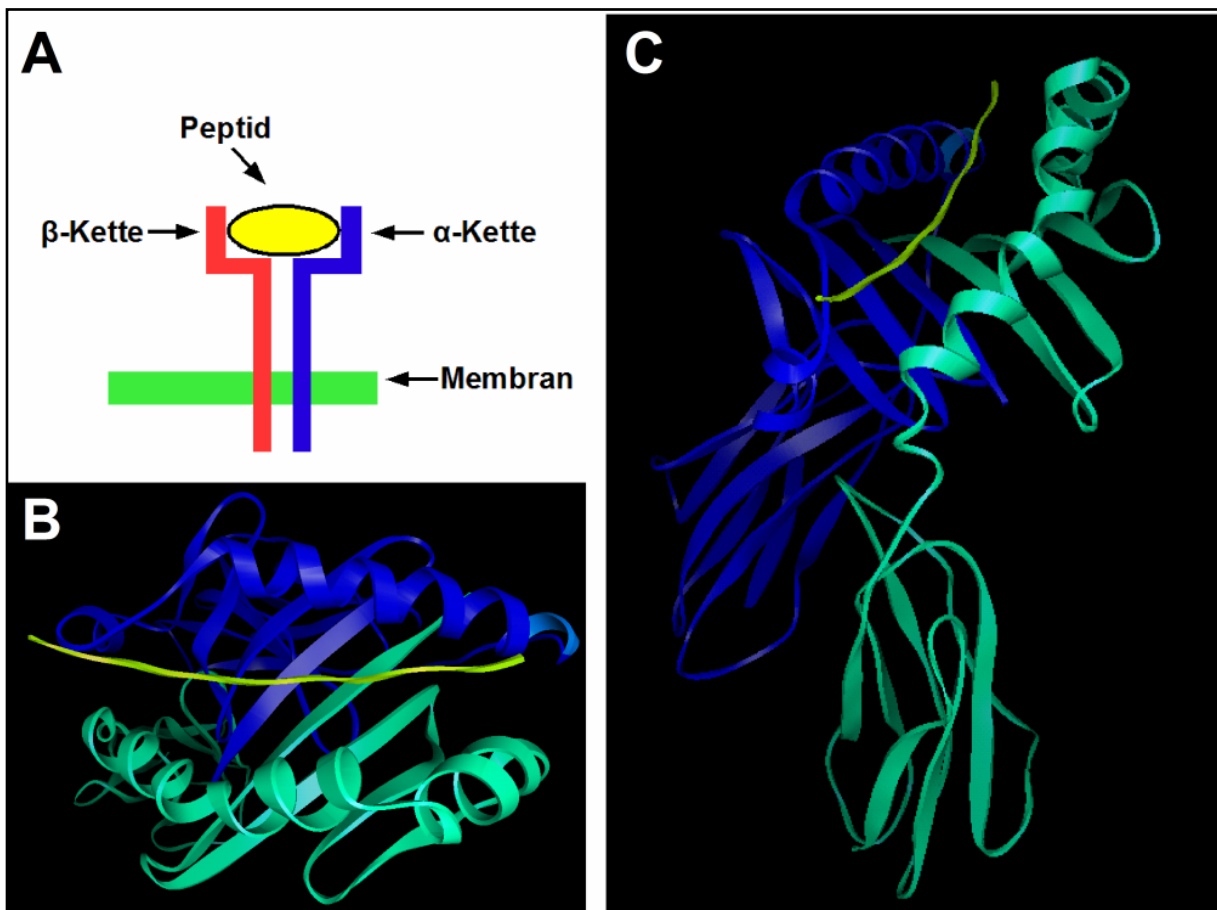


Abb. 1.1: Aufbau der MHCII-Moleküle: A) Schematische Darstellung eines MHCII-Moleküls. B und C) HLA-DR3/CLIP-Komplex nach der Kristallstruktur von Gosh P *et al.*, (1995). Die Darstellung erfolgte mit dem 3D Molecule Viewer (Vector NTI 10 Advance, Invitrogen). C zeigt eine seitliche Perspektive, B eine Aufsicht auf die Peptidbindungsgrube. Die α -Kette ist in blau, die β -Kette in türkis und CLIP ist in gelb dargestellt.

1.1.2 Zusammenbau der MHCII-Komplexe

Die MHCII α - und β -Untereinheiten werden innerhalb des endoplasmatischen Retikulums (ER) mit Hilfe eines dritten nicht-polymorphen Moleküls (der sog. invarianten Kette; Ii; CD74) zu einem funktionellen MHCII-Molekül zusammengesetzt. Kurz nach der Translation kommen MHCII-Moleküle zunächst gemeinsam mit dem ER-Chaperon BiP in hochmolekularen Komplexen vor und gehen dann mit Hilfe des Chaperons Calnexin in Ii-MHCII-Komplexe über (Marks M. S. *et al.*, 1995; Anderson K. S. und Cresswell P., 1994). Der Verlust von Calnexin korreliert mit dem Transport der MHCII-Ii-Komplexe aus dem ER.

Bei Ii handelt es sich um ein Typ-2 Transmembranprotein, das sich kurz nach der Translation zu einem Trimer zusammenlagert. Von Ii existieren mehrere Splicevarianten (Stumptner-Cuvelette P. und Benaroch P., 2002). Beim Menschen kommen vier, bei der Maus zwei Isoformen vor. Neben BiP und Calnexin übernimmt Ii eine wichtige Chaperonfunktion für MHCII-Moleküle (Koch N. *et al.*, 2007). Von besonderer Bedeutung ist die CLIP-Region der Invarianten Kette. Die CLIP-Sequenz belegt bei der Bindung von Ii an MHCII-Moleküle innerhalb des ER die Peptidbindungsgrube. Dies verhindert eine vorzeitige Beladung der MHCII-Moleküle durch ungefaltete Polypeptidketten (Busch R. *et al.*, 1996). Zudem fördert die Bindung der CLIP-Sequenz den Zusammenbau der α - und β -Untereinheiten und die Stabilisierung der Klasse II-Moleküle (Romagnoli N. und Germain R. N., 1994). Obwohl nicht

alle MHCII-Moleküle CLIP mit gleicher Affinität binden (Sette A. *et al.*, 1995), erfolgt die Bindung von Ii an MHCII-Moleküle vor allem über die CLIP-Region (Stern *et al.*, 1994).

Es existieren derzeit zwei Modelle, wie aus einzelnen MHCII-Untereinheiten mit Hilfe von Ii funktionelle MHCII-Moleküle gebildet werden. Ein klassisches, heutzutage verbreitetes Modell (siehe z.B. Cresswell P., 1994) und eine weiterentwickelte Variante (Koch N. *et al.*, 2007). Nach dem klassischen Modell lagern sich zunächst eine α - und β -Untereinheit zu einem MHCII-Dimer zusammen, welches daraufhin an das Trimer der invarianten Kette bindet. Drei MHCII $\alpha\beta$ -Dimere binden an ein Trimer von Ii, wodurch ein nonamerer Komplex $Ii_3(\alpha\beta)_3$ entsteht. Der nonamere Komplex verlässt das ER und gelangt über den Golgi-Apparat in die Endosomen. Das Modell von Koch und Kollegen unterscheidet sich dahingehend, dass von der Bildung einer α -Ii Matrix ausgegangen wird. Nach dieser Theorie lagert sich zunächst eine MHCII α -Kette und Ii zusammen, wodurch eine α -Ii Matrix entsteht. Diese α -Ii Matrix dient dazu, eine zu der MHCII α -Kette entsprechende β -Kette zu selektionieren. Aus der Vielzahl an möglichen Kombinationen von MHCII-Molekülen werden auf diese Weise durch Ii solche herausselektiert, die Peptidbindungseigenschaften besitzen.

1.1.3 Transport der MHCII-Ii-Komplexe in die MHCII-Beladungskompartimente

MHCII-Ii-Komplexe gelangen nach Verlassen des ER in endosomale Kompartimente, in denen die MHCII-Moleküle nach Abbau von Ii mit antigenen Peptiden beladen werden. Der Transport erfolgt durch den Golgi-Apparat, wo mannosereiche N-gebunden Kohlenhydrate zum komplexen Typ modifiziert werden. Die DR α -Kette besitzt zwei N-gebunden Kohlenhydratkette. Eine wird zum komplexen Typ modifiziert, die andere verbleibt mannosereich. DR β besitzt nur eine N-glykosidisch verbundene Kohlenhydratkette, die zum komplexen Typ modifiziert wird (Shackelford D. A. und Strominger J. L., 1983).

Es existieren zwei Wege wie MHCII-Moleküle vom Golgi-Apparates in die endosomalen Klasse II-Beladungskompartimente (MIICs) gelangen. Ein Weg führt vom trans-Golgi-Netzwerk in die Endosomen (Davidson H. W., 1999; Benaroch P. *et al.*, 1995). Beim anderen Weg gelangen die MHCII-Ii-Komplexe zunächst zur Zelloberfläche, von wo sie internalisiert und in die MIICs transportiert werden (McCormick P. *et al.*, 2005; Roche P. A. *et al.*, 1993; Wang K. *et al.*, 1997). Die Signale für den Transport in die endosomalen Kompartimente sind in Form zweier Di-Leucin-Motive im zytoplasmatischen Teil von Ii vorhanden (Simonsen A. *et al.*, 1997; Bakke O. und Dobberstein B., 1990; Pieters J. *et al.*, 1993). Diese binden an die Adaptorproteine AP1 und AP2 (Hofman M. W. *et al.*, 1999), die in Clathrin-vermittelte Sortierungsprozesse involviert sind. Während AP1 für den direkten Transportweg vom Golgi-Apparat in die MIICs verantwortlich sein könnte (Hofman M. W. *et al.*, 1999), vermittelt AP2 die Internalisierung der MHCII-Ii-Moleküle von der Zelloberfläche (Dugast M. *et al.*, 2005). AP2 bindet an die Di-Leucin-Motive im zytoplasmatischen Anteil von Ii und vermittelt so die Assoziation mit Clathrin, was in der Endozytose der MHCII-Ii-Komplexe resultiert (McCormick P. J., 2005). Mutation der Di-Leucin-Signale von Ii verhindern zum einen den Transport der MHCII-Ii-Komplexe in die MIICs und führen zu einer Anhäufung von MHCII-Ii-Komplexen auf der Zelloberfläche (Simonsen A. *et al.*, 1997; Roche P. A. *et al.*, 1992; Roche P. A. *et al.*, 1993). Neben AP-2 spielt auch die GTPase Dynamin bei der Endozytose von MHCII-Ii-Komplexen eine Rolle. Überexpression einer dominant-negativen Form von Dynamin verhindert die Internalisierung der MHCII-Ii-Komplexe von der Plasmamembran sowie den Abbau von Ii (Wang K. *et al.*, 1997).

1.1.4 Proteolytischer Abbau von Ii und Beladung der MHCII-Moleküle

MHCII-Moleküle werden in einem speziellen endosomalen Kompartiment beladen, das MIIC (MHC Klasse II-Beladungskompartiment) genannt wird. Dabei handelt es sich um multivesikuläre oder multilamellare späte Endosomen. MIICs enthalten große Mengen von MHCII-Molekülen und Proteinen, die zur Beladung der MHCII-Moleküle wichtig sind (Stern L. J. *et al.*, 2006). Zu den akzessorischen Proteinen gehören unter anderem HLA-DM und HLA-DO, Cathepsine (Cath-S und -L) und eine durch IFN γ induzierbare Thiolreduktase (GILT). HLA-DM ist ein Enzym, das die Peptidbeladung katalysiert und in einigen Zellarten durch HLA-DO reguliert wird (Denzin L. K. *et al.*, 2005). Die Cathepsine -S und -L sind am Abbau von Ii und bei der Prozessierung von Peptidantigenen beteiligt. GILT reduziert Disulfidbrücken (z.B. beim Hen Egg Lysozyme (HEL)) und macht auf diesem Weg Proteine für Proteasen zugänglich (Hastings K. T. *et al.*, 2006). Obwohl die Beladung der MHCII-Moleküle am effizientesten in den MIICs erfolgt, kann dies auch in anderen subzellulären Kompartimenten erfolgen, zum Beispiel in frühen Endosomen, in Phagosomen oder auf der Zelloberfläche (Robinson J. H. und Delvig A. A., 2002).

Nach dem Transport der Ii-MHCII-Komplexe in die MIICs, wird Ii schrittweise durch Proteasen (Cathepsin-S, Cathepsin-L, Cathepsin-G, Asparagin-Endopeptidase (AEP)) degradiert, wobei Fragmente der Invarianten Kette mit dem Molekulargewicht von 22, 18 und 12 kDa entstehen (Pieters J. *et al.*, 1991, Tupl A., 1994, Blum J. S. und Cresswell P., 1988, Hsing L. C. und Rudensky A. Y., 2005). Nach dem Abbau verbleibt ein Fragment von Ii, das sog. CLIP-Peptid, in der Peptidbindungsgrube (Bryant *et al.*, 2002; Honey K. und Rudensky A. Y., 2003). Mit Hilfe von HLA-DM wird CLIP aus der Peptidbindungsgrube freigesetzt und durch ein antigenes Peptid ersetzt. HLA-DM übernimmt dabei auch die Rolle eines Peptid-Editors, der die selektive Bindung hochaffiner Peptide fördert (Wubbolts R. und Neefjes J., 1999). Die Beladung der MHCII-Moleküle mit hochaffinen Peptiden führt auch zu einer Änderung der Struktur. MHCII-Moleküle nehmen daraufhin eine kompaktere Form ein, die unempfindlicher gegenüber Denaturierung durch das Detergenz Natriumlaurylsulfat (SDS) ist. Diese kompakten MHCII-Moleküle zerfallen während der SDS-PAGE nicht in ihre Monomere und werden daher auch als SDS-stabile MHCII-Dimere bezeichnet (Springer T. A. *et al.*, 1977; Natarajan S. K. *et al.*, 1999). Peptidbeladene MHCII-Moleküle (pMHCII) gelangen schließlich zur Zelloberfläche und können dort von entsprechenden T-Zellen erkannt werden (Neefjes J. J., 1999; Germain R. N., 1994).

1.1.5 Transport der peptidbeladenen MHCII-Moleküle zur Zelloberfläche

Mit Peptiden beladene MHCII-Moleküle (pMHCII) werden über vesikulären Transport zur Zelloberfläche transportiert (Busch R. und Mellins E. D., 1996). Da die späten endosomalen MIICs nicht über ein spezifisches Transportsystem für einzelne Proteine zur Zelloberfläche verfügen, werden pMHCII-Moleküle nicht selektiv transportiert, sondern das gesamte MIIC fusioniert mit der Zelloberfläche (Rocha N. und Neefjes J., 2008).

MIICs wandern mit Hilfe der Motorproteine Kinesin und Dynein an Mikrotubuli entlang zur Zelloberfläche oder entfernen sich von dieser (Wubbolts *et al.*, 1996; Boes *et al.* 2002; Chow *et al.* 2002). Fusionieren die MIICs mit der Zelloberfläche gelangen die MHC Klasse II-Moleküle innerhalb der MIIC-Membran an die Zelloberfläche (Raposo G. *et al.*, 1996; Wubbolts R. *et al.*, 1996). Während in unreifen DCs, B-Zellen und MHC Klasse II-positiven Melanomzellen die MIICs direkt mit der Zelloberfläche fusionieren, zeigen aktivierte DCs einen anderen Mechanismus. Dort entstehen an den MIICs Tubuli, welche zur Zelloberfläche

wandern und mit dieser verschmelzen (Kleijmeer *et al.*, 2001; Boes M. *et al.*, 2002; Chow A. *et al.*, 2002).

1.1.6 Sortierung der MHCII-Moleküle in die multivesikulären Endosomen

Wie stark die MHCII-Oberflächenexpression ist, hängt nicht nur vom Transport zur Zelloberfläche ab, sondern auch von der Geschwindigkeit der Internalisierung. Reife DCs besitzen eine 10-fach höhere MHCII-Oberflächenexpression als unreife DCs. Das liegt daran, dass bei reifen DCs die Internalisierung der MHCII-Moleküle von der Plasmamembran stark reduziert ist (De Gassart A. *et al.*, 2008).

Werden peptidbeladene MHCII-Moleküle internalisiert, gelangen sie von den frühen Endosomen aus entweder direkt zurück zur Zelloberfläche (über die „Recycling“ Endosomen) oder in die multivesikulären Endosomen (MVE). Beim „Recycling“ gelangen die pMHCII-Moleküle entweder unverändert wieder zur Zelloberfläche oder können innerhalb der Endosomen erneut mit Peptiden beladen werden (Sinnathamby G. und Eisenlohr L. C., 2003). Während des Transports in die multivesikulären Endosomen werden MHCII-Moleküle zum Teil in die intraluminalen Vesikel inkorporiert. Je nachdem, ob die MVEs mit der Zelloberfläche oder mit den Lysosomen fusionieren, werden die pMHCII-Moleküle über Exosomen in den extrazellulären Raum sezerniert oder in den Lysosomen degradiert (van Niel G. *et al.*, 2008).

Je nach Zusammensetzung des MHCII-Komplexes werden zur Internalisierung unterschiedliche Mechanismen verwendet. MHCII-Ii-Komplexe werden über Signale im zytoplasmatischen Teil von Ii mittels Clathrin von der Oberfläche endozytiert (s. Abschnitt 1.1.3). Die Endozytose von nicht Ii-assoziierten MHCII-Molekülen erfolgt auf clathrinabhängigen oder -unabhängigen Wegen. Entsprechende Motive oder Aminosäuren befinden sich im zytoplasmatischen Bereich der α - und β -Ketten. Der zytoplasmatische Anteil der MHCII β -Ketten enthält ein konserviertes, auf Leucinresten basierendes, Signalmotiv. Dies ist für die Ii-vermittelte Antigenpräsentation wichtig (Smiley S. T. *et al.*, 1995), hat aber nur geringen Anteil an der Endozytose der Klasse II-Moleküle (Smiley S. T. *et al.*, 1995; Zhong G. *et al.*, 1997, Knorr R. *et al.*, 2009). In Position 225 der β -Kette befindet sich ein konservierter Lysinrest, der über MARCH-Ubiquitinligasen (MARCH-I und MARCH-VIII) mit Ubiquitin versehen wird (Shin J.S. *et al.*, 2006; van Niel G. *et al.*, 2006; Ohmura-Hoshino M. *et al.*, 2006). Die Ubiquitylierung der β -Kette resultiert in der clathrinabhängigen Internalisierung der MHCII-Moleküle von der Zelloberfläche. Diese Modifikation ist dafür verantwortlich, dass in unreifen DCs die MHCII-Moleküle in den endosomalen Kompartimenten und weniger auf der Zelloberfläche lokalisiert sind (Shin J.S. *et al.*, 2006; van Niel G. *et al.*, 2006; Ohmura-Hoshino M. *et al.*, 2006). Zwar wird auch die DR α -Kette mit Ubiquitin modifiziert, aber zu einem geringeren Anteil als die DR β -Kette (Lapaque N. *et al.*, 2009). Clathrin unabhängige Endozytosewege der MHCII-Moleküle wurden von Walseng E. *et al.* (2008) und Knorr R. *et al.* (2009) beschrieben. HeLa-CIITA, humane B-Zellen und DCs internalisieren pMHCII-Moleküle von der Zelloberfläche in frühe Endosomen und von dort aus in Rab35, Arf6, EHD1 enthaltende tubuläre Endosomen. Dieser Weg ist Clathrin, AP2 und Dynamin unabhängig. Dass auch Lipid-Rafts in die Endozytose von MHCII-Molekülen involviert sind, wurde in murinen B-Zellen entdeckt (Knorr R. *et al.*, 2009). MHCII-Moleküle kointernalisierten mit dem Cholera toxin (CTB), das an das Gangliosid G_M1 bindet. Daher wurde vermutete, dass MHCII-Moleküle über den GLIC/GEEC-Weg endozytiert

werden, der durch Cdc42, Arf1 und GRAF1 reguliert wird.

Die Ubiquitynylierung der Klasse II-Moleküle führt teilweise auch zum Einbau der MHCII-Moleküle in die intraluminalen Vesikel (ILV) der multivesikulären Endosomen (MVE) (Shin J.S. *et al.*, 2006; van Niel G. *et al.*, 2006; Ohmura-Hoshino M. *et al.*, 2006). Die Mechanismen nach denen MHCII-Moleküle in die intraluminalen Vesikel der MVEs sortiert werden sind noch nicht komplett verstanden. Es ist aber wahrscheinlich, dass der sog. ESCRT-Komplex (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) entscheidend daran beteiligt ist (van Niel G. *et al.*, 2008). Mit Ubiquitin modifizierte Transmembranproteine werden von Komponenten des sog. ESCRT-Komplexes (bestehen aus ESCRT-0, -I, -II, -III) erkannt und in die intraluminalen Vesikel der multivesikulären Endosomen transportiert (Piper R. C. und Katzmann D. J., 2007; Williams R. L. und Urbe S., 2007). Die initiale Erkennung ubiquitynylierter Moleküle erfolgt über die Proteine Hrs/Stam (ESCRT-0), welche durch Tsg101 mit dem ESCRT-I-Komplex interagieren. ESCRT-I und -II konzentrieren ubiquitynylierte Proteine an der endosomalen Membran. ESCRT-III rekrutiert deubiquitynylierende Enzyme, welche die Ubiquitinreste der Proteine vor deren Einbau in die ILVs abspaltet. Der ESCRT-III-Komplex ist auch für die Einstülpung der begrenzenden endosomalen Membran zur Bildung der intraluminalen Vesikel wichtig.

Das Schicksal der intraluminalen Vesikel der MVEs wird davon bestimmt, ob MVEs mit den Lysosomen oder der Zelloberfläche verschmelzen. Die Fusion mit den Lysosomen führt zum Abbau der intraluminalen Vesikel (Piper R. C. und Katzmann D. J., 2007). Das Verschmelzen mit der Zelloberfläche resultiert dagegen in einer Freisetzung der intraluminalen Vesikel in Form von Exosomen (Simons M. und Raposo G., 2009; Lakkaraju A. und Rodriguez-Boulan E., 2008). Wie reguliert wird, dass MVEs zur Zelloberfläche oder zu den Lysosomen gelangen, ist noch unklar. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass unterschiedliche Subpopulationen von MVEs existieren. Cholesterol scheint in MVEs angereichert zu sein, die mit der Plasmamembran verschmelzen, während LBPA in MVEs vorhanden ist, deren ILVs in Lysosomen abgebaut werden (Möbius W. *et al.*, 2002; Möbius W. *et al.*, 2003; White I. J. *et al.*, 2006; Simons M. und Raposo G., 2009).

1.1.7 Exosomen-vermittelte Exozytose von MHCII-Molekülen

Fusionieren MIICs mit der Zellmembran, werden zum einen die MHCII-Moleküle in der limitierenden Membran der MIICs in die Plasmamembran inseriert, zum anderen die intraluminalen Vesikel als Exosomen freigesetzt. MHCII-Moleküle, die sich zu diesem Zeitpunkt in den ILVs befunden haben, werden auf diese Weise in den extrazellulären Raum sezerniert. Die Sekretion von MHCII-Molekülen über Exosomen ist vor allem für Antigen-präsentierende Zellarten beschrieben worden; w.z.B. DCs, B-Zellen oder Makrophagen. Auch MHCII-negative Zellen wie T-Zellen, Mastzellen, Blutplättchen, oder auch Epithelzellen und Neuronen setzen Exosomen in das extrazelluläre Milieu frei (Blanchard N. *et al.*, 2002; Raposo G. *et al.*, 1997; Heijnen H. F. *et al.*, 1999; van Niel G. *et al.*, 2001; Wolfer J. *et al.*, 2001). Bei Exosomen handelt es sich um Vesikel mit einem Durchmesser von 30-100 nm und einer charakteristischen aber variablen Protein- und Lipidzusammensetzung (Simons M. und Raposo G., 2009; McLellan A. D., 2009). Für Exosomen charakteristische Proteine sind sog. Tetraspannine (z.B. CD63, CD81 oder CD9), MHCI-Moleküle, die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-3, die Hitzeschock Proteine Hsp70 und Hsp90, sowie Proteine die an der Bildung der Vesikel beteiligt sind (ESCRT-Komponenten, Tsg101, Alix u.a.) (Thery C. *et al.*, 2009).

Exosomen wurden ursprünglich bei Untersuchungen an Retikulozyten entdeckt, die während der Entwicklung zum Erythrozyten den nicht mehr benötigten Transferrin Rezeptor (TfR, CD71) mittels Exosomen sezernieren (Johnstone R. M. *et al.*, 1984). Heutzutage sind eine Vielzahl weiterer Funktionen von Exosomen bekannt (Shorey J. S. und Bhatnagar S., 2008). Diese umfassen die alternative Sekretion von Proteinen, die Antigenpräsentation, die Verwendung als Transportvehikel für mRNA, microRNAs und für infektiöse Mikroorganismen sowie die Immunüberwachung von pathogenen Mikroorganismen. Über Exosomen sezernierte MHCII-Moleküle spielen bei der Präsentation von Antigenen eine wichtige Rolle. Anhand von Studien mit Exosomen aus EBV-transformierten B-Zellen konnte gezeigt werden, dass Exosomen humane CD4+ T-Zellen antigenspezifisch stimulieren können (Raposo G. *et al.*, 1996). Für diese Versuche waren vermutlich unphysiologisch hohe Mengen an Exosomen eingesetzt worden. Neuere Untersuchungen wiesen nach, dass Exosomen von primären B-Zellen schon vorher aktivierte, aber keine naiven CD4+ T-Zellen aktivieren können (Muntasell A. *et al.*, 2007). Exosomen aus HCMV-infizierten allogenen Epithelzellen sind zudem in der Lage über DCs entsprechende Gedächtnis CD4+-T-Zellen zu aktivieren (Walker J. D. *et al.*, 2009).

Auf welchem Wege MHCII-Moleküle in Exosomen transportiert werden ist noch unbekannt. Eine sehr aktuelle Studie kommt zu dem Schluss, dass zumindest in HeLa- oder 293T-Zellen nicht die Ubiquitynylierung für den Einbau in die Exosomen verantwortlich ist (Gavreau M. E. *et al.*, 2009). Es gibt Hinweise darauf, dass die Interaktion mit Tetraspanninen z.B. CD63 das Sortieren von MHCII-Molekülen in Exosomen bewirkt (Simons M. und Raposo G. *et al.*, 2009)

1.2 Biologie des Herpes Simplex Virus Typ 1

Herpesviren sind Hüllviren mit doppelsträngigem DNS-Genom. Man findet Infektionen mit Vertretern der Herpesviren bei nahezu allen Wirbeltieren (Modrow S. *et al.*, 2003). Allen Herpesviren gemeinsam ist das DNS-Genom, die Partikelmorphologie und die Fähigkeit im Wirt eine latente Infektion zu etablieren. Bislang sind acht humanpathogene Herpesviren identifiziert. Je nach Pathogenität, dem Wirtszellspektrum und den Vermehrungseigenschaften werden sie drei Unterfamilien (α -, β - und γ -*Herpesvirinae*) zugeordnet (s. Tab. 2: verändert nach Sedy J. R. *et al.*, 2008 und Modrow S. *et al.*, 2003).

Tab. 2: Klassifikation der humanpathogenen Vertreter der *Herpesviridae*
(Verändert nach Sedy J.R. *et al.*, 2008 und Modrow S. *et al.*, 2003)

<u>Subfamilie</u>	<u>Formaler Name</u>	<u>Gemeiner Name</u>	<u>Krankheitsbild</u>
<i>Alphaherpesvirinae</i>	Humanes Herpesvirus 1 (HHV-1)	Herpes Simplex Virus Typ-1	Mukokutane Läsionen (Gesicht-, Genitalbereich), Keratitis und Enzephalitis
	Humanes Herpesvirus 2 (HHV-2)	Herpes Simplex Virus Typ-2	Mukokutane Läsionen (Gesicht-, Genitalbereich), Keratitis und Meningitis
	Humanes Herpesvirus 3 (HHV-3)	Varizella-Zoster Virus	Windpocken und Zoster (Gürtelrose)
<i>Betaherpesvirinae</i>	Humanes Herpesvirus 5 (HHV-5)	Zytomegalievirus	Krankheitsformen bei Transplantatempfängern und AIDS Patienten, intrauterine Infektionen, die mentale Retardierung und Taubheit verursachen
	Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6)	HHV-6	Drei-Tage-Fieber (Roseola)
	Humanes Herpesvirus 7 (HHV-7)	HHV-7	Drei-Tage-Fieber (Roseola)
<i>Gammaherpesvirinae</i>	Humanes Herpesvirus 4 (HHV-4)	Epstein-Barr Virus (EBV)	Infektiöse Mononukleose, Burkitt Lymphom, AIDS-assoziierte Lymphome, Hodgkin Lymphome, Nasopharynx Karzinome
	Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8)	Kaposi Sarkom-assoziiertes Virus	Kaposi Sarkom, Castleman´sche Krankheit

HSV-1 ist der Prototyp der α -Herpesviren. Zu den α -Herpesviren gehören neben HSV-1 und HSV-2 auch das Varizella Zoster Virus (VZV). Die Primärinfektion mit HSV-1 erfolgt zumeist im Kindesalter und ist in 90 % aller Fälle asymptomatisch (Whitley G., 2001). Im Laufe der Primärinfektion werden sensorische und autonome Nerven infiziert und das Virus gelangt über retrograden axonalen Transport in die Ganglien (bei HSV-1 handelt es sich meist um das Trigemini- oder das Ziliarganglion). In den dortigen Neuronen etabliert HSV eine latente Infektion. Es gibt verschiedene Stimuli, die zu einer Reaktivierung des Virus führen, z.B. UV-Strahlen, Fieber, psychische Einflüsse oder Stress. Neugebildete Virionen wandern daraufhin entlang der Axone in die Peripherie zurück und verursachen dort eine erneute Infektion (ein sog. Rezidiv; z.B. *Herpes labialis*). Im immunkompetenten Wirt sind die HSV-1 Infektionen meist auf relativ harmlose Hautläsionen im Gesichts- oder Genitalbereich beschränkt. In seltenen Fällen kann es aber auch zu schwerwiegenden Infektionen wie zu der herpetischen Enzephalitis kommen. Unbehandelt führt sie in 70 % der Fälle zum Tode und lediglich 2,5 % der überlebenden Patienten bleiben ohne neurologische Schäden (Whitley G., 2006). Problematisch ist die Situation auch bei immunsupprimierten Personen, wie HIV Patienten (McGrath B. J. und Newman C. L., 1994; Aoki F. Y., 2001), Verbrennungsoptionen (McGill S. N. und Cartotto R. C., 2000) oder Transplantatempfängern (Tan H. H. und Goh C. L., 2006;

Slifkin M. *et al.*, 2004; Ljungman P., 2001). Unter diesen Umständen können schwere disseminierte HSV-1 oder HSV-2 Infektionen mit Organbeteiligung die Folge sein.

1.2.1 Struktur und Biogenese der HSV Partikel

Herpes Simplex Viren sind DNS-Viren mit einem Durchmesser von 120 nm bis zu 260 nm, bestehend aus vier morphologisch distinkten Strukturen: Kern (Virus Core), Kapsid, Tegument und der Hülle. Der Kern ist eine fibrilläre Proteinmatrix mit welcher das lineare virale Genom assoziiert ist. Um den Kern herum befindet sich das ikosaedrische Kapsid, das wiederum von dem sog. Tegument umschlossen wird. Dies besteht aus einer Matrix, die bis zu 20 Virusproteine enthält, welche während der Infektion in die Zelle gelangen. Nukleokapsid und Tegument werden von der Virushülle umschlossen, die ca. zwölf viruskodierte Glykoproteine sowie 2 – 4 nicht glykosylierte Proteine enthält.

HSV Virionen entstehen durch einen komplizierten Reifungsprozess, der noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Mettenleiter T. C., 2002; Mettenleiter T. C., 2004; Mettenleiter T. C. *et al.*, 2006 a, Mettenleiter T. C. *et al.*, 2006 b). Die Kapsidproteine lagern sich zunächst im Kern autokatalytisch zum Kapsid zusammen. In das Kapsid wird das DNS-Genom integriert, woraus das Nukleokapsid entsteht. Dieses bindet daraufhin an Stellen der inneren Kernmembran, an welcher die Kernlamina lokal aufgelöst wurde. Im nächsten Schritt erhält das Virus die primäre Virushülle durch sog. „budding“ an der inneren Kernmembran. Auf diese Weise gelangt das Virus in den perinukleären Spalt zwischen innerer und äußerer Kernmembran. Durch Fusion der primären Hülle mit der äußeren Kernmembran verlässt das Nukleokapsid diesen Bereich und gelangt ins Zytoplasma, wo sich Tegumentproteine anlagern. Die endgültige sekundäre Hülle erhält das Virus entweder an Membranen des Trans-Golgi Netzwerkes oder den Endosomen. Durch vesikulären Transport gelangt das Virus schließlich zur Zelloberfläche und wird durch Exozytose freigesetzt.

1.2.2 Bindung und Fusion mit der Zielzelle

Eine erste aber noch schwache Bindung des Virus an die Zielzelle erfolgt über die Interaktion von gB und gC an Heparansulfatreste auf der Zelloberfläche (Shukla D. und Spear P. G., 2001; Adamiak B. *et al.*, 2007; Herold B. C., 1991). Diese Bindung ist reversibel und reicht nicht für das Eindringen des Virus in die Zelle. Für die Fusion des Virus mit der Zielzelle ist die koordinierte Aktivität von gD, gH, gL und gB notwendig (Campadelli-Fiume G. *et al.*, 2007). Die Bindung von gD an einen der Rezeptoren HVEM, Nectin 1, Nectin 2 oder sulfatierte Heparansulfatreste führt vermutlich zu einer Konformationsänderung (Spear P. G., 2004). Diese ermöglicht eine Interaktion von gD mit dem gH-gL-Komplex und die Fusion der HSV-Hülle mit der Zielzelle (Sedy J. R. *et al.*, 2008). Kürzlich wurde entdeckt, dass die Bindung von gB an PILR α (paired immunoglobulin-like type 2 receptor) zusätzlich zu der Bindung von gD an HVEM für eine Infektion der Zielzelle essentiell ist (Satoh T., *et al.*, 2008). Neben dem gH-gL-Komplex ist auch gB an dem Fusionsprozess mit der Zielzelle beteiligt (Krummenacher C. *et al.*, 2005). Sowohl gB als auch gH besitzen Peptidsequenzen, die nach Konformationsänderung frei werden und die Fusion mit der Zielzelle induzieren (Gianni T. *et al.*, 2005a; Gianni T. *et al.*, 2005b; Heldwein E. E. *et al.*, 2006; Hannah B. P. *et al.*, 2007; Hannah B. P. *et al.*, 2009). Je nach Zellart geschieht dies entweder an der Zelloberfläche oder in Endosomen nach Endozytose des Viruspartikels (Campadelli-Fiume G. *et al.*, 2007).

1.2.3 Immuneffektorreaktionen gegen Herpes Simplex Viren

An der Immunreaktion zur Bekämpfung von HSV-Infektionen sind sowohl das angeborene, wie das adaptive Immunsystem beteiligt (Whitley R. J., 1998). Im Gegensatz zu Teilen des innate Systems korreliert die Stärke der adaptiven Antwort mit dem Schutz vor einer symptomatischen Infektion (Pollara G. *et al.*, 2004). Insbesondere der zelluläre Teil des adaptiven Systems, d.h. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sind für die Kontrolle peripherer Infektionen essentiell (Koelle D. M. und Corey L., 2003). CD8⁺ T-Zellen sind zudem für die Unterdrückung der Virusreplikation in infizierten Neuronen von Ganglien der Rückenmarkswurzel verantwortlich (Khanna K. M. *et al.*, 2003). Neutralisierende Antikörper sind in der Lage die extrazelluläre Verbreitung der Viren zu beschränken und können auf diese Weise die Größe der Läsionen und die Infektion von Nervenzellen eingrenzen (Mikloska Z. *et al.*, 1999). Des Weiteren schützen HSV-spezifische Antikörper im Blut der Mutter und Kind vor einer Übertragung von HSV während des Geburtsvorganges (Brown Z. A. *et al.*, 2005).

Die Bedeutung von MHCII-vermittelten Immunreaktionen im Rahmen von HSV-Infektionen wird anhand von CD4⁺ defizienten Patienten bzw. Mausmodellen deutlich. Immunsupprimierte Menschen mit geringer CD4⁺ Zellzahl weisen schwerwiegendere HSV-Rekurrenzen und länger anhaltende Symptome auf (Lopez C. und O'Reilly, 1977; Siegal F. P. *et al.*, 1981). Des Weiteren korreliert der Verlust von CD4⁺ T-Zellen bei HIV-Patienten mit dem Freisetzen von HSV-2 Viren im Genitalbereich (Koelle D. M. und Corey L., 2008). Auch in Mausmodellen, in denen CD4⁺ T-Zellen gezielt ausgeschaltet wurden, korreliert der Verlust der CD4⁺ T-Zellen mit dem Grad der HSV-Infektion. CD4⁺ defiziente oder depletierte Mäuse zeigen schwerwiegendere Infektionen des Nervensystems (Nash A., 1987) oder eine höhere Empfindlichkeit gegenüber kutanen HSV induzierten Läsionen (Manickan E. und Rouse B. T., 1995). In Abwesenheit von CD4⁺ T-Zellen entstehen zudem kaum bzw. nicht vollständig funktionelle HSV-1 spezifische CD8⁺ T-Zellen (Smith C. M. *et al.*, 2004; Rajasagi N. K. *et al.*, 2009). CD8⁺ Zellen sind wichtig für die Eliminierung infizierter Zellen und die Aufrechterhaltung einer latenten Infektion in den Neuronen. Aktivierte CD4⁺ T-Zellen stimulieren B-Zellen zur Bildung antiviraler Antikörper oder wirken unmittelbar am Infektionsort. Dort sezernieren sie Zytokine wie TNF α und IFN γ oder töten infizierte Zellen ab (Mikloska Z. und Cunningham A. L., 1998). Die Sekretion von IFN γ und TNF α induziert in infizierten bzw. nicht-infizierten Zellen einen antiviralen Status und stimuliert Immunzellen w.z.B. NK-Zellen oder Makrophagen.

1.2.4 Immunevasionsstrategien von Herpes Simplex Viren

Immunevasionsstrategien tragen dazu bei, dass sich Viren in einem infizierten, immunkompetenten Wirt erfolgreich behaupten können. Vor allem für Viren, die lebenslang im Wirt verbleiben (z.B. bei HSV-1 und HSV-2) sind solche Mechanismen essentiell um einerseits einer Eliminierung aus dem Körper zu entgehen und eine Übertragung auf neue Wirtsorganismen zu ermöglichen. Bei Herpes Simplex Viren vom Typ 1 und -2 haben sich daher eine Vielzahl von Evasionsmechanismen entwickelt (Friedmann H. M., 2003; Sattenau Q., 2008; Finlay B. B. und McFadden G., 2006). Diese umfassen das Etablieren einer latenten Infektion im Nervensystem, das Blockieren von Apoptose (Morten E. R. und Blaho J. A., 2007; Han J. Y. *et al.*, 2007), die Hemmung von CD4⁺, CD8⁺ und NKT-Zellantworten (Aubert M. *et*

al., 2006; Raftery M. J. *et al.*, 2006; Yuan W. *et al.*, 2006; Barcey S. und Corey L. 2001), die Unterdrückung von Reifung und Migration der DCs (Theodoridis A. A. *et al.*, 2007; Novak N. und Peng W. M., 2005), die Verringerung der Wirksamkeit von Antikörpern oder des Komplement-Systems (Lubinski J. M. *et al.*, 2002; Friedmann H. M. 2003) sowie das Unterdrücken von Signaltransduktionswegen (Pasiaka T. J. *et al.*, 2006; Morgensen T. H. *et al.*, 2004). Obwohl MHCII-vermittelte Immunreaktionen eine kritische Rolle bei der Bekämpfung von HSV-Infektionen besitzen, sind nur wenige Untersuchungen über den Eingriff in den MHCII-Weg durchgeführt worden. Bei HSV-1 sind vier Proteine beschrieben worden, welche die Antigenpräsentation über MHCII-Moleküle beeinflussen. Trgovcich J. *et al.* (2002) zeigten in stabil mit dem Klasse II-Transaktivator (CIITA) transfizierten Glioblastomzellen nach HSV-1 Infektion eine stark verringerte MHCII-Oberflächenexpression. Durch virale Deletionsmutanten konnten diese Effekte auf die Virusgene UL41 und γ 34.5 zurückgeführt werden. Das US1-Genprodukt greift über einen noch unbekanntem Weg in die Antigenpräsentation ein und hemmt die Aktivierung spezifischer CD4⁺ T-Zellen (Barcey S. und Corey L., 2001). In unserer Arbeitsgruppe wurde vor einiger Zeit nachgewiesen, dass auch das Glykoprotein B auf den MHCII-Weg der Antigenpräsentation Einfluss nehmen kann (Neumann J. *et al.*, 2003; Sievers E. *et al.*, 2002).

1.2.5 Das HSV-1 kodierte Glykoprotein B

HSV-1 gB (gB) ist inklusive einer 29 oder 30 Aminosäuren (je nach Virusstamm) umfassenden Signalsequenz ein 903 bzw. 904 Aminosäuren (As) großes Typ-1 Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 120 kDa. gB besteht aus einer aus 696 As bestehenden Ektodomäne, einer 69 As umspannenden Transmembranregion und einem zytoplasmatischen Bereich von 109 Aminosäuren (Pellett P. E. *et al.*, 1985; UniProtKB/Swiss-Prot P10211; Version 53; 26 Mai 2009). Von den sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen werden fünf mit Glykanketten modifiziert (Cai W. Z. *et al.*, 1988). Der zytoplasmatische Bereich von gB enthält Signalmotive, welche die intrazelluläre Lokalisation bestimmen (Ortiz de Zarate I. B. *et al.*, 2004). 2006 wurde die Kristallstruktur einer verkürzten Variante von gB (Asp¹⁰³-Ala⁷³⁰) veröffentlicht (Heldwein E. E. *et al.*, 2006). Diese zeigt, dass das gB ein Trimer bildet und strukturell mit dem G-Protein aus VSV (Vesikuläres Stomatitis Virus) verwandt ist. Von den 12 Membran-assoziierten Glykoproteinen der Herpes Simplex Viren ist gB das Häufigste (Norais N. *et al.*, 1996). Unter den Glykoproteinen, die am Eintritt des Virus in die Zielzelle beteiligt sind, zeigt gB den höchsten Konservierungsgrad zwischen verschiedenen Herpesviren (Heldwein E. E. *et al.*, 2006).

HSV-1 gB ist an vielen Schritten des viralen Vermehrungszyklus beteiligt. Zu diesen gehören die Bindung und Fusion des Virus mit der Zielzelle, die Bildung und das Freisetzen der Viruspartikel sowie die Verbreitung von Viren auf die Nachbarzellen. Auch die Fähigkeit das Nervensystem zu infizieren wird von gB beeinflusst (Yuhasz S. A. und Stevens J. G., 1993). Die Bindung von gB an die Zielzellen erfolgt über Heparansulfatreste auf der Zelloberfläche (Laquerre N. *et al.*, 1998) und PILR α , einen kürzlich für gB beschriebenen Rezeptor (Satoh T. *et al.*, 2008). gB ist zudem ein Teil des aus gD, gH-gL und gB bestehenden Fusionskomplexes und enthält neben gH Fusionspeptidsequenzen (Heldwein E. E. *et al.*, 2006). gB stellt auch eines der Hauptangriffsziele des Immunsystems dar. Antikörper gegen gB haben virusneutralisierende Aktivität, induzieren Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC) und aktivieren das Komplement System (Lopez C. *et al.*, 1993). Aus gB stammende Peptide werden nach Präsentation über MHC I- und MHC II-Moleküle von CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen

erkannt (Koelle D. M. *et al.*, 1994; Tigges M. A. *et al.*, 1992).

1.3 Fragestellung der Arbeit:

Einfluss des HSV-1 Glykoprotein B auf den MHCII-Weg der Antigenpräsentation?

In unserer Arbeitsgruppe wurde vor einiger Zeit nachgewiesen, dass eine Eigenschaft des gB darin besteht, in den MHCII-Weg der Antigenpräsentation einzugreifen (Neumann J. *et al.*, 2003; Sievers E. *et al.*, 2002). Über eine Sequenzanalyse wurde bei HSV-1 gB ein Bereich identifiziert, welcher der sog. CBS-Region (MHC Class II **B**inding Site) der Invarianten Kette entspricht (Sievers E. *et al.*, 2002). Diese besteht aus einer prolinreichen- (PBS = **P**romiscuous **B**inding Site) und einer Grube-bindenden Sequenz (GBS = **G**roove **B**inding Site). Bei der CBS-Region handelt es sich um den Bereich von Ii, welcher in die Peptidbindungsgrube der MHCII-Moleküle bindet (Siebenkotten I. M. *et al.*, 1998). Die CBS-ähnliche Region von gB besteht ebenfalls aus der prolinreichen Sequenz und einem Grube-bindenden Bereich. Die Ankeraminosäuren der GBS-Region von gB enthalten Aminosäuren, welche eine Bindung an HLA-DR1 ermöglichen (Sievers E. *et al.*, 2002). Es wurde vermutet, dass gB über diese Sequenz an MHCII-Moleküle binden und auf diesem Wege die Beladung mit Peptiden verhindern kann. In transient transfizierten Zellen konnte gezeigt werden, dass gB an verschiedene HLA-DR Allotypen und sogar an MHCII-Moleküle der Maus bindet (Sievers E. *et al.*, 2002). Auch in einer infizierten B-Lymphomzelllinie konnte eine Interaktion von gB mit MHCII-Molekülen nachgewiesen werden (Neumann J. *et al.*, 2003). Die Analyse der Kohlenhydratketten legte nahe, dass die gB-assoziierten MHCII-Moleküle über den Golgi-Apparat hinaus transportiert werden. Allerdings konnten keine gB-MHCII-Komplexe auf der Zelloberfläche detektiert werden. Auf welchem Wege gB den intrazellulären Transport der MHCII-Moleküle beeinflusst blieb offen. Zudem konnte in infizierten B-lymphoblastoiden Zellen eine geringere MHCII-Oberflächenexpression, eine drastische Reduktion von Ii, sowie ein kleinerer Anteil an peptidbeladenen MHCII-Molekülen nachgewiesen werden. Anhand dieser Daten wurde das Modell abgeleitet, dass gB im ER an MHCII-Moleküle bindet, die gB-MHCII-Komplexe aus dem ER transportiert werden, aber nicht zur Zelloberfläche gelangen und in einem unbekanntem Kompartiment verbleiben.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, auf welchem Weg gB den intrazellulären Transport der MHCII-Moleküle beeinflusst, wo gB-MHCII-Komplexe innerhalb der Zelle verbleiben und inwieweit durch die Expression von gB die Organisation des endosomalen Systems beeinflusst wird.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Geräte

Agarosegelektrophorese	Renner, Darmstadt
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Autoradiographiekassetten	Faust GmbH, Köln
Bakterieninkubator	Edmund Buehler GmbH & Co., Bodelshausen
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Zürich
Durchflusszytometer FACS Scan	BD, USA
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Geldokumentationsapparatur	Cybertech, Berlin
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf GmbH, Hamburg
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riss
Laborwippe	Biometra, Göttingen
Mikroliterpipetten	Labsystems, Finnland
Mikroskop Wilovert	Hund, Wetzlar
Mikrowellenherd	AEG, Nürnberg
Netzgeräte	Renner, Darmstadt
Neubauer Zählkammer	Faust GmbH, Köln
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Proteinelektrophoresekammer	cti, Idstein
Semydry Blotting Apparatur	Biometra, Göttingen
Sicherheitswerkbank	Steag, Pfullingen
Spektrometer U-1100	Hitach, Japan
Thermomixer 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg
Tiefkühltruhe (-80°C)	Colora, Ratingen
Vortex genie 2	Bender & Holbein, Zürich
Wasserbad Julabo 12 B	Julabo, Houston
Zentrifugen:	
Biofuge 13	Heraeus, Zürich
Biofuge 22 R	Heraeus, Zürich
Centrifuge 5417 C	Eppendorf GmbH, Hamburg
J-20HS	Beckmann, Hamburg
L8M	Beckmann, Hamburg
Megafuge 1.0	Heraeus, Zürich
Optima™ TL Ultracentrifuge	Beckmann, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen und Kanülen
Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme
FACS Röhrchen
Gel-Blotting Filterpapier GB003
Kryoröhrchen
Nitrozellulosemembran BA83
Ultrazentrifugenröhrchen
Parafilm
Pasteurpipetten
Reaktionsgefäße 1,5/2ml
Röntgenfilme Cronex
Sterilfilter 0,22/0,45µm
Zellkulturschalen und Flaschen
Zentrifugenröhrchen

Henke-Sass Wolf, Tuttlingen
Agfa-Gaevert, Leverkusen
Sarstedt, Nümbrecht
Whatman, UK
Nunc, Wiesbaden
Whatman, UK
Beckmann, Hamburg
American Can Company, USA
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agfa-Gaevert, Leverkusen
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht

Reagenzien

30 % Acrylamid-Bisacrylamid (17,5:1)
Agarose
Aldehyd-Sulfat Latexkugeln (4µm)
Ammoniumpersulfat
Ampicillin
Beta-Mercaptoethanol
Bromphenolblau
BSA (Fraktion V)
CL-4B Sepharose
Complete Protease Inhibitoren
DYT Medium
DMEM
DMSO
DTT
EMEM
Ethidiumbromid
FACS Flow
FCS
G418
Glyzerin
HEPES
Hybridomed DIF-1000
LB Broth, Lennox
Mowiol
Natrium-Pyruvat
Nonidet P-40 (NP-40)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Invitrogen, USA
Biorad, USA
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, München
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pharmacia GmbH, Freiburg
Roche, Mannheim
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PAA, Österreich
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Biorad, USA
Lonza, Belgien
Merck, Darmstadt
BD Biosciences, Heidelberg
PAA, Österreich
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PAA, Österreich
Biochrom, Berlin
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Calbiochem, Darmstadt
PAA, Österreich
Fluka AG, Schweiz

2. Material und Methoden

PBS	PAA, Österreich
Penicillin und Streptomycin	PAA, Österreich
PermaFluor	Immunotech, Frankreich
Protein-A-Sepharose	Amersham, Freiburg
Protein-G-Sepharose	Amersham, Freiburg
PPO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Radioisotop ³⁵ S-Methionin	Amersham, Freiburg
Roti-Block	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti-Immunoblock	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640	PAA, Österreich
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS-PAGE Probenpuffer (Roti-Load)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Spectinomycin	Sigma-Aldrich, München
TEMED	Biorad, USA
Tris-Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TritonX-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (für die Zellkultur: 0,05 % / 0,02 % in PBS)	PAA, Österreich
Kits:	
DNS Agarose Elutionskit	Macherey-Nagel, Düren
GC-Rich PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Plasmidpräparation	Macherey-Nagel, Düren
BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression	Invitrogen, USA
Vector Kit with EmGFP	
Transfektionsreagenzien:	
CalPhos™	BD Bioscience, Heidelberg
jetPEI™	Biomol, Hamburg
DNS und Proteinstandards:	
Gene Ruler 100 bp DNS-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Fragmentgrößen (bp): 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100	
Gene Ruler 1 kb DNS-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Fragmentgrößen (bp): 10.000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1000, 750, 500, 250	
Prestained Protein MW Standard	Peqlab, Erlangen
Molekulargewichte (kDa): 118, 88, 47, 36, 26, 20	
[¹⁴ C]-Proteinstandard	Amersham, Freiburg
Molekulargewichte (kDa): 220, 97, 66, 46, 30, 14	

2.1.3 Verwendete Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden *E. coli* Bakterienstämme mit folgendem Genotyp¹ genutzt:

DH5α: F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG
Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ-

XL1-blue: endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10
proAB⁺ laci^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)

TOP10 (Invitrogen): F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG
recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galk16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻

2.1.4 Verwendeter Virusstamm

HSV- 1 Stamm 17⁺

2.1.5 Zelllinien

COS-7 (ATCC CRL-1651):

SV-40 transformierte Affennierenzellen (*Cercopithecus aethiops*), adhärenz, Kultur in DMEM 4,5 g/l Glucose, 10 % FCS, 5 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 0,01 mg/ml Streptomycin.

IMR90S

SV-40 transformierte Version der IMR-90 Zelllinie (ATCC: CCL-186). Es handelt sich um humane, adhärenz Lungenfibroblasten. Kultur in EMEM, 15 % FCS, 5 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 0,01 mg/ml Streptomycin.

HEK-293T

Derivat der adhärenz, human embryonale Nierenzelllinie (HEK-293), die das große T-Antigen von SV-40 exprimiert (HEK-293T). Kultur in RPMI, 10 % FCS, 5 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 0,01 mg/ml Streptomycin.

Mel JuSo (MJ)

Adhärenz wachsende, MHCII-exprimierende, humane Melanomzelllinie (Johnson J. P. *et al.*, 1981). Kultur in DMEM 4,5 g/l Glucose, 10 % FCS, 5 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 0,01 mg/ml Streptomycin.

¹ (Genotypen von: http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes#DH5.CE.B1; 19.8.2008)

Raji (ATCC: CCL-86)

In Suspension wachsende, humane B-Lymphomzelllinie (Burkitt Lymphom). 1964 von J. V. Pulvertaft etabliert. Kultur in RPMI, 10 % FCS, 5 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 0,01 mg/ml Streptomycin.

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper

Klon	Isotyp/Spezies	Epitop	Einsatz	Quelle	Literatur
2c2	IgG2a/Maus	Glykoprotein B aus HSV-1, -2	FACS, IF, IP	Prof. Dr. med. vet. Eis-Hübinger	Eis-Hübinger A. M. <i>et al.</i> , 1993
10B7	IgG1/Maus	Glykoprotein B aus HSV-1, -2	Western Blot, IF	Abcam (ab6506)	
L243	IgG2a/Maus	MHCII-Moleküle, Peptid und CLIP beladen	FACS, Western Blot	Eigene Herstellung	Lampson L. A. und Levy R., 1980
ISCR3	IgG2b/Maus	MHCII-Moleküle	FACS, IF	Eigene Herstellung	Watanabe M. <i>et al.</i> , 1983
LGII-612.14	IgG/Maus	MHC II β -Kette	FACS, Western Blot	Soldano Ferrone; Roswell Park Cancer Institute	Temponi M. <i>et al.</i> , 1993
TAL-1B5	IgG1/Maus	HLA-DR α	Western Blot	Eigene Herstellung	Adams T. E. <i>et al.</i> , 1983
D1-12	IgG2a/Maus	HLA-DR	FACS	Eigene Herstellung	Accolla R. S. <i>et al.</i> , 1981 Hitzel C. <i>et al.</i> , 1999
I80Ag-11	IgG/ Maus	HLA-DR	FACS	Eigene Herstellung	Pesando J. M. und Graf L., 1986
16.23	IgG3/Maus	HLA-DR	FACS	Eigene Herstellung	Adams T. E. <i>et al.</i> , 1983 Göttlinger H. G. <i>et al.</i> , 1988 Verreck F. A. <i>et al.</i> , 2001
2.06	IgG1/Maus	HLA-DR, -DP, -DQ	FACS	Eigene Herstellung	Charron D. J. und McDevitt H. O., 1980
I251SB	IgG/Maus	HLA-DR, -DP	FACS	Eigene Herstellung	Pesando J. M. und Graf L., 1986
MEM-12	IgG1/Maus	HLA-DR (Alexa-700 gekoppelt)	FACS/IF	ExBio	Horejsi V. <i>et al.</i> , 1986
W6/32	IgG2a/Maus	MHCI Moleküle	FACS, IF	Eigene Herstellung	Barnstable C. J., 1978

2. Material und Methoden

Bu43	IgM/Maus	Humane Invariante Kette; Trimerisierungsdomäne	Western Blot		Wraith C. J. <i>et al.</i> , 1990
Bu45	IgG1/Maus	Humane Invariante Kette	FACS	Eigene Herstellung	Wraith C. J. <i>et al.</i> , 1990
Vic-Y1	Maus	Humane Invariante Kette	FACS		Quaranta V. <i>et al.</i> , 1984
6D4	IgG1/Maus	RT1-DM β	Western Blot	Eigene Herstellung	Kurth D. <i>et al.</i> , 1997; Neumann J., 2005
	IgG2a/Maus	14 AS großes V5 Epitop aus dem P/V Protein des Paramyxovirus SV5	Western Blot	Invitrogen (R960-25)	Southern J. A. <i>et al.</i> , 1991
	Polyklonal/Kaninchen	6-His	IF, Western Blot	Bethyl Laboratories (A190-114A-4)	
AC-40	IgG2a/Mouse	Aktin	Western Blot	Sigma (A3853)	
Clone 37	IgG1/Maus	Calnexin	Western Blot	BD Biosciences (610523)	
MAR 18.5	IgG2a/Maus	Maus anti Ratte	FACS	Eigene Herstellung	Lanier L. L. <i>et al.</i> , 1982
MEM-259	IgG1/Maus	CD63 (auch Alexa-488 gekoppelt)	FACS, IF, Western Blot	ExBio (11-343-C100)	
MEM-61	IgG1/Maus	CD9	FACS	ExBio (11-208-C020)	
MEM-75	IgG1/Maus	CD71, TfR	FACS	ExBio (11-235-C020)	
JS-81	IgG1/Maus	CD81	FACS	BD Biosciences (555675)	
FK1	IgM/Maus	Poly-Ubiquitin	Western Blot	C. Rogon (AG Höhfeld, Universität Bonn)	Fujimuro M. <i>et al.</i> , 1994; Fujimuro M M. und Yokosawa H., 2005
FK2	IgG1/Maus	Mono- und Poly-Ubiquitin	Western Blot; IF	C. Rogon (AG Höhfeld, Universität Bonn)	Fujimuro M. <i>et al.</i> , 1994; Fujimuro M M. und Yokosawa H., 2005
P4D1	IgG1/Maus	Mono- und Poly-Ubiquitin	Western Blot	Dr. Simone Diestel (Universität Bonn Institut für Tierwissenschaften)	

Sekundärantiseren:

Ziege anti-Maus IgG; Peroxidase gekoppelt; Dianova (115-035-062)

Ziege anti-Maus IgM; Peroxidase gekoppelt; Dianova (115-035-075)

Ziege anti-Maus IgG; Alexa488 gekoppelt; Invitrogen (A-11001)

Ziege anti-Maus IgG; Alexa594 gekoppelt; Invitrogen (A-11005)

2.1.7 Verwendete Plasmide

Insert	Protein-Tag	Vektor	Interne Nummer
HSV-1 Glykoprotein B	C-Terminal, His-Myc	pcDNA3.1 (-), (Invitrogen)	260
HLA-DR α	kein Tag	pcDNA3.1 V5-His-TOPO (Invitrogen)	449
HLA-DRB1*0101	kein Tag	pcDNA3.1 V5-His-TOPO (Invitrogen)	450
HLA-DPB1*0401	C-Terminal, V5-His	pcDNA3.1 V5-His-TOPO (Invitrogen)	465
Anti-CD74 microRNA Nr.72	EmGFP	pcDNA 6.2. GW (Invitrogen)	484
Anti-CD74 microRNA Nr.394	EmGFP	pcDNA 6.2. GW (Invitrogen)	485

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Anzucht von *E.coli* Stämmen zur Plasmidpräparation

Die Bakterienklone wurden für 12-16 Stunden in LB- oder 2YT-Medium bei 37°C in einem Rotationsinkubator kultiviert. Zur Selektion wurde das Medium mit einem Antibiotikum versetzt (Ampicillin: 100 μ g/ml; Spectinomycin 50 μ g/ml).

2.2.2 Präparation von Plasmid-DNS

Zur Gewinnung von Plasmid-DNS wurden je nach Bedarf zwei unterschiedliche Methoden genutzt. Für Plasmid-DNS mit hohem Reinheitsgrad (z.B. für Transfektionen) wurde das „NucleoBond PC 100“ Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Die anschließende Reinigung der DNS erfolgte über Isopropanol- und Ethanol-fällung. Die DNS wurde in ddH₂O resuspendiert, auf eine Konzentration von 0,5 μ g/ μ l eingestellt und bei -20 °C gelagert. DNS mit geringem Reinheitsgrad (z.B. für Restriktionsanalysen) wurde über ein Protokoll aufgereinigt, das auf der alkalischen Lyse beruht. Das Bakterienpellet einer 1,5-2 ml über Nacht Bakterienkultur wurde in 200 μ l S1 Puffer (Macherey-Nagel, Düren) resuspendiert und anschließend mit 200 μ l Lysepuffer (0,2 M NaOH, 1 % SDS) versetzt. Nach 2 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde 300 μ l 7,5 M Ammoniumacetatlösung zugefügt und für weitere 10 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde zwei mal bei 18.000 x g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues

Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNS wurde aus dem klaren Überstand über Isopropanol-/Ethanol-fällung aufgereinigt und anschließend in 50 µl ddH₂O resuspendiert.

2.2.3 Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration

Die DNS wurde in ddH₂O verdünnt und die Absorption (OD) bei 260 nm im Photometer gemessen. Die Umrechnung in die Endkonzentration erfolgte mit der Formel:

$$\text{OD} \times \text{VD} \times 50 = \mu\text{g DNS/ml} \quad \text{VD} = \text{Verdünnungsfaktor}$$

Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten wurden über den Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. DNS-Lösungen mit einem Quotient um 1,8 gelten als rein.

2.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR beruht auf der Vervielfältigung einer DNS-Sequenz mit Hilfe einer hitzeresistenten DNS-Polymerase (*Taq*, *Pfu*, *Tgo*) und einem Paar zu den Enden der zu amplifizierenden Sequenz komplementärer Oligonukleotide (Primer). In dieser Arbeit wurde die PCR für sog. Kolonie-PCR Reaktionen verwendet, welche dazu dienen transformierte Bakterienklone zu analysieren. Für diese PCRs wurde die *Taq*-Polymerase und entsprechende Puffer von MBI-Fermentas, den Angaben des Herstellers entsprechend, verwendet.

2.2.5 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNS

Über Restriktionsanalysen lässt sich u.a. das Insert eines Vektors überprüfen. Diese Analysen wurden nach Angaben der Hersteller mit einer Enzymkonzentration von 0,5-2 U/µg eingesetzter DNS durchgeführt.

2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Je nach gewünschtem Auftrennungsbereich wurde DNS in 1-2 %igen TAE-Agarosegelen bei 20-100 V konstanter Spannung aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNS unter UV-Licht wurde bei der Herstellung des Agarosegels Ethidiumbromid (1 µg/ml Endkonzentration) zugefügt.

2.2.7 Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen

Hierzu wurde das Nucleospin Extraction Kit II (Macherey-Nagel) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die DNS wurde unter einer UV Lampe bei einer Wellenlänge von 365 nm aus dem Gel ausgeschnitten, mit 200 µl NT-Puffer pro 100 mg Gel versetzt und 10 min bei 50 °C erhitzt. Die Lösung wurde auf eine Säule gegeben und zentrifugiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde die DNS mit 50-100 µl ddH₂O von der Säule eluiert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle eukaryontischen Zellen wurden im Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert. Als Zellkulturmedien wurden je nach Zelllinie RPMI 1640, DMEM oder EMEM mit 10 % oder 15 % FCS sowie 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 1 mM Na-Pyruvat, 1 mM HEPES und 2 mM L-Glutamin verwendet. Die Medien und Zusätze wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, PAA (Österreich), Lonza (Schweiz) und BioWhittaker (Belgien) bezogen.

Zur Gewinnung von Exosomen wurden alle Zelllinien für 24-48 h in dem serumfreien Medium Hybridomed DIF-1000 (Biochrom, Berlin) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.3.2 Transiente Proteinexpression in eukaryontischen Zellen

Die Transfektion von eukaryontischen Zellen wurde mit jetPEI (Biomol, Hamburg) durchgeführt. Bei jetPEI handelt es sich um kationische Polyethyleniminkomplexe, die mit der negativ geladenen DNS-Komplexe bilden. Die DNS/jetPEI-Komplexe binden an die negative Zelloberfläche und werden aufgenommen. Pro Transfektion eines wells (6 well Platte) wurden 0,5 µg DNS sowie 3 µl jetPEI eingesetzt und getrennt voneinander mit 150 mM NaCl auf je 50 µl aufgefüllt. Nach dem Mischen beider Lösungen wurde für 20 min bei RT inkubiert und das DNS/jetPEI Gemisch anschließend tropfenweise auf den Zellen verteilt. Die Zellen wurden für 48-72 h im Brutschrank weiterkultiviert.

2.3.3 Stabile Proteinexpression in eukaryontischen Zellen

Zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien wurden Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert und bei einer Konfluenz von 50-60 % mit 5 µg Plasmid-DNS und 15 µl jetPEI transfiziert. Nach 48 h wurde mit der Selektion transfizierter Zellen mittels des Neomycinderivates G418 (500 µg/ml) begonnen. Stabil transfizierte Zellklone konnten nach ca. zwei Wochen von der Zellkulturschale abgenommen und expandiert werden. Die Überprüfung der Proteinexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie und Western Blotting.

2.3.4 Gewinnung von Exosomen aus Zellkulturüberstand

Zur Gewinnung von Exosomen wurden die Zellen für 24-48 h in serumfreiem Medium DIF-1000 (Biochrom, Berlin) kultiviert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und für 10.000 x g bei 4 °C abzentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde durch einen 0,22 µm Filter filtriert und daraufhin bei 100.000 x g in der Ultrazentrifuge für 2-24 h abzentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS gewaschen und erneut für 1 h bei 100.000 x g abzentrifugiert. Schließlich wurde die sedimentierten Exosomen in PBS aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.3.5 Infektion von Zellen mit HSV-1

Die Infektion der Zellen mit HSV-1 Stamm 17+ erfolgte am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie des Universitätsklinikums Bonn.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und dann 4 ml virushaltiges Medium pro 175 cm² Schale zugefügt (MOI = 1) und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen, Nährmedium zugegeben und für die angegebenen Zeiträume im Brutschrank kultiviert.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Biosynthetische Markierung zellulärer Proteine

Für die biosynthetische Markierung von Proteinen mit ³⁵S-Methionin (GE Healthcare, München) wurden 5x10⁶ Zellen von der Zellkulturschale abgelöst (PBS mit 2,5 mM EDTA), mit Methionin-freiem Medium (Biochrom, Berlin) gewaschen und dann für 1 h in 600 µl Pulse-Medium (Methionin-freies Medium, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat, 10 mM Hepes, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 40 µCi ³⁵S-Methionin für 30 min bei 37 °C markiert. Nach Entnahme des Überstandes wurden die Zellen bei -20 °C gelagert oder lysiert.

2.4.2 Herstellung von Zelllysaten

Adhärente Zellen wurden durch Abschaben oder durch Behandlung mit PBS/EDTA (PBS, 2,5 mM EDTA) oder Trypsin-EDTA Lösung und anschließende Zentrifugation gesammelt. Die Zellen wurden durch Zugabe von 250 µl Lysepuffer (ST-Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5), 0,5 % NP-40, Complete Protease Inhibitoren) pro 1x10⁷ Zellen und Inkubation für 20 min auf Eis lysiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 18.000 x g (20 min, 4°C) abgetrennt. Das Lysat wurden mit Probenpuffer versetzt oder bei -20 °C eingefroren.

2.4.3 Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation ist die Isolierung eines spezifischen Proteins oder eines Proteinkomplexes aus einem Proteingemisch möglich. Dazu werden Antikörper verwendet, die über ihre variable Region eine Determinante eines bestimmten Proteins erkennen und mit ihrer konstanten Region an Protein A- oder Protein G-Sepharose binden. Durch Zentrifugation kann der Protein A/G-Immunkomplex sedimentiert werden.

Die Lyse von ca. 1x10⁷ Zellen erfolgte in 250 µl Lysepuffer (s.o.) für 20 min auf Eis. Die Zelltrümmer wurden für 20 min bei 18.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Unspezifisch an

Sepharose bindende Proteine wurden aus dem Lysat über eine Vorabsorption mit 50 µl CL4B-Sepharose (Pharmacia, Schweden) entfernt. Die spezifische Immunpräzipitation erfolgte für 1-24 h bei 4 °C im Sonnenrad mit 10 µl Protein A/G-Sepharose (wurde vorher mit 200 µl ST-Puffer gewaschen; GE Healthcare, München) und dem spezifischen Antikörper in einem Volumen von 250-500 µl. Der Sepharose-Immunkomplex wurde durch Zentrifugation (3000 x g für 3 min.) pelletiert. Anschließend wurde das Präzipitat 3x mit 300 µl (ST-Puffer + 0,25 % NP-40) gewaschen. Zur Ablösung der Immunkomplexe wurde das Pellet in 30 µl reduzierenden Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Zu der Darstellung SDS-stabiler MHCII-Komplexe wurden die Immunkomplexe in 30 µl reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Um Proteine/Proteinkomplexe von der Zelloberfläche zu isolieren, wurden ca. 10^7 Zellen mit 5 ml PBS/2,5 mM EDTA-Lösung von der Zellkulturschale (10 cm Durchmesser) abgelöst und nach Zentrifugation (500 x g, 5 min.) in 1 ml FACS-Puffer (PBS, 2 % FCS, 0,01 % Na-Azid) aufgenommen und mit ca. 5 µg des spezifischen Antikörpers für 60 min behandelt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 5 ml FACS-Puffer gewaschen, die Zellen durch Zentrifugation (500 x g, 5 min.) gesammelt und in 500 µl lysiert (ST-Puffer, 0,5 % NP-40, Complete Protease Inhibitoren). Unlöslicher Bestandteile wurden durch Zentrifugation (18.000 x g; 4°C, 15 min.) abgetrennt, der Überstand abgenommen und für die Immunpräzipitation verwendet. Dieses Lysat wurde über Nacht mit Protein A-Sepharose inkubiert. Nach dem Waschen der Protein A-Immunkomplexe mit 250 µl ST-Puffer/0,25 % NP-40 wurden diese in 60 µl reduzierenden Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C aufgeköcht.

2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli U. K., 1970) beruht auf der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichtes. Die in Probenpuffer aufgenommenen Proteine werden durch Aufkochen bei 95 °C und das im Probenpuffer enthaltene Detergenz Natriumlaurylsulfat (SDS) denaturiert. Der Anteil negativ geladener SDS-Moleküle, die an die hydrophoben Regionen der Proteine binden, ist proportional zu dem Molekulargewicht des Proteins. Auf diese Weise wird die Eigenladung der Proteine überdeckt. Inter- und intramolekulare Disulfidbrücken werden durch das im Probenpuffer enthaltene DTT reduziert. Faltung und Eigenladung beeinflussen in der SDS-PAGE folglich nicht die Auftrennung der Proteine. Zur Fokussierung der Proteinbanden durchlaufen die SDS/Protein-Komplexe bei der SDS-PAGE zunächst ein großporiges Sammelgel mit geringem Polyacrylamidanteil. Anschließend erfolgt die Auftrennung der Komplexe dem Molekulargewicht entsprechend in einem höherprozentigem Trenngel mit geringer Porengröße.

2.4.5 Fluorographie

Mit ^{35}S -Methionin markierte Proteine wurden mittels Fluorographie (Bonner W. M. und Laskey R. A., 1974) nachgewiesen. Nach Beendigung des Gellaufes wurden die Gele für 30 min in unverdünntem DMSO entwässert und anschließend 30 min in einer PPO-Lösung inkubiert (PPO bewirkt eine Verstärkung der im Gel gebundenen Radioaktivität). Daraufhin wurden die Gele wieder gewässert und schließlich bei 80°C auf einem Vakuumtrockner auf einem Filterpapier getrocknet. Die mit Radioaktivgelen und Röntgenfilmen bestückten Autoradiographiekassetten wurden bis zur Entwicklung (ca. 1 h bis mehrere Tage) bei -80 °C gelagert.

2.4.6 Western Blot-Analyse

Die Zelllysate oder Immunpräzipitate wurden in der SDS-PAGE bei 60-120 V konstanter Spannung aufgetrennt. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel für 10 min in ddH₂O gelagert. Der Transfer der Proteine erfolgte durch einen „Semidry“-Elektroblot auf eine Whatman BA83 Nitrozellulosemembran. Der Aufbau des Blottes bestand aus zwei Lagen Whatman Filterpapier, Nitrozellulosemembran, SDS-Gel und wieder zwei Lagen Filterpapier. Zuvor wurden die Membranen und die Filterpapiere in Transferpuffer (50 mM Tris, 40 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,4 % SDS) getränkt.

2.4.7 Darstellung von „SDS-stabilen“ MHCII-Molekülen

Werden MHCII-Moleküle mit hochaffinen Peptiden beladen, so ändert sich die Konformation der MHCII-Moleküle und sie nehmen eine kompakte Form ein (Natarajan S. K. *et al.*, 1999; Springer T. A. *et al.*, 1977). Diese kompakte Konformation ist in einer Lösung mit 2 % SDS für ca. 60 min stabil und bleibt daher auch während der Auftrennung der Moleküle in der SDS-PAGE erhalten. In der anschließenden Western Blot-Analyse lassen sich diese mit geeigneten Antikörpern (z.B. 1B5 oder LG-II) als eine Bande bei ca. 50-60 kDa nachweisen. Zur Erhaltung der kompakten MHC Klasse II-Moleküle werden die Lysate oder Immunpräzipitate mit Probenpuffer versetzt, 30 min bei RT inkubiert, aber nicht aufgekocht.

2.4.8 Behandlung mit Endoglykosidase H und N-Glykosidase F

Eine posttranslationale Modifikation von Proteinen ist die Kopplung von Zuckerresten an die Aminosäure Asparagin. Sie beginnt im ER mit Übertragung einer Oligosaccharideinheit von einem Dolichol-Anker auf einen speziellen Asparaginrest innerhalb der Aminosäuresequenz Asp-X-Ser/Thr. X steht dabei für eine beliebige Aminosäure außer Prolin. Noch im ER entsteht ein mannosereiches Oligosaccharid (High mannose oligosaccharide), welches während des Transportes durch den Golgi-Apparat weiteren Veränderungen unterworfen wird. Durch die Golgi Mannosidase II entsteht ein Kern Oligosaccharidkomplex, welcher als

Matrix für die Herstellung der Zuckerreste vom komplexen Typ dient. Das Enzym (Endoglykosidase H; EndoH), kann keine N-gebundenen Zuckerreste mehr abspalten, sobald bei diesen über das Enzym Golgi Mannosidase II zwei Mannosereste entfernt wurden. Daher wird eine Behandlung von Proteinen mit EndoH auch dazu verwendet, um zu überprüfen, ob ein Glykoprotein das ER verlassen hat. Das Abspalten von Zuckerresten durch EndoH führt zu einer Verringerung des Molekulargewichtes des Proteins um ca. 2,5-3 kDa pro Zuckerrest. Im Gegensatz zur Endoglykosidase H spaltet das Enzym N-Glykosidase F (PNGaseF) alle N-glykosidisch verbundenen Zuckerreste eines Proteins ab.

Für den EndoH und PNGaseF Verdau wurden Lysate oder Immunpräzipitate mit Probenpuffer versetzt und bei 95 °C aufgeköcht. Die Ansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

EndoH: 20 µl Lysat/Präzipitat + 3 µl Puffer G5 + 0,5 µl EndoH + 6,5 µl ST-Puffer

PNGaseF: 20 µl Lysat/Präzipitat + 3 µl Puffer G7 + 3 µl 10 % NP-40 + 0,2 µl PNGaseF + 3,8 µl ST-Puffer

G5: 50 mM Natriumzitat, pH 5,5 (New England Biolabs)

G7: 50 mM Natriumphosphat, pH 7,5 (New England Biolabs)

2.4.9 Durchflusszytometrie von Zellen

Mit Hilfe des Durchflusszytometers kann eine große Anzahl von Zellen nach einer Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern innerhalb kurzer Zeit quantitativ und qualitativ analysiert werden. Der Flüssigkeitsstrom, der die zu analysierenden Zellen enthält, wird zunächst hydrodynamisch fokussiert. Durch Vibration werden Tropfen vom Probenstrom abgelöst, die jeweils nur eine Zelle enthalten. So ist es möglich, dass die Zellen einzeln einen Messpunkt passieren können (z.B. Argonionenlaser $\lambda = 488 \text{ nm}$). An oder in den Zellen vorhandene Fluoreszenzfarbstoffe werden angeregt und emittieren Licht mit einer charakteristischen Wellenlänge, das über verschiedene Detektoren gemessen wird. Da mehrere Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Fluoreszenzmaxima gleichzeitig verwendet werden können, ist es möglich in einer Zelle unterschiedliche Parameter parallel zu analysieren.

Um Marker auf der Zelloberfläche von adhären Zellen zu analysieren, wurden Zellen mit PBS gewaschen, mit einer PBS/2,5 mM EDTA Lösung von der Zellkulturschale abgelöst und erneut in FACS-Puffer gewaschen. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper für 30 min. folgte eine 30-60 minütige Behandlung mit einem Gemisch aus einem Alexa-488 gekoppelten Sekundärantikörper und dem Farbstoff 7-AAD (10 µg/ml) bzw. Propidiumiodid (PI; 1 µg/ml). Durch Färbung mit 7-AAD oder PI lassen sich tote Zellen markieren und auf diese Weise von der Analyse ausschließen.

2.4.10 Durchflusszytometrie von Exosomen

Da Exosomen mit einem Durchmesser von 50 – 100 nm nicht groß genug sind, um im Durchflusszytometer gemessen zu werden, wurden sie zuvor an Latexkugeln (Invitrogen, USA) gekoppelt. Exosomen aus dem Überstand von $1 - 5 \times 10^6$ Zellen wurden isoliert und in 250 μ l PBS resuspendiert. Dazu wurden 5 – 15 μ l Latexkugeln (Aldehyd/Sulfat Latex) mit einem Durchmesser von 4 μ m (ca. $1,5 \times 10^6$ Kugeln/ μ l) gegeben und über Nacht im Rollrad bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen der Latexkugeln mit 500 μ l PBS erfolgten ein Blockierungsschritt. Die Latexkugeln wurden zu diesem Zweck in 500 μ l PBS/5 % BSA resuspendiert und für 30-60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Abblocken freier reaktiver Aldehydgruppen erfolgte in 500 μ l einer PBS/100 mM Glycin-Lösung für 30 Minuten bei RT. Anschließend wurden die mit Exosomen beladenen Latexkugeln mit den entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert. Da die Latexkugeln teilweise verkleben und auf diese Weise Dimere und Trimer entstehen, wurden in der SSC/FSC Darstellung für die Analyse nur die Population der einzelnen Latexkugeln ausgewählt.

2.4.11 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf 24-well Platten ausgesät, in welche runde Deckglässchen vorgelegt wurden. Nach 24 h wurden die Zellen 2x mit 500 μ l PBS gewaschen. Die Fixierung und Permeabilisierung erfolgte mit 500 μ l 4 %igem Paraformaldehyd (15 min, Raumtemperatur) und anschließender Behandlung mit 500 μ l einer 0,5 %igen TritonX-100 Lösung (20 min, Raumtemperatur). Zur Blockierung (1h-24 h bei 4 °C) wurde 500 μ l Roti-Immunoblock oder PBS mit 5 % BSA eingesetzt. Zur Detektion entsprechender Antigene wurden die Antikörper (Primär- und Sekundärantikörper) in PBS mit 1 % BSA gelöst und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Zur Kernfärbung wurden die Zellen mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) oder Bisbenzimid in einer Konzentration von 1 μ g/ml (verdünnt in PBS/0,1 % BSA) für 5 min bei Raumtemperatur behandelt. Die Zellen wurden mit Mowiol oder PermaFluor (IMMUNOTECH, Frankreich) eingebettet. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Axiophot der Firma Zeiss (Oberkochen). Zur Bearbeitung der Bilder wurde die Software AxioVision Vers. 4.6 (Zeiss, Oberkochen) verwendet.

2.4.12 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Diese Methode der Mikroskopie hat den Vorteil, dass sich Fluoreszenzsignale aus einer definierten optischen Schnittebene detektieren lassen. Besonders vorteilhaft ist dies bei Kollokalisationsstudien. Bei der konfokalen Laserscanning Mikroskopie wird ein fokussierter Laserstrahl über die Probe geleitet und das emittierte Fluoreszenzlicht hinter einer Lochblende detektiert. Durch diese Blende wird erreicht, dass zum größten Teil Signale aus der Brennebene detektiert werden. Dies hat zur Folge, dass man ein Bild aus einer definierten Ebene erhält, welches nur noch einen sehr geringen Anteil Streulicht aus anderen Ebenen aufweist. Durch Veränderung des Durchmessers der Lochblende lässt sich die Dicke der aufgenommenen Schnittebene bestimmen. Die Analysen in dieser Arbeit wurden

an einem LSM 510 Meta (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt und mit der Software LSM Image Browser und AxioVision Vers. 4.6 (beides Zeiss, Oberkochen) analysiert.

2.4.13 Auftrennung von Exosomen im Saccharosedichtegradienten

Aus je 5 ml 0,2 M und 5 ml 2,2 M Saccharoselösungen wurde mittels eines Gradientenmischers ein kontinuierlicher Saccharosegradient erzeugt. Die Exosomensuspension (1 ml mit Exosomen aus dem Überstand von 10^7 - 10^8 Zellen) wurde auf den Gradient geschichtet und dann bei 4 °C und 100.000 x g über Nacht zentrifugiert. Die Fraktionen (1 ml) wurden von der Oberseite des Gradienten abgenommen und deren Brechungsindex mittels Refraktometrie ermittelt. Über eine Eichgerade erfolgte die Umrechnung des Brechungsindex in die Dichte.

Zur Isolierung der Exosomen wurden die Fraktionen mit PBS verdünnt und anschließend durch Zentrifugation bei 100.000 x g pelletiert. Das Exosomenpellet wurde in PBS resuspendiert und die Exosomen bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.14 Endozytose-Assay

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit PBS/EDTA von der Kulturschale abgelöst, mit gewaschen und in FACS-Puffer mit dem mAk L243 für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, in Medium aufgenommen und für die angegebene Zeit bei 37 °C kultiviert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von eiskaltem FACS-Puffer abgestoppt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit einem Gemisch aus einem Alexa-488 gekoppeltem Sekundärantikörper und 7-AAD auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

2.5 Verwendete Computerprogramme

Sequenzanalysen	Vector NTI 10 Advance (Invitrogen, USA)
Sequenzvergleiche	Vector NTI 10 Advance (Invitrogen, USA)
Analyse und Darstellung von Kristallstrukturen	Vector NTI 10 Advance (Invitrogen, USA) Cn3D Version 4.1 (National Center for Biotechnology Information) Viewer Lite 4.2 (Accelrys Inc.)
Textverarbeitung	Microsoft Office (Microsoft Inc., USA) Open Office (Sun Microsystems Inc.) CutePDF (Acro Software, Inc.)
Datenverarbeitung	Excel (Microsoft Inc., USA)
Bildbearbeitung	Irfan View (Irfan Kilian, Graduate of Vienna University of Technology) AxioVision (Zeiss, Oberkochen)

Densitometrie

LSM Image Browser (Zeiss,
Oberkochen)
EASY Win 32 (Herolab, Wiesloch)

3. Ergebnisse

3.1 Erzeugung und Charakterisierung stabil mit HSV-1 gB transfizierter Zelllinien

Zur Herstellung von HSV-1 gB transfizierten MJ-Zellen (Mel JuSo) wurden diese mit einem DNS-Vektor transfiziert, der für das HSV-1 gB sowie für ein Neomycinresistenzgen kodiert. Die Selektion transfizierter Zellen erfolgte mit 0,5 mg/ml des Neomycinderivates G418. Auf der Zellkulturschale gewachsene Klone wurden nach ca. zwei Wochen entnommen und durch Durchflusszytometrie und Western Blot-Analyse auf die Expression von gB hin untersucht (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu der Ausgangszelllinie MJ konnte gB in den MJ-gB-Linien durch Western Blot-Analyse mit dem gB spezifischen mAk 10B7 nachgewiesen werden (Abb. 3.1 A, vgl. Spuren 1, 2 und 3). Die Bandenstärken des Aktins sind in den Spuren 2 und 3 vergleichbar. Dies zeigt, dass ähnliche Lysatmengen der MJ-gB-Zellen aufgetrennt wurden. Die Abbildung 3.1 A lässt weiterhin erkennen, dass sich die MJ-gB-Zelllinien bezüglich der gB-Menge unterscheiden. Densitometrische Analysen des Western-Blots ergaben einen Unterschied um den Faktor 1,5 (Daten nicht gezeigt). Die Zelllinie mit der größeren Menge an gB wurde mit MJ-gB^{hi} und die Linie mit der geringeren Expression als MJ-gB^{lo} bezeichnet. Die Oberflächenexpression von gB wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft (Abb. 3.1 B). Zwei unabhängige durchflusszytometrische Analysen ergaben, dass MJ-gB^{hi}-Zellen eine um den Faktor 1,7 größere Menge gB auf der Zelloberfläche besitzen als MJ-gB^{lo}-Zellen. Da sich die Zelloberflächenexpression und die gB-Gesamtmenge bei MJ-gB^{hi}- und MJ-gB^{lo}-Zellen um einen ähnlichen Faktor unterscheidet, liegt es nahe, dass die stärkere Oberflächenexpression der MJ-gB^{hi}-Zellen auf einer größeren gB-Gesamtmenge beruht.

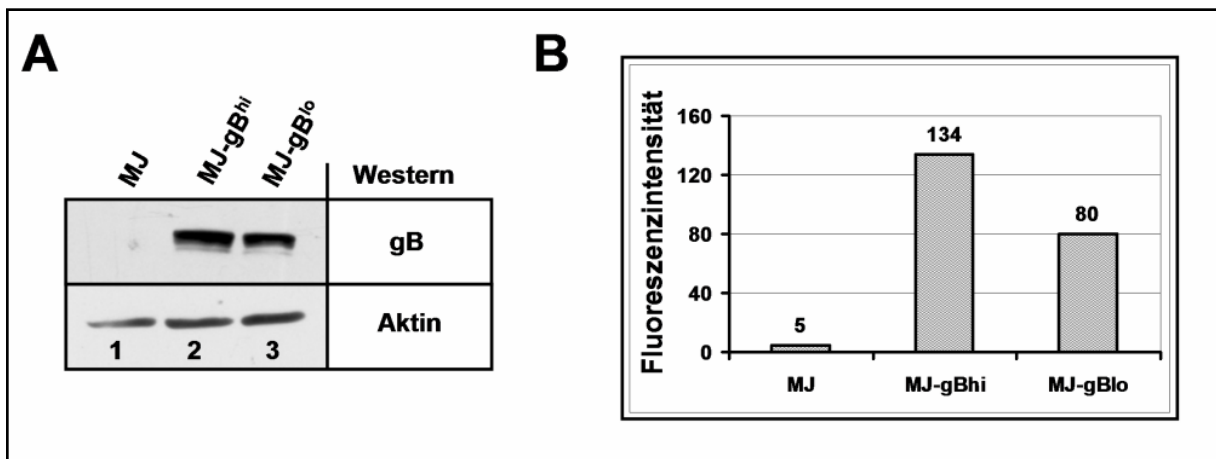


Abb. 3.1: Etablierung von stabil mit HSV-1 gB transfizierten MJ-Zelllinien

A) Western Blot-Analyse der Zelllysate von MJ und MJ-gB^{hi/lo}-Zellen: Die Zellen wurden in 0,5 % NP-40 lysiert, in einer SDS-PAGE separiert und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis von gB und Aktin erfolgte mit den spezifischen mAks 10B7 und AC-40. **B) Analyse der Oberflächenexpression von gB mittels Durchflusszytometrie:** Die MJ- und MJ-gB^{hi/lo}-Zellen wurden mit dem mAk 2c2 (spez. für gB) bzw. dem Kontrollantikörper MAR18.5 (Isotypenkontrolle). Tote Zellen wurden durch 7-AAD angefärbt und von der Analyse ausgeschlossen. Im Histogramm ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI, geometrischer Mittelwert) dargestellt.

3.2 Interaktion von gB mit MHCII-Molekülen in MJ-gB Zellen

Das Vorkommen von gB und MHCII-Molekülen in enger räumlicher Nähe kann auf eine Interaktion der Moleküle hindeuten. Aus diesem Grund wurde die intrazelluläre Verteilung von gB und MHCII-Molekülen in MJ-gB-Zellen untersucht. MJ-gB-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, nach 24 h fixiert und permeabilisiert. Zur Detektion des gB und der MHCII-Moleküle wurden die Zellen mit einem Phycoerythrin gekoppelten MHCII-spezifischen Antikörper sowie einem gB-spezifischen Antikörper behandelt. Zur Visualisierung des gB erfolgte anschließend eine Inkubation mit einem Alexa-488 gekoppelten Sekundärantikörper. Die Abbildung 3.2 A zeigt die Aufnahmen von gB (grün), MHCII (rot) und eine Überlagerung beider Bilder (merge). Gelbe Pixel in dem Überlagerungsbild entsprechen Kolokalisationen von gB und MHCII-Molekülen. Sowohl gB als auch MHCII-Moleküle zeigen eine ähnliche intrazelluläre, vesikuläre Verteilung. Ein Schwerpunkt der MHCII-Moleküle und gB findet sich im perinukleären Bereich. Dort sind u.a. spät-endosomale Kompartimente bzw. MHC Klasse II-Beladungskompartimente (MIICs) lokalisiert (Wubbolts R., *et al.*, 1999). Einige Überlagerungen der Färbungen von MHCII-Molekülen und gB sind in größeren Vesikeln vorhanden, die vereinzelt auch in der Peripherie der Zelle vorkommen. Diese Immunfluoreszenzanalyse zeigt, dass gB und MHCII-Moleküle in hohem Maße kolokalisieren.

Als Nächstes wurde untersucht, ob eine physikalische Interaktion von gB mit MHCII-Molekülen nachgewiesen werden kann. Dazu wurden MJ- und MJ-gB-Zellen lysiert, Immunpräzipitationen mit dem gB-spezifischen mAk 2c2 durchgeführt und die Präzipitate in einer SDS-PAGE aufgetrennt. In der Western Blot-Analyse wurde untersucht, ob über die Präzipitation von gB MHCII-Moleküle koisoliert werden können. Wie die Abbildung 3.2 B zeigt, ist bei MJ-gB-Zellen eine Bande auf Höhe der DR α -Kette zu erkennen. Eine Wiederholung des Versuches unter Verwendung eines MHCII β -Ketten spezifischen mAKs (LG-II) für die Western Blot-Analyse ergab eine Bande auf der Höhe der DR β -Kette (Daten nicht gezeigt). Diese Versuche belegen, dass gB mit MHCII α - und β -Ketten interagiert. Um zu testen, ob gB mit MHCII-Heterodimeren assoziiert, wurden Immunpräzipitationen (IPs) unter Verwendung eines konformationsabhängigen MHCII-Antikörpers (mAk ISCR3) durchgeführt. Die Western Blot-Analyse zeigt, dass im Ansatz der MJ-gB-Zellen Banden für gB nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.2 C, Spur 2). Bei MJ-Zellen konnte erwartungsgemäß kein gB-Signal detektiert werden, was die Spezifität der Präzipitation belegt. In Abb. 3.2 C ist zudem zu erkennen, dass zusätzlich zur 120 kDa Bande des gB zwei weitere gB-spezifische Banden bei ca. 50 kDa bzw. 60 kDa vorhanden sind. Dabei kann es sich um prozessierte Formen des gB handeln (Pereira L. *et al.*, 1981). Diese Daten belegen, dass in MJ-gB-Zellen gB mit funktionellen MHCII-Heterodimeren interagiert.

Neumann *et al.* (2003) hatten vermutet, dass eine Reduktion der Ii-Expression, wie sie in HSV-1 infizierten Zellen auftritt, die Bindung von gB an MHCII-Moleküle ermöglicht. Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob die Ii-Expression in MJ-gB-Zellen verändert ist. Dazu wurde die Ii-Menge in MJ-Zellen und MJ-gB^{hi/lo}-Zellen mittels Western Blot-Analyse untersucht. Wie anhand der Abbildung 3.2 D zu erkennen ist, ist die Ii-Menge der MJ- und der MJ-gB^{hi/lo}-Zellen identisch. Die Bestimmung der Aktinmenge belegt, dass vergleichbare Zelllysatzmengen eingesetzt wurden. Dieser Versuch zeigt, dass die gB-Expression keine Auswirkung auf die Ii-Menge hat. Demnach ist eine Reduktion der Ii-Menge für eine gB-MHCII-Interaktion in MJ-gB-Zellen nicht zwingend notwendig.

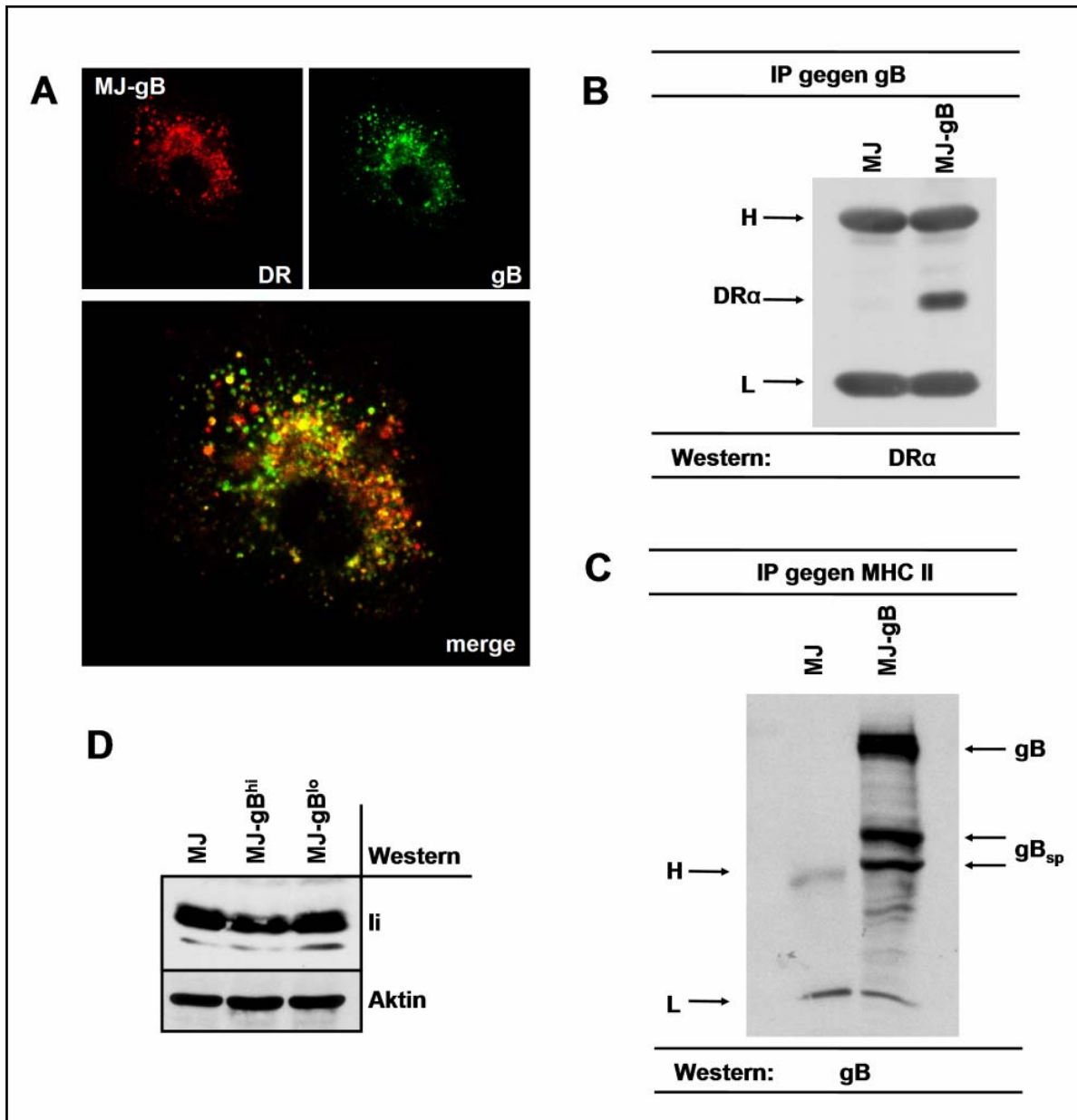


Abb. 3.2.: Kolokalisation und Interaktion von gB mit MHCII-Molekülen in MJ-gB-Zellen

A) Kolokalisation von gB mit MHCII in MJ-gB-Zellen: MJ-gB-Zellen wurden auf Deckgläser ausplattiert und nach Fixierung und Permeabilisierung mit einem Phycoerythrin-gekoppelten Antikörper gegen MHCII-Moleküle behandelt. Anschließend wurde gB (mAk 2c2) angefärbt. Zur Visualisierung des gB wurden die Zellen mit einem Alexa-488-gekoppelten Sekundärantikörperkonjugat behandelt. Die Analysen wurden am konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM 510 Meta; Zeiss, Oberkochen) bei einer optischen Schichtdicke von 1 μm durchgeführt. Die Überlagerung der Kanäle für gB und MHCII-Moleküle ist unterhalb der Einzelkanäle dargestellt (merge). **B und C) Bindung von gB an MHCII-Moleküle in stabil mit HSV-1 gB transfizierten MJ-gB-Zellen:** MJ und MJ-gB-Zellen wurden mit 0,5 % NP-40 lysiert und das Lysat von je 10^7 MJ- bzw. MJ-gB-Zellen für Immunpräzipitationen mit dem mAk 2c2 (B) gegen gB, bzw. ISCR3 (C) gegen MHCII-Moleküle eingesetzt. Die Präzipitate wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Für die Western Blot-Analyse wurden der mAk TAL-1B5 (spez. für DR α) und der mAk 10B7 (spez. für gB) verwendet. **D) Western Blot-Analyse zur Bestimmung der li-Expression in MJ- und MJ-gB-Zellen:** Das Zelllysat von 5×10^5 MJ- und MJ-gB-Zellen wurde in einer 12 %igen SDS-PAGE separiert. Nach Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran wurden li und Aktin mit den mAks Bu43 (spez. für li) und AC-40 (spez. für Aktin) nachgewiesen. Die Pfeile in den Abbildungen zeigen die Positionen der leichten und schweren Immunglobulinketten (L, H) bzw. der Positionen von gB bzw. gB-Prozessierungsformen (gB_{sp}) und DR α an.

3.3 Einfluss von Ii auf die N-Glykosylierung gB-assoziierter MHCII-Moleküle

Die vorherigen Experimente haben gezeigt, dass gB in MJ-gB-Zellen mit MHCII-Molekülen interagiert. Nun sollte geklärt werden, ob die mit gB-assozierten MHCII-Moleküle über den Golgi-Apparat transportiert werden oder im ER verbleiben. Die N-Glykane der MHCII-Moleküle werden während des intrazellulären Transportes im Golgi-Apparat modifiziert und dadurch resistent gegenüber einer Behandlung mit dem Enzym Endoglykosidase H (EndoH). Eine Behandlung mit dem Enzym EndoH wird verwendet um zu untersuchen, ob ein Protein das ER verlassen hat. Parallel zu der Inkubation mit EndoH, wird oft eine Behandlung mit dem Enzym N-Glykosidase F (PNGaseF) durchgeführt. PNGaseF entfernt im Gegensatz zu EndoH alle N-Glykane und erzeugt auf diese Weise komplett N-deglykosylierte Moleküle. Durch Vergleich der nicht-behandelten und der EndoH- bzw. PNGaseF-behandelten Proben lässt sich feststellen, ob ein Protein EndoH-resistente N-Glykane besitzt. Im Folgenden wurde untersucht, ob die mit gB-assozierten MHCII-Moleküle in MJ-gB-Zellen EndoH-resistente Kohlenhydratmodifikationen besitzen. Dazu wurden MJ-gB-Zellen mit 0,5 % NP-40 lysiert und das Lysat von ca. 1×10^7 Zellen für Immunpräzipitationen mit dem gB spezifischen mAk 2c2 eingesetzt. Die Immunpräzipitate wurden mit EndoH bzw. mit N-Glykosidase F behandelt oder zur Kontrolle mit ST-Puffer versetzt. In der Western Blot-Analyse der Präzipitationen wurde die DR α -Kette nachgewiesen. Die Abbildung 3.3 A zeigt in der ersten Spur die mit ST-Puffer versetzte Probe, in der zweiten Spur die EndoH- und in der dritten Spur die PNGaseF-behandelten Immunpräzipitate. Die unbehandelte Probe in Spur 1 zeigt eine Bande mit einem Molekulargewicht (MW) von etwa 35 kDa, was dem MW der DR α -Kette entspricht. Das Molekulargewicht der DR α -Kette nach EndoH-Behandlung (Spur 2) liegt zwischen dem unbehandelten Ansatz und der Probe nach PNGaseF-Behandlung. Dies ist dadurch zu erklären, dass die DR α -Kette zwei N-Glykane besitzt, von denen nur eine im Golgi-Apparat zum komplexen Typ modifiziert wird und dadurch partielle EndoH-Resistenz erlangt (Shackelford D. A. und Strominger J. L., 1983). Die Behandlung mit PNGaseF führt dazu, dass beide N-Glykane entfernt werden. Im Falle der Probe, die mit ST-Puffer versetzt wurde, bleiben beide N-Glykoside der DR α -Kette erhalten. Das MW der DR α -Kette liegt daher in diesem Fall oberhalb der EndoH und PNGaseF-behandelten Ketten. Die partielle EndoH-Resistenz der DR α -Kette zeigt, dass die N-Glykane dieser DR α -Kette im Golgi-Apparat modifiziert wurden. Die mit gB-assozierten MHCII-Moleküle in MJ-gB-Zellen sind folglich im Golgi-Apparat zum komplexen Typ modifiziert worden.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie die gB-assozierten MHCII-Moleküle EndoH-resistente N-Glykoside erhalten. Entweder werden gB und MHCII-Moleküle unabhängig voneinander aus dem ER transportiert und assoziieren in einem dem Golgi-Apparat nachfolgenden Kompartiment. Oder die gB-MHCII-Komplexe bilden sich innerhalb des ER und gelangen gemeinsam in den Golgi-Apparat. Um zu untersuchen, ob im ER gebildete gB-MHCII-Komplexe das ER verlassen können, wurden COS-7-Zellen mit gB, DR α und DR β transfiziert. Die Abwesenheit von Ii sollte sicherstellen, dass gB innerhalb des ER ungehindert an MHCII-Moleküle binden kann ohne von Ii verdrängt zu werden (Neumann J. *et al.*, 2003). Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet, lysiert und mit dem mAk 2c2 gegen gB präzipitiert. Die Präzipitate wurden mit EndoH bzw. PNGaseF behandelt bzw. zur Kontrolle mit ST-Puffer versetzt. Die Abbildung 3.3 B zeigt die Western Blot-Analyse der Immunpräzipitationen sowie die Expressionskontrolle der transfizierten Moleküle (Abb. 3.3 B). Die erste Spur zeigt die mit ST-Puffer versetzten Proben, die zweite Spur die mit EndoH behandelten und die dritte Spur die PNGaseF behandelten Proben. Das MW der DR α -Kette im unbehandelten Ansatz liegt bei 35 kDa und ist höher als das der DR α -Ketten nach EndoH-

bzw. PNGaseF-Behandlung (Abb. 3.3 B). Das MW der DR α -Bande nach EndoH- und PNGaseF-Behandlung ist identisch (vgl. die zweite und dritte Spur in Abb. 3.3 B). Dies bedeutet, dass die gB-assozierte DR α -Kette durch das Enzym EndoH komplett deglykosyliert wurde. Die Übereinstimmung des MWs der DR α -Ketten nach EndoH- und PNGaseF-Behandlungen belegt, dass die N-Glykane der gB-assozierten DR α -Kette im Golgi-Apparat nicht zum komplexen Typ modifiziert wurden. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass die gB-gebundenen MHCII-Moleküle nicht das ER verlassen haben. In Abwesenheit von Ii verbleiben gB-MHCII-Komplexe vermutlich innerhalb des ER.

Eine Hypothese, die sich aus den vorherigen Versuchen ergeben hat war, dass die gB-MHCII-Interaktion in Ii-exprimierenden Zellen (z.B. bei den MJ-gB-Zellen) erst auftritt nachdem die MHCII-Moleküle den Golgi-Apparat verlassen haben. Um diese Hypothese zu testen wurde ein Puls-Markierungsversuch durchgeführt. Die MJ-gB-Zellen wurden für 30 min mit ³⁵S-Methionin markiert und anschließend bei 37 °C für 0, 2, 8 und 24 h weiterkultiviert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen abzentrifugiert und mit 0,5 % NP-40 lysiert. Anschließend wurden Immunpräzipitationen mit dem gB-spezifischen mAk 2c2 bzw. dem MHCII-spezifischen mAk I251SB durchgeführt. Die Präzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine mittels Fluorographie visualisiert. In der Abbildung 3.3 C sind in dem oberen Teil die IPs mit dem MHCII-spezifischen Antikörper, im unteren Teil die IPs mit dem gB-spezifischen Antikörper dargestellt. Für die Abbildung wurden die Bereiche ausgewählt, in denen die MHCII-Moleküle zu erkennen sind. Nach Präzipitation von MHCII-Molekülen ist zum „Chase“-Zeitpunkt 0 h eine starke Bande vorhanden, welche der invarianten Kette entspricht. Ii enthält mehrere Methioninreste und erzeugt daher ein starkes radioaktives Signal. Nach einer Stunde verändert sich das Ii-Signal, da MHCII-Ii-Komplexe aus dem ER transportiert werden und sich die Glykosylierung von Ii verändert. Die DR α - und DR β -Banden erscheinen erstmals nach 4 h deutlich. Dies ergibt sich dadurch, dass die MHCII-Ii-Komplexe in die endosomalen Kompartimente gelangen, in denen Ii proteolytisch degradiert wird. Daher nimmt das Ii-Signal ab und die Banden für DR α (ca. 35kDa, obere Bande) und DR β (ca. 30 kDa, untere Bande) werden deutlicher. Vom 8 h- zum 24 h-Wert bleibt die Intensität der Banden für die koisolierten DR α - und DR β -Ketten konstant. Bei den Immunpräzipitationen von gB finden sich erst nach etwa vier Stunden leichte Banden für DR α und DR β , die von dem 8 h- bis zum 24 h-Wert intensiver werden. Eine Bande für Ii ist bei den gB-Präzipitationen zwischen den Banden für DR α und DR β nicht zu erkennen. Dieser Versuch lässt den Schluss zu, dass in MJ-gB-Zellen gB nicht innerhalb des ER an MHCII-Moleküle bindet, sondern erst nachdem Ii proteolytisch degradiert wurde. Aufgrund der relativ schwachen radioaktiven Signale der mit gB-koisolierten MHCII-Moleküle ist anzunehmen, dass gB innerhalb von 24 h nur mit einem kleinen Anteil der neugebildeten MHCII-Moleküle interagiert.

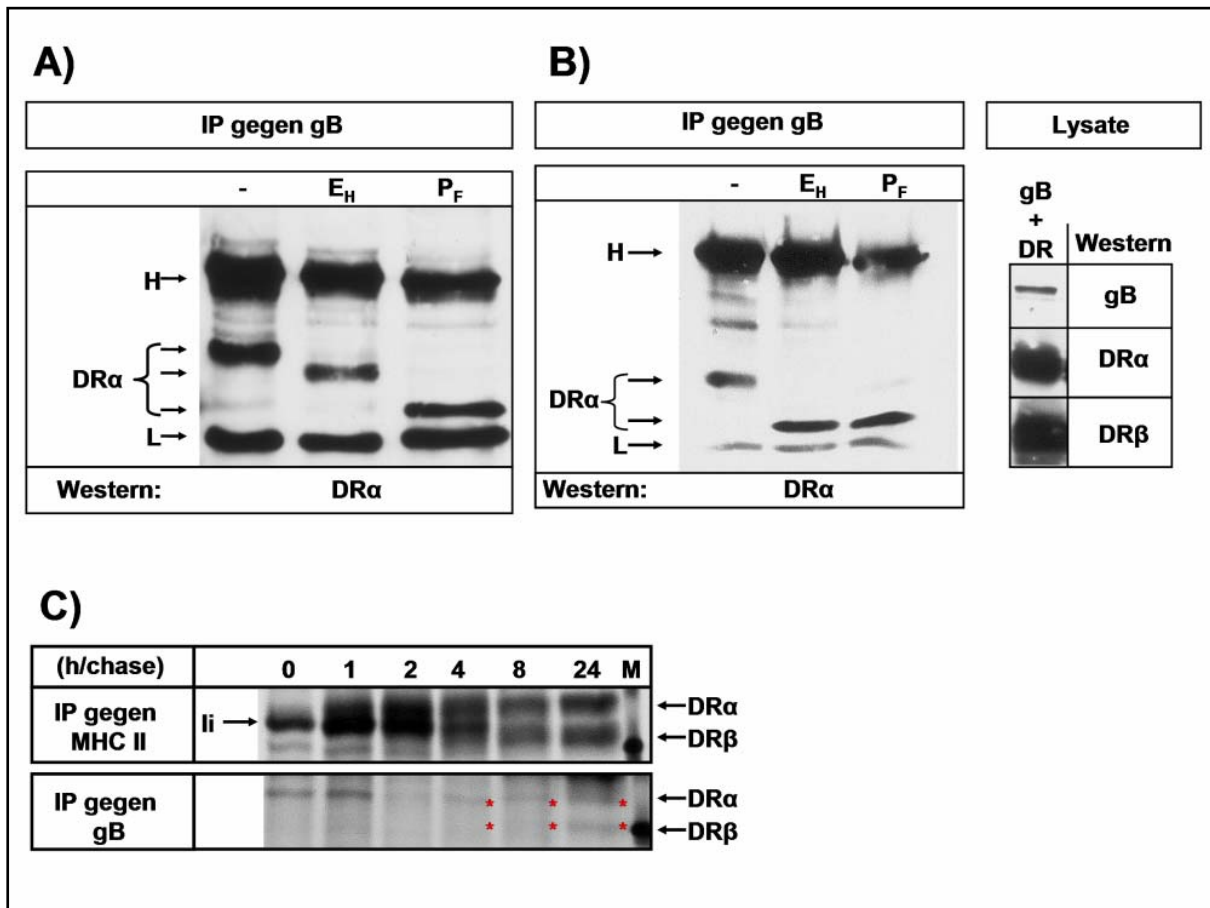


Abb.3.3: Einfluss von li auf die N-Glykosylierung gB-assoziierter MHCII-Moleküle und auf den Zeitpunkt des Zusammenbaus des gB-MHCII-Komplexes:

A) In MJ-gB-Zellen sind mit gB-assozierte Klasse II-Moleküle EndoH-resistent: MJ- und MJ-gB-Zellen wurden lysiert und Immunpräzipitationen gegen gB durchgeführt (mAk 2c2). Anschließend erfolgte die Behandlung der Präzipitate mit Endoglykosidase H (EndoH) oder N-Glykosidase F (PNGaseF). Zur Kontrolle wurden die Präzipitate nur mit ST-Puffer versetzt. Nach Auftrennung der Komplexe in einer SDS-PAGE erfolgte der elektrophoretische Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Für die anschließende Western Blot-Analyse wurde der mAk TAL-1B5 verwendet, welcher die HLA-DRα-Kette spezifisch erkennt. **B) Mit gB-assozierte MHCII-Moleküle in transient transfizierten COS-7-Zellen sind EndoH-sensitiv:** COS-7-Zellen wurden mit gB, DRα und DRβ transfiziert. Nach der Ernte und Lyse der Zellen wurden Immunpräzipitationen und anschließend Behandlungen mit EndoH und PNGaseF durchgeführt. Die Proben wurden in der Western Blot-Analyse untersucht. Der Nachweis der transfizierten Proteine erfolgte im Western Blot mit einem DRα-spezifischen Antikörper (mAk TAL-1B5), dem mAk LG-II (spez. für DRβ) und einem mAk gegen gB (mAk 10B7). Die Pfeile markieren die schweren und leichten Immunglobulinketten (H, L) sowie unterschiedlich glykosylierte Formen der DRα-Kette. **C) gB-MHCII-Komplexe in MJ-gB-Zellen sind erst nach 4-8h im Puls-Markierungsversuch nachzuweisen:** MJ-gB-Zellen wurden mit ³⁵S-Methionin für ca. 30 min biosynthetisch markiert und anschließend für 0, 1, 2, 4, 8 und 24 h kultiviert. Die Zellen der jeweiligen Markierungszeitpunkte wurden gesammelt, lysiert und Immunpräzipitationen von gB (mAk 2c2) und MHCII (mAk I251SB) durchgeführt. Die Präzipitate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend je 30 min in DMSO, PPO und H₂O inkubiert. Anschließend wurden die Filme getrocknet, Röntgenfilme aufgelegt und bei -80°C bis zur Entwicklung gelagert. Die Pfeile markieren die Positionen der DRα/β-Ketten, li und gB. Die roten Sternchen markieren die mit gB koisolierten Banden für DRα und DRβ.

3.4 Konkurrenz von gB und li um die Bindung an MHCII-Moleküle

HSV-1 gB und MHCII-Moleküle binden in MJ-gB-Zellen nicht innerhalb des ER, sondern erst nach Degradation von li in endosomalen Kompartimenten. Dies deutet darauf hin, dass gB und li nicht gleichzeitig mit MHCII-Molekülen interagieren können. Um zu untersuchen, ob in MJ-gB-Zellen der gB-MHCII-Komplex li enthält, wurden Immunpräzipitationen gegen gB durchgeführt und überprüft, ob li koisoliert werden kann (Abb. 3.4 A). Die Expression von li sowie die Position der li-Bande wird anhand der Lysatproben von MJ- bzw. MJ-gB-Zellen gezeigt (Abb. 3.4 A, Spuren 3 und 4). Im Falle der Immunpräzipitationen ist keine der li entsprechenden Bande bei ca. 33 kDa zu erkennen (Abb. 3.4 A, Spuren 1 und 2). Um die Präzipitation von gB zu überprüfen, wurden die Spuren 1 und 2 mit einem gB-spezifischen Antikörper nachdetektiert (Abb. 3.4, Spuren 5 und 6). Im Ansatz der IPs aus MJ-gB-Zellen (Abb. 3.4, Spur 6) konnte gB nachgewiesen werden. Dieses Experiment zeigt, dass li in MJ-gB-Zellen weder direkt mit gB noch mit gB-assoziierten MHCII-Molekülen interagiert. In MJ-gB-Zellen findet man folglich nur MHCII-Komplexe, die entweder mit li oder mit gB assoziiert sind.

li bindet innerhalb des ER zu einem sehr frühen Zeitpunkt des Zusammenbaus der MHCII-Moleküle an einzelne DR α -Ketten aber nicht an DR β -Ketten (Neumann J. und Koch N., 2005; Koch N. *et al.*, 2007). Um zu überprüfen, ob gB und li zu diesem Zeitpunkt um die Bindung an MHCII-Ketten konkurrieren, wurde untersucht, ob die Expression von li die Bindung von gB an MHCII-Einzelketten beeinflusst. Dazu wurde zunächst getestet, ob gB an einzelne DR α - oder DR β -Ketten binden kann. Zu diesem Zweck wurden Zellen mit Kombinationen von gB, DR α - und DR β -Einzelketten transfiziert und untersucht inwieweit gB-DR α /DR β Interaktionen nachzuweisen sind. COS-7-Zellen wurden mit gB und DR α bzw. gB und DR β transfiziert, die Zellen 48 h nach der Transfektion geerntet, mit 0,5 % NP-40 lysiert und Immunpräzipitationen gegen gB durchgeführt. In der Western Blot-Analyse der Präzipitate wurde eine Koisolierung von gB und DR α bzw. DR β untersucht (Abb. 3.4 B und 3.4 C) Die Western Blot-Analyse der Lysate zeigt, dass gB, DR α und DR β exprimiert wurden (zweite und dritte Spur der Abb. 3.4 B und C). Die Immunpräzipitationen befinden sich jeweils in der ersten Spur der Abbildungen 3.4 B und 3.4 C. In diesen Spuren sind Signale sowohl auf der Höhe der DR α -Kette (Abb. 3.4 B) als auch der DR β -Kette (Abb. 3.4 C) zu erkennen. Dieses Experiment zeigt, dass gB sowohl an einzelne DR α -, als auch einzelne DR β -Ketten binden kann.

Um zu untersuchen, ob li einen Einfluss auf die Bindung von gB an die DR-Einzelketten hat wurden gB und DR α bzw. DR β mit und ohne li in COS-7-Zellen transfiziert. Nach Immunpräzipitationen von gB wurde in der Western Blot-Analyse bestimmt, inwieweit gB mit den DR-Ketten koisoliert werden kann. Die Abbildungen 3.4 D und 3.4 E zeigen die Western Blot-Analysen der Immunpräzipitationen (jeweils Spuren 1 und 2) sowie der Lysate (jeweils Spuren 3-7). Die Abbildung 3.4. D und 3.4. E zeigt anhand der Lysate der transfizierten Zellen die Expression von DR α (Abb. 3.4 D, Spuren 3 und 4), DR β (Abb. 3.4 E, Spuren 3 und 4), gB (Abb. 3.4 D und E, Spuren 5 und 6) und li (Abb. 3.4 D und E, Spur 7). Nach Kotransfektion von gB und DR α und der Immunpräzipitation von gB ist eine Bande auf Höhe der DR α -Kette zu erkennen (Abb. 3.4 D, Spur 1). Diese Bande ist bei zusätzlicher Expression von li nicht mehr vorhanden (Abb. 3.4 D, Spur 2). Im Gegensatz dazu ist nach Kotransfektion von DR β und gB sowohl in Abwesenheit von li (Abb. 3.4 E, Spur 1), als auch bei zusätzlicher Expression von li (Abb. 3.4 E, Spur 2) eine Bande auf Höhe der DR β -Kette nachzuweisen. Diese Ergebnisse zeigen, dass in Anwesenheit von li gB nicht an DR α , aber an

DR β binden kann. Da li die Bindung an DR α verhindert, ist anzunehmen, dass die große Menge li innerhalb des ER von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen die Bindung von gB an MHCII-Moleküle verhindert.

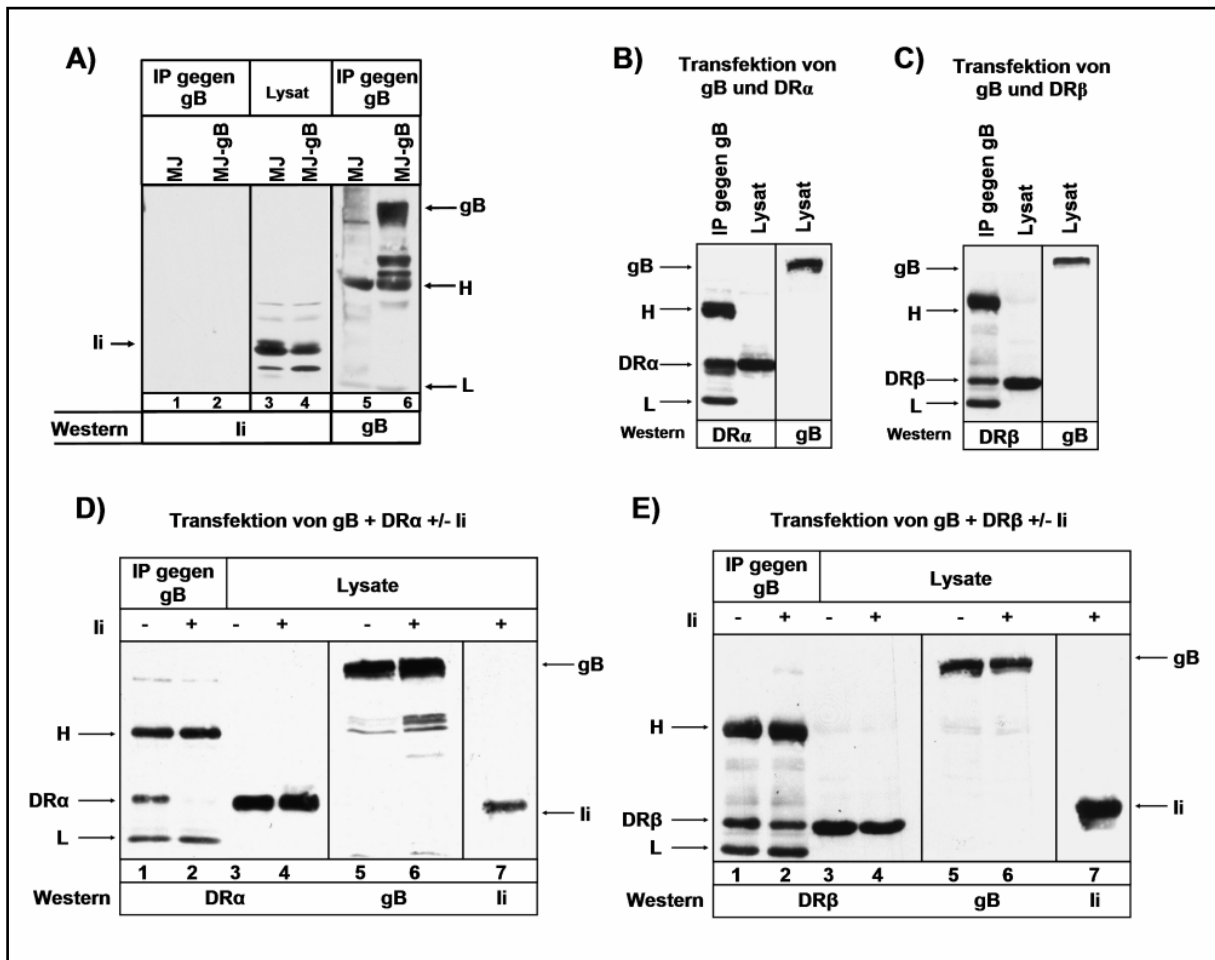


Abb.3.4: Konkurrenz von gB und li um die Bindung an MHCII-Moleküle

A) Der gB-MHCII-Komplex in MJ-gB-Zellen enthält keine Invariante Kette: MJ- und MJ-gB-Zellen wurden lysiert und mit dem Lysat aus 10^7 Zellen wurden Immunpräzipitationen mit dem mAk 2c2 gegen gB durchgeführt. Nach Separation der Immunkomplexe in der SDS-PAGE und dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden für den Antikörpernachweis in der Western Blot-Analyse der mAk Bu43 (spez. für li) und der mAk 10B7 (spez. für gB) verwendet. Die Präzipitationen befinden sich in den Spuren 1 und 2 bzw. 5 und 6. Die Zelllysate sind in den Spuren 3 und 4 zu sehen. Um zu demonstrieren, dass die gB-Präzipitation erfolgreich war, wurden die Spuren 1 und 2 mit dem 10B7-Antikörper (spez. für gB) nachdetektiert (Spuren 5 und 6). **B+C) Koisolierung von HSV-1 gB mit HLA-DR α - und HLA-DR β -Einzelketten:** COS-7-Zellen wurden mit gB, DR α (Abb. 3.4 B) oder DR β (Abb. 3.4 C) kotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und lysiert. Mit dem Zelllysate wurden Immunpräzipitationen gegen gB durchgeführt. In der Western Blot-Analyse wurden mAKs TAL-1B5 (spez. für DR α ; Spuren B: 1-2), LG-II (spez. für DR β ; Spuren C: 1-2) und 10B7 (spez. für gB; Spuren 3, B+C) eingesetzt. **D+E) Koisolierung von HSV-1 gB mit DR-Einzelketten DR α , DR β in An-/Abwesenheit von li:** COS-7-Zellen wurden mit gB, DR α oder DR β +/- li transfiziert. Nach Lyse der Zellen folgten Immunpräzipitationen mit dem gB-spezifischen mAk 2c2 und die Western Blot-Analysen der Immunpräzipitationen (s.o.). Es wurden die mAKs TAL-1B5 (Spuren D: 1-4), LG-II (Spuren E: 1-4), Bu43 (Spuren D+E: 7) und 10B7 (Spuren D+E: 5-6) eingesetzt. Die Pfeile markieren die Positionen der schweren und leichten Immunglobulinketten (H, L) sowie die von DR α , DR β , gB und li.

3.5 HSV-1 gB ist kein Chaperon für MHC Klasse II-Moleküle

Die N-Glykane der MHCII-Moleküle im gB-MHCII-Komplex sind in Abwesenheit von Ii EndoH-sensitiv (s. Abb 3.3 B). Dies deutet darauf hin, dass gB keine Chaperonfunktion für MHC Klasse II-Moleküle übernimmt. Um dies zu überprüfen, wurde die Reifung der N-Glykane von MHCII-Molekülen in Anwesenheit von Ii und gB untersucht. COS-7-Zellen wurden zu diesem Zweck mit DR α und DR β (Abb. 3.5 A, Spuren 1 bis 3), gB und DR $\alpha\beta$ (Abb. 3.5 A, Spuren 3 bis 6) und zur Kontrolle mit Ii und DR $\alpha\beta$ (Abb. 3.5 Spuren 7 bis 9) transfiziert. Die Lysate der Zellen wurden mit EndoH (Abb. 3.5, Spuren 2, 5, 8) und PNGaseF (Abb. 3.5 A, Spuren 3, 6, 9) behandelt oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen (Abb. 3.5 A, Spuren 1, 4, 7). Die Abbildung 3.5 A zeigt im linken Teil die Western Blot-Analyse der EndoH und PNGaseF behandelten Proben und im rechten Teil die Expressionen von DR α , DR β , Ii und gB im Zelllysate. Im Falle der PNGaseF behandelten Proben (Abb. 3.5 A, Spuren 3, 6, 9) ist in jedem der drei Ansätze jeweils nur eine Bande vorhanden. Diese entspricht der vollständig N-deglykosylierten DR α -Kette. In den Ansätzen der EndoH-behandelten Proben sind nach Transfektion von DR $\alpha\beta$ (Abb. 3.5 A, Spuren 1-3) und von gB mit DR $\alpha\beta$ (Abb. 3.5 A, Spuren 4-6) drei Banden zu erkennen. Die Bande mit dem niedrigsten Molekulargewicht entspricht der vollständig deglykosylierten EndoH-sensitiven Form. Die darüber liegende Bande stellt die partiell EndoH-resistente, reife Form der DR α -Kette dar. Die oberste Bande hat das gleiche MW wie die DR α -Kette im unbehandelten Ansatz. Das bedeutet, dass keine der beiden N-Glykane durch EndoH abgespalten wurde. Diese Form der DR α -Kette, bei der beide N-Glykane EndoH-resistent sind, beruht auf einer veränderten Konformation des MHCII-Moleküls (Schaiff W. T. *et al.*, 1991). Diese Variante tritt nach Koexpression von Ii nicht auf. Dies zeigt, dass Ii, nicht aber gB, die Bildung bzw. den Transport von HLA-DR Molekülen mit dieser veränderten Glykosylierung über den Golgi-Apparat unterbindet.

MHCII-Moleküle unterscheiden sich in der Abhängigkeit von der Chaperonfunktion der invarianten Kette (Bikoff E. K. *et al.*, 1995). Während der Großteil der HLA-DR1-Moleküle sich auch in Abwesenheit von Ii zu einem funktionellen Peptidrezeptor zusammenlagern kann, so ist z.B. die Faltung von HLA-DQ (Schaefer D., persönliche Mitteilung) oder eines gemischten MHCII-Moleküls bestehend aus HLA-DR α und HLA-DPB1*0401 strikt von Ii abhängig (Temme S. *et al.*, Manuskript in Bearbeitung). Um zu analysieren, ob die Expression von gB Auswirkungen auf die N-Glykosylierung des gemischten MHCII-Moleküls hat, wurden COS-7-Zellen mit DR α + DPB1*0401, gB + DR α + DPB1*0401 und Ii + DR α + DPB1*0401 transfiziert und die Kohlenhydratmodifikationen mittels EndoH und PNGaseF analysiert (Abb. 3.5 B). Die Spuren 1, 4 und 7 zeigen die unbehandelten Proben, Spuren 2, 5 und 8 mit EndoH behandelte Lysate und Spuren 3, 6 und 9 Proben, die mit PNGaseF versetzt wurden. Bei den EndoH-behandelten Proben der mit DR α /DPB1*0401 und der mit gB + DR α /DPB1*0401 transfizierten Zellen ist eine Bande für DR α zu erkennen deren MW mit dem der DR α -Kette nach PNGaseF-Behandlung identisch ist. Die DR α -Kette des DR α /DPB1*0401-Moleküls bleibt nach Kotransfektion von gB vollständig EndoH-sensitiv. Im Gegensatz dazu sind nach Transfektion von Ii + DR α /DPB1*0401 und EndoH-Behandlung drei Banden zu erkennen: Die unterste, vollständig deglykosylierte DR α -Bande, eine der partiell EndoH-resistenten DR α -Kette entsprechende mittlere Bande und eine Bande auf Höhe der unbehandelten DR α -Kette. Bei dieser handelt es sich um eine Form mit zwei EndoH-resistenten N-Glykanen (s.o.). Diese Experimente zeigen, dass gB, im Gegensatz zu Ii, keinen Einfluss auf die Reifung N-gebundener Kohlenhydrate bei HLA-DR und dem gemischten MHCII-Molekül aus DR α /DPB1*0401 hat.

Die Assoziation von gB mit MHCII-Molekülen führt demnach nicht dazu, dass die gB-assoziierten MHCII-Moleküle EndoH-resistente Kohlenhydrate erlangen. Daher wäre es möglich, dass gB MHCII-Moleküle innerhalb des ER zurückhält. Dies könnte sich in einem höheren Anteil EndoH-sensitiver DR α -Kette in Anwesenheit von gB äußern. In Abbildung 3.5 A ist zwischen den EndoH-behandelten Proben der mit DR $\alpha\beta$ und der gB + DR $\alpha\beta$ transfizierten Zellen kein Unterschied in der Menge komplett EndoH-sensitiver DR α -Kette zu erkennen (Abb. 3.5, vgl. Spur 2 und 5). Der vermutete Effekt könnte in li-exprimierenden Zellen deutlicher werden, da dort der Anteil EndoH-sensitiver MHCII-Moleküle geringer ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die N-gebundenen Kohlenhydrate von DR α in MJ-, MJ-gB^{hi}- und MJ-gB^{lo}-Zellen untersucht (s. Abb 3. 5 C). Die Spuren 1-3 zeigen die Proben der MJ-Zellen, die Spuren 4-9 die der MJ-gB^{hi}- und MJ-gB^{lo}-Zellen. In den Spuren 2, 5 und 8 befinden sich EndoH behandelte, in den Spuren 3, 6, und 9 PNGaseF behandelte Lysate. Die unbehandelten Proben wurden in den Spuren 1, 4 und 6 aufgetragen. Sowohl in MJ- als auch in MJ-gB^{hi/lo}-Zellen ist der Großteil der DR α -Ketten partiell EndoH-resistent (Abb. 3.5, Spuren 2, 5, 8). Dies bedeutet, dass die N-Glykane der meisten MHCII-Moleküle im Golgi-Apparat zum komplexen Typ modifiziert wurden. Lediglich ein sehr geringer Anteil der DR α -Ketten ist EndoH-sensitiv (Abb. 3.5, Spuren 3, 6, 9). Dieser Anteil unterscheidet sich zwischen MJ- und MJ-gB^{hi/lo}-Zellen nicht. In MJ-gB-Zellen führt die gB-Expression folglich nicht dazu, dass der Anteil an EndoH-sensitiven MHCII-Molekülen ansteigt, was darauf hindeutet, dass gB keine Klasse II-Moleküle im ER zurückhält.

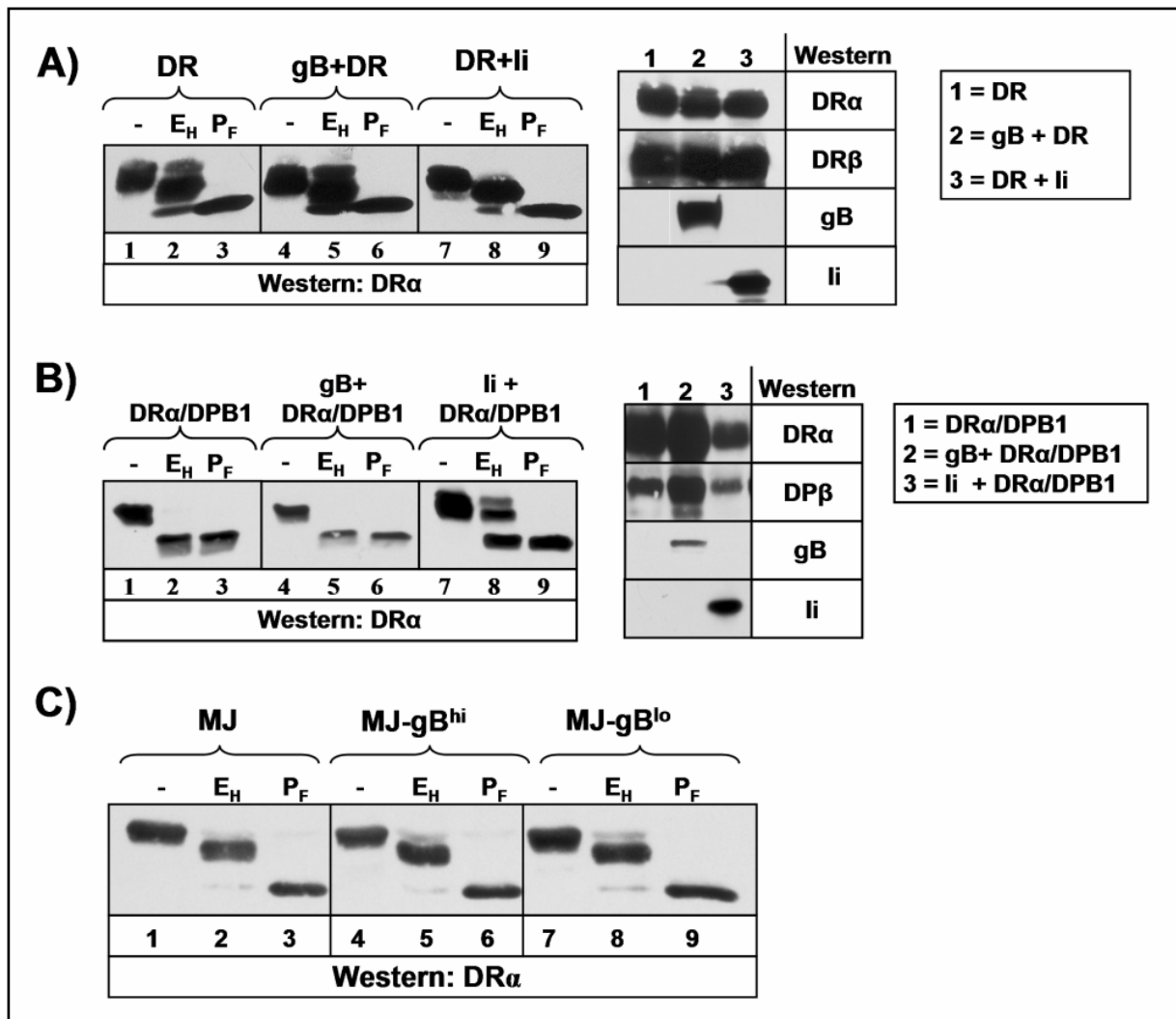


Abb. 3.5: HSV-1 gB-Expression hat keinen Einfluss auf die Reifung der N-Glykane von MHCII-Molekülen:

A+B) Transiente Transfektion von COS-7-Zellen: COS-7-Zellen wurden mit folgenden cDNS Kombinationen transient transfiziert: HLA-DRαβ, HLA-DRαβ + gB, HLA-DRαβ + li (Abb. 3.5 A), DRα + DPB1*0401, DRα + DPB1*0401 + gB, DRα + DPB1*0401 + li (Abb. 3.5 B). Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und mit 0,5 % NP-40 lysiert. Die Lysate wurden mit ST-Puffer versetzt (Spuren 1, 4, 7) oder mit EndoH (Spuren 2, 5, 8) bzw. PNGaseF (Spuren 3, 6, 9) behandelt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. In der Western Blot-Analyse der EndoH-/PNGaseF-Behandlungen wurde die DRα-Kette mit dem mAk TAL-1B5 nachgewiesen. Für die Western Blot-Analyse zur Überprüfung der Expression der transfizierten Moleküle im Zelllysate wurden folgende Antikörper eingesetzt: TAL-1B5 (spez. für DRα), LG-II (spez. für DRβ/DPβ), 10B7 (spez. für gB), Bu43 (spez. für li). **C) MJ- und MJ-gB-Zellen:** EndoH- und PNGaseF-Behandlungen der Lysate von MJ- und MJ-gB^{hi/lo}-Zellen. Die Behandlung der Lysate sowie die Western Blot-Analyse erfolgte wie bereits oben beschrieben.

3.6 gB bindet nicht an SDS-stabile MHCII-Moleküle

In MJ-gB-Zellen erfolgt die Interaktion von gB und von MHCII-Molekülen nicht innerhalb des ER, sondern in einem dem Golgi-Apparat nachfolgenden Kompartiment. Nach dem Verlassen des Golgi-Apparates gelangen die MHCII-Moleküle in die endosomalen Klasse II-Beladungskompartimente (MIICs). In diesen wird li proteolytisch abgebaut und die Klasse II-Moleküle mit Hilfe von HLA-DM beladen (s. Abschnitt 1.1.4; Stern J. L. *et al.*, 2006). Daher stellte sich die Frage, ob gB an peptidbeladene MHCII-Moleküle bindet. Zu diesem Zweck wurden Immunpräzipitationen unter Verwendung des monoklonale Antikörpers L243 durchgeführt. Der mAk L243 ist spezifisch für CLIP- und für peptidbeladene MHCII-Moleküle

(Röhn T. A. *et al.*, 2004). Die Abbildung 3.6 A zeigt die Western Blot-Analyse der Immunpräzipitationen aus MJ-Zellen (Abb. 3.6, Spur 1) und MJ-gB-Zellen (Abb. 3.6, Spur 2). Im Ansatz der MJ-gB Zellen konnten Banden für gB nachgewiesen werden (s. Pfeile). Im Falle der MJ-Zellen konnten keine gB-Signale detektiert werden, was die Spezifität der IPs belegt. Um zu demonstrieren, dass gleiche Mengen an MHCII-Molekülen isoliert wurden, wurde bei einem Teil jeder IP auch die DR α -Kette nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Werden MHCII-Moleküle mit hochaffinen Peptiden beladen, ändert sich deren Konformation und sie nehmen eine kompakte Form ein (Natarajan S. K. *et al.*, 1999; Springer T. A. *et al.*, 1977). Diese Konformation resultiert in einer höheren Stabilität gegenüber Denaturierung durch SDS. Daher lassen sich diese MHCII-Moleküle in der SDS-PAGE als Bande bei 50-60 kDa nachweisen, sofern die Proben nicht bei 95°C aufgeköcht werden. Um zu testen, ob die gB-assozierten MHCII-Moleküle eine kompakte Konformation besitzen, wurden IPs gegen gB durchgeführt. Eine Hälfte der IP wurde bei 95°C aufgeköcht (Abb. 3.6 B, Spur 4), die andere Hälfte für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert um die SDS-stabilen MHCII-Moleküle zu erhalten (Abb. 3.6 B, Spur 3). Zur Kontrolle wurden die Immunpräzipitationen auch mit dem Lysat von MJ-Zellen durchgeführt (Abb. 3.6 B, Spuren 5 und 6). Um die Position der SDS-stabilen Dimere darzustellen wurden Lysatproben von MJ-Zellen bei 37°C inkubiert (Abb. 3.6 B, Spur 1) oder bei 95°C aufgeköcht (Abb. 3.6 B, Spur 2). Die Spuren 1 und 2 zeigen die MJ-Lysate. In Spur 1 ist eine Bande auf Höhe von ca. 50 kDa vorhanden, die den SDS-stabilen Dimeren entspricht. Nach dem Aufköchen der Lysatprobe verschwindet diese Bande (Spur 2). In den Spuren 1 und 2 ist zudem bei ca. 35 kDa die Bande für die einzelne DR α -Kette zu erkennen. Im Falle der IPs (Spuren 3 und 4) ist sowohl bei den gekochten als auch bei den nicht-gekochten Proben eine Bande auf Höhe der DR α -Einzelkette zu erkennen. Dies belegt, dass gB und MHCII-Moleküle koisoliert wurden. In keinem der beiden Ansätze ist eine Bande auf Höhe der SDS-stabilen Dimere zu erkennen (Spuren 3 und 4; s. gestrichelte Linie). Die gB-gebundenen MHCII-Moleküle weisen folglich keine kompakte, SDS-stabile Konformation auf.

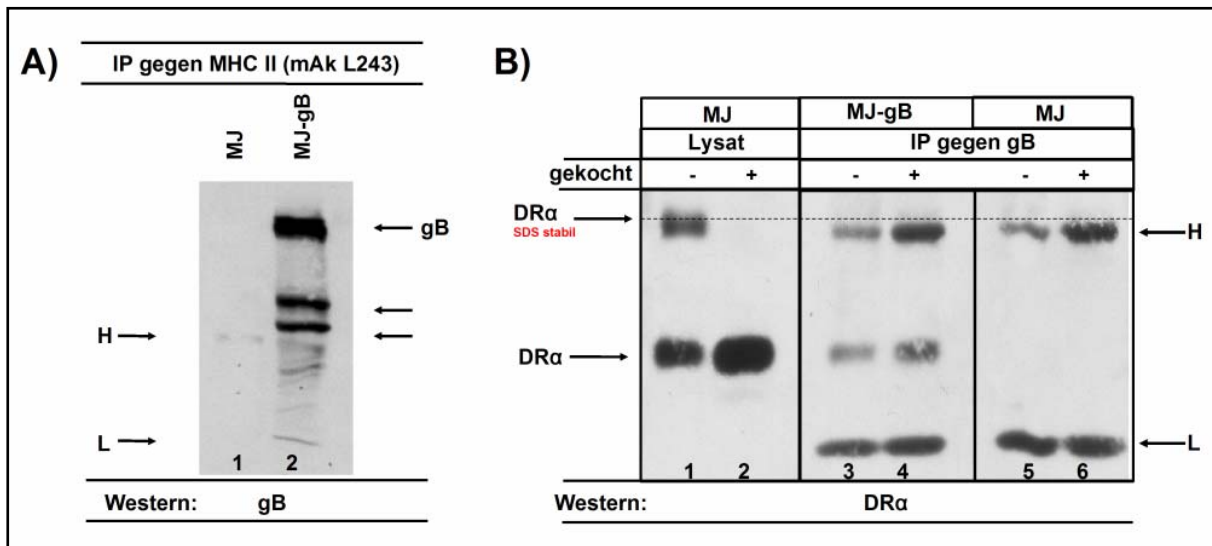


Abb. 3.6: gB interagiert nicht mit SDS-stabilen MHCII-Molekülen

A) Koisolierung von gB und MHC Klasse II-Molekülen über den mAk L243: MJ- und MJ-gB-Zellen wurden mit 0,5 % NP-40 lysiert. Das Lysat von je 10^7 MJ- (Spur 1) und MJ-gB-Zellen (Spur 2) wurde für Immunpräzipitationen mit dem mAk L243 eingesetzt. Die Präzipitate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Für die Western Blot-Analyse wurde der mAk 10B7 (spez. für gB) verwendet. **B) gB-assozierte Klasse II-Moleküle sind nicht SDS-stabil:** MJ- und MJ-gB-Zellen wurden lysiert und Immunpräzipitationen mit dem mAk 2c2 gegen gB durchgeführt. Um die SDS-stabilen Dimere nachzuweisen, wurde ein Teil des Präzipitates bei 37°C inkubiert, der andere Teil bei 95°C aufgeköcht

(Spur 4). Die Präzipitate (Spuren 3 bis 6) und die Lysatproben aus MJ-Zellen (Spuren 1 bis 2), wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Nachweis der DR α -Kette in der Western Blot-Analyse wurde der mAk TAL-1B5 verwendet. Die Pfeile markieren die SDS-stabilen Klasse II-Dimere, die DR α Kette, gB sowie die leichten und schweren Immunglobulinketten (H, L). Die Höhe der SDS-stabilen Dimere ist durch die gestrichelte Linie dargestellt.

3.7 gB-Expression beeinflusst nicht den Anteil SDS-stabiler MHCII-Moleküle

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob durch gB-Expression auch die Gesamtheit der SDS-stabilen Klasse II-Moleküle verändert wird. Aus diesem Grund wurde der Anteil SDS-stabiler MHCII-Moleküle bei MJ- und MJ-gB-Zellen durch Western Blot-Analyse miteinander verglichen. Es wurden zwei unterschiedliche MHCII-spezifische Antikörper verwendet. Der mAk LG-II ist für die β -Ketten von MHCII-Molekülen spezifisch und bindet sowohl Einzelketten, als auch SDS-stabile Dimere. Der mAk L243 bindet dagegen ausschließlich die dimere Form der MHCII-Moleküle. Die MJ- und MJ-gB-Zellen wurden mit 0,5 % NP-40 lysiert, mit Probenpuffer versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Abbildung 3.7 zeigt die Western Blot-Analyse unter Verwendung des mAk L243 (Abb. 3.7 A) und des mAk LG-II (Abb. 3.7 B). In Spur 1 wurden Lysate aus MJ-Zellen, in den Spuren 2 und 3 Lysate der MJ-gB^{hi}- bzw. MJ-gB^{lo}-Zellen separiert. Dass in allen drei Spuren eine vergleichbare Menge Zelllysate eingesetzt wurde, zeigt die Aktinfärbung (Abb. 3.7 A). Auch die Bandenstärken der durch den mAk L243 markierten MHCII-Moleküle sind bei MJ- bzw. MJ-gB-Zellen vergleichbar. Die Detektion mit dem mAk LG-II (Abb. 3.7 B) zeigt eine Bande von etwa 30 kDa, die der monomeren Form der MHCII-beta-Ketten entspricht. Die Bande bei 50-60 kDa entspricht den SDS-stabilen Dimeren. Das Verhältnis beider Ketten zueinander ist bei MJ- und MJ-gB-Zellen ähnlich.

In den MHCII-Molekülen wird CLIP mit der Hilfe von HLA-DM gegen hochaffine Peptide ausgetauscht (van Niel G. *et al.*, 2008). Wird HLA-DM ausgeschaltet, reichern sich CLIP-beladene MHCII-Moleküle auf der Zelloberfläche an (Myazaki T. *et al.*, 1996). Neumann J. *et al.* (2003) hatte gezeigt, dass gB zusätzlich zu DR-Molekülen auch mit HLA-DM interagiert. Um einen Einfluss der gB-Expression auf die DM-vermittelte Peptidbeladung zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen mit dem CLIP spezifischen mAk Cer.CLIP durchgeführt (Abb. 3.7 C). Mit Hilfe dieses Antikörpers lassen sich CLIP-beladene MHCII-Moleküle auf der Zelloberfläche nachweisen. Zur Bestimmung des Fluoreszenzhintergrundes wurden Färbungen mit einem unspezifischen Antikörper durchgeführt (Abb. 3.7 C, graue Balken). Die Abbildung 3.7 C zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung (Fehlerbalken) der relativen mittleren Fluoreszenz dreier unabhängiger Experimente. Die Fluoreszenzsignale der Färbungen mit dem Kontrollantikörper wurden als 100 % gewertet. Die Fluoreszenzsignale der Cer.CLIP-Färbungen wurden prozentual auf die Kontrollantikörperfärbungen bezogen. Sowohl bei MJ-Zellen als auch bei MJ-gB-Zellen sind keine signifikanten Mengen von CLIP-MHCII-Komplexen auf der Zelloberfläche nachzuweisen. Die Expression von gB übt also keinen deutlichen Einfluss auf die Oberflächenexpression CLIP-beladener MHCII-Moleküle aus.

Diese zwei Experimente belegen, dass die Gesamtmenge der SDS-stabilen MHCII-Dimere in MJ-gB^{hi/lo}-Zellen unverändert ist und die Expression von gB nicht zu einem Anstieg der CLIP-beladenen MHCII-Moleküle auf der Zelloberfläche führt

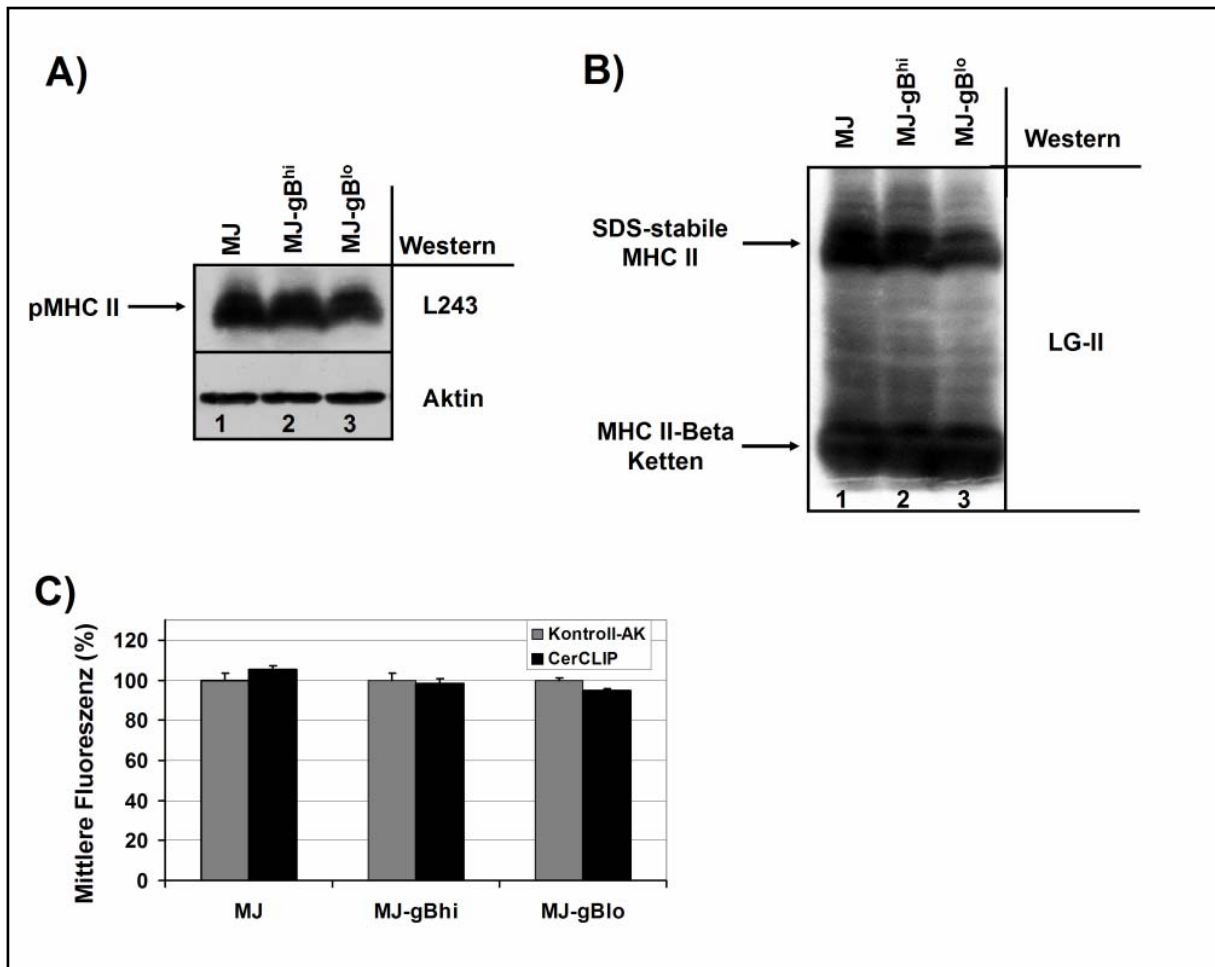


Abb.3.7: Die gB-Expression übt keinen Einfluss auf die Peptidbeladung der Klasse II-Moleküle aus

A,B) Die Menge SDS-stabiler Dimere in MJ-gB-Zellen verbleibt unverändert: Für die Darstellung SDS-resistenter MHCII-Dimere wurden Zelllysate mit Probenpuffer versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Auftrennung der Proben in der SDS-PAGE und Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran, wurden die mAbs L243 (spez. für pMHCII-Dimere;) und LG-II (spez. für MHCII-beta-Ketten) sowie ein Aktin-spezifischer Antikörper (mAk AC-40) für die Western Blot-Analyse verwendet. Die Pfeile zeigen die Positionen der MHCII-beta-Ketten, der SDS-stabilen Dimere und der peptidbeladenen MHCII-Moleküle (pMHCII) an. **C) Oberflächenexpression von CLIP-beladenen MHCII-Molekülen in MJ-gB-Zellen:** MJ- und MJ-gB^{hi/lo}-Zellen wurden mit einem Kontrollantikörper (mAk MAR18.5) und dem CLIP-spezifischen mAk Cer.CLIP sowie einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörperkonjugat inkubiert. Tote Zellen wurden mit Propidiumiodid angefärbt und von der Analyse ausgeschlossen. Im Balkendiagramm ist die relative mittlere Fluoreszenz (in %) dargestellt. Die Fluoreszenzwerte des Kontrollantikörpers wurden als 100 % gewertet (graue Balken). Die Daten der Cer.Clip-Färbungen wurden prozentual auf die jeweilige Färbung des Kontrollantikörpers bezogen (schwarze Balken). Die Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf drei unabhängige Messungen (n = 3).

3.8 MJ-gB-Zellen besitzen eine erhöhte MHCII-Oberflächenexpression

Nach der Beladung von MHCII-Molekülen in den MIICS gelangen die Peptid-beladenen Rezeptoren zur Zelloberfläche, wo sie von spezifischen CD4⁺-T-Zellen erkannt werden können. Um zu untersuchen inwieweit sich gB auf die Oberflächenexpression der MHCII-Moleküle auswirkt, wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen die MHCII-Oberflächenmenge von MJ- und MJ-gB^{hi/lo}-Zellen bestimmt. Die zu untersuchenden Zellen wurden mit PBS/EDTA von der Zellkulturschale gelöst und mit MHCII-spezifischen Antikörpern (ISCR3, L243, I80Ag-11, D1-12) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Alexa-488 gekoppeltes Konjugat verwendet. Durch eine Färbung mit Propidiumiodid wurden tote Zellen markiert und konnten so von der Analyse ausgeschlossen werden. In Abbildung 3.8 A ist das Ergebnis der FACS-Analyse in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Aufgetragen wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten abzüglich der durch den Kontrollantikörper (MAR18.5) erzeugte Hintergrundfluoreszenz. Die Balken in blauer Farbe entsprechen den MJ-Zellen, gelb und rot den MJ-gB^{hi/lo}-Zellen. Bei Verwendung der DR-spezifischen mAks ISCR3, I80Ag-11, D1-12 und L243 war das Fluoreszenzsignal in MJ-gB^{hi/lo}-Zellen stärker als in gB-negativen MJ-Zellen. Bei allen Antikörperfärbungen übertrafen die Signale der MJ-gB^{hi}-Zellen die der MJ-gB^{lo}-Zellen. Daraus lässt sich folgern, dass gB einen positiven, dosisabhängigen Effekt auf die MHCII-Zelloberflächenexpression besitzt.

Eine denkbare Erklärung für die höhere MHCII-Oberflächenexpression bei MJ-gB-Zellen ist eine größere MHCII-Gesamtmenge. Um dies zu überprüfen wurde die Expression der DR α - und der DM α -Kette mittels Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 3.8 C). DR α repräsentiert die klassischen, DM α die nicht-klassischen MHCII-Moleküle. Die Abbildung 3.8 C zeigt die Expression von DR α und DM α bei MJ- (Spur 1), MJ-gB^{hi}- (Spur 2) bzw. MJ-gB^{lo}-Zellen (Spur 3) bzw. Aktin zur Kontrolle der aufgetragenen Lysatmengen. Sowohl beim Nachweis von DR α und DM α als auch von Aktin sind die Bandenstärken zwischen MJ- und MJ-gB-Zellen identisch. Dies zeigt, dass die Menge der DR α - und der DM α -Ketten in MJ-gB-Zellen unverändert ist. Die MHCII-Expression auf der Zelloberfläche von MJ-gB Zellen ist folglich nicht durch eine größere MHCII-Gesamtmenge zu erklären.

Eine weitere Möglichkeit, den Effekt der gB-Expression auf die MHCII-Menge der Plasmamembran zu erklären ist eine Akkumulation der gB-MHCII-Komplexe auf der Zelloberfläche. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde eine Oberflächen-Immünpräzipitationen von gB durchgeführt. Bei dieser Methode inkubiert man die Zellen vor der Lyse mit dem entsprechenden Antikörper. Da Antikörper keine intakte Zellmembran passieren können, werden nur Proteine auf der Zelloberfläche gebunden. Nach der Lyse der Zellen wird das Lysat mit Protein-A Sepharose inkubiert und auf diese Weise Immunkomplexe von Molekülen, die von der Zelloberfläche stammen, isoliert. Die MJ- und MJ-gB^{lo}-Zellen wurden zu diesem Zweck für 30 min mit dem gB spezifischen mAk 2c2 in FACS-Puffer bei 4°C inkubiert. Diese Bedingungen verhindern die Internalisierung der gB-Antikörper-Komplexe und dadurch eine intrazelluläre Bindung von gB an MHCII-Moleküle. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 0,5 % NP-40 lysiert und über Nacht (ü.N.) mit Protein-A Sepharose inkubiert. Die Immunkomplexe wurden schließlich in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Das Ergebnis der Western Blot-Analyse ist in Abbildung 3.8 B dargestellt. Die ersten beiden Spuren zeigen die Versuchsansätze der MJ- (Spur 1) und der MJ-gB-Zellen (Spur 2). Erwartungsgemäß sind nur im Ansatz der MJ-gB-Zellen (Spur 2), nicht aber bei MJ-Zellen (Spur 1) Banden für die schweren und leichten Immunglobulinketten

vorhanden. Dies liegt daran, dass der mAk 2c2 nur an die MJ-gB Zellen bindet. Spur 3 zeigt die Position der DR α -Kette anhand einer MJ-Lysatprobe. Im Ansatz der MJ-gB-Zellen ist keine Bande auf Höhe der DR α -Kette vorhanden. Dass gB präzipitiert wurde, ist in Spur 5 gezeigt. gB und MHCII-Moleküle konnten in diesem Versuchsansatz nicht koisoliert werden, was nahelegt, dass gB-MHCII-Komplexe bei MJ-gB-Zellen nicht auf der Zelloberfläche vorkommen.

Die MHCII-Oberflächenmenge wird u.a. durch die Internalisierungsrate bestimmt. Um zu testen, ob die Endozytose von Klasse II-Molekülen bei MJ-gB-Zellen verändert ist, wurde die Endozytose von MHCII-Molekülen untersucht. Die Zellen wurden mit dem DR-spezifischen mAk L243 bei 4°C in FACS-Puffer für 30 min inkubiert. Dann wurden die Zellen in 37°C warmes Medium überführt und für 0, 1 und 3 h kultiviert. Während dieser Zeit werden die MHCII-Antikörperkomplexe von der Zelloberfläche endozytiert und somit einer Markierung durch Sekundäntikörper nicht mehr zugänglich. Nach Inkubation mit einem Alexa-488 gekoppelten Sekundäntikörperkonjugat wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. In der Abbildung 3.8 D ist die prozentuale Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität in einem Diagramm dargestellt. Der Fluoreszenzwert zum Zeitpunkt 0 wurde mit 100 % gewertet. Die gestrichelte Linie entspricht den Werten der MJ-Zellen, die durchgängige Linie den MJ-gB-Zellen. Im Falle der MJ-Zellen verringert sich die Fluoreszenzintensität der MHCII-Färbung innerhalb der ersten Stunde auf etwa 50 % des Ausgangswertes; bei MJ-gB-Zellen aber nur auf etwa 70 %. In den folgenden zwei Stunden fallen die Werte der MJ-Zellen auf etwa 40 %, die der MJ-gB-Zellen bleiben relativ konstant bei ca. 70 %. Dies legt nahe, dass durch die Expression von gB die Internalisierung der MHCII-Moleküle von der Zelloberfläche gehemmt wird.

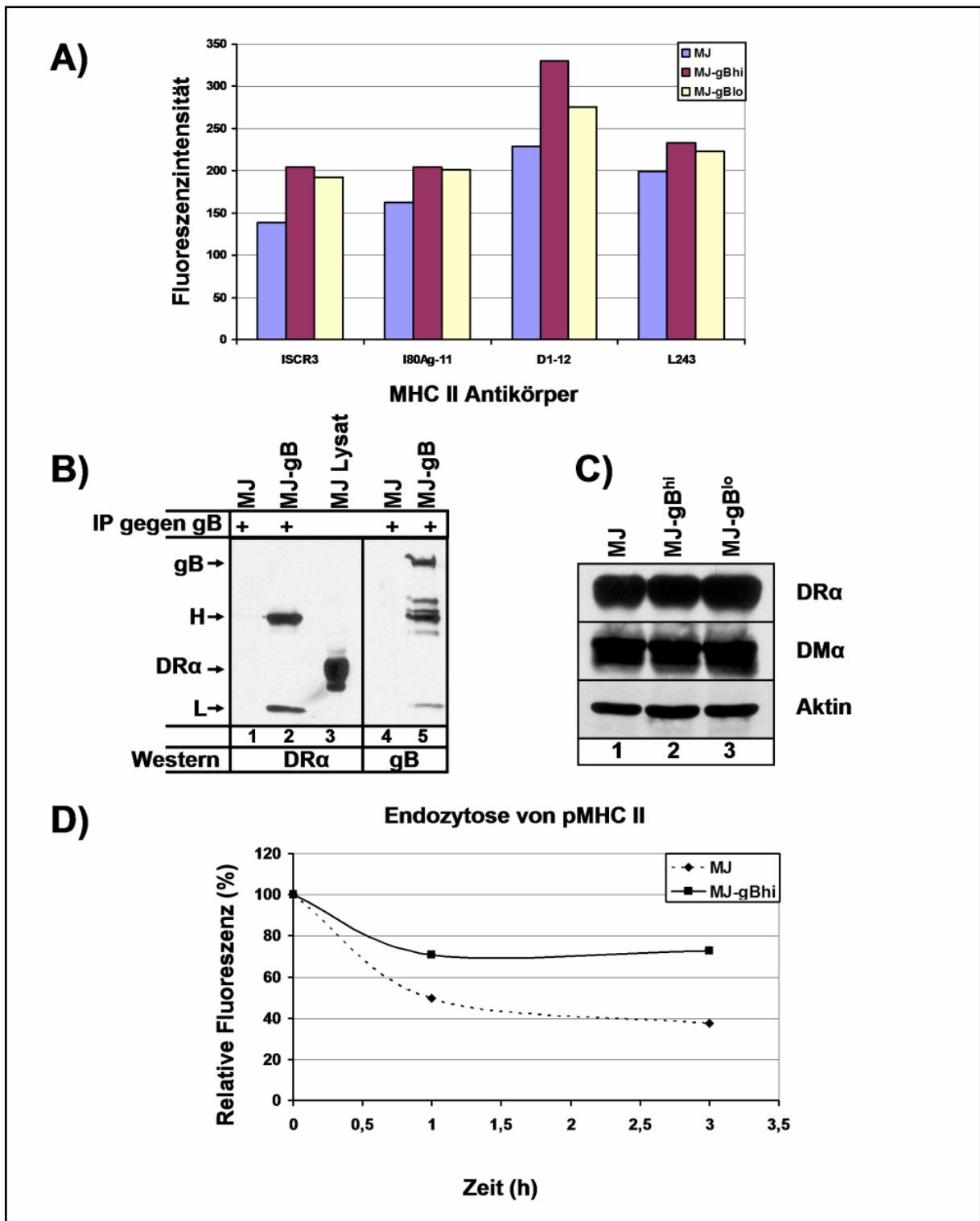


Abb.3.8: Höhere MHCII-Oberflächenexpression und geringere MHCII-Internalisierungsrate bei MJ-gB-Zellen
A) Durchflusszytometrische Analyse der MHCII-Oberflächenexpression von MJ- und MJ-gB^{hi/lo}-Zellen: MJ- und MJ-gB^{hi/lo}-Zellen wurden mit den MHCII-spezifischen Antikörpern ISCR3, I80Ag-11, D1-12, L243, einem Kontrollantikörper (MAR18.5, nicht gezeigt) und einem Alexa-488 gekoppelten Sekundärantikörperkonjugat angefärbt. Tote Zellen wurden mit Propidiumiodid markiert und von der Analyse ausgeschlossen. In dem Balkendiagramm ist die mittlere Fluoreszenzintensität der Messungen aufgetragen. Die Hintergrundfärbung (mAk MAR18.5) wurde von den MHCII-Messwerten subtrahiert **B) Keine Bindung von gB und MHCII-Molekülen auf der Zelloberfläche von MJ-gB-Zellen:** MJ- und MJ-gB-Zellen wurden für 30 min in FACS-Puffer (PBS, 2 % FCS, 0,01 % Na-Azid) bei 4°C mit dem gB-spezifischen mAk 2c2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Lysat mit Protein-A Sepharose bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Präzipitate wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE separiert und nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit mAks spezifisch für

gB (mAk 10B7) und DR α (mAk TAL-1B5) behandelt. Die Pfeile geben die Positionen von DR α , gB und den Immunglobulinketten (H und L) an. **C) Western Blot-Analyse zur Bestimmung der DR α -Expression in MJ-gB-Zellen:** MJ- und MJ-gB-Zellen wurden lysiert und in der SDS-PAGE separiert. Für die Analyse wurden Antikörper gegen DR α , DM α (mAk 5c/1) und Aktin eingesetzt. **D) Internalisierung von MHCII-Molekülen in MJ-gB-Zellen:** MJ- und MJ-gB-Zellen wurden mit dem mAk L243 für 30 min bei 4°C in FACS-Puffer inkubiert, dann in 37°C warmem Medium resuspendiert und für 0, 1 und 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die auf der Zelloberfläche verbliebenen MHCII-Antikörper wurden durch anti-Maus Alexa-488 gekoppelte Sekundärantikörper angefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Das Diagramm stellt die prozentuale Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität gegen die Zeit dar. Der Wert für den Zeitpunkt 0 wurde mit 100 % gewertet. Die gestrichelte Linie stellt die Werte der MJ-Zellen dar, die durchgezogene Linie die der MJ-gB-Zellen.

3.9 In MJ-gB-Zellen ist gB, nicht aber HLA-DR ubiquitinyliert

Die Oberflächenexpression von MHCII-Molekülen wird u.a. durch Modifikation der β -Kette mit Ubiquitin reguliert (Shin J. S. *et al.*, 2006, van Niel G. *et al.*, 2006). Ubiquitin-markierte MHCII-Moleküle werden von der Zelloberfläche internalisiert. Eine stärkere Ubiquitinylierung der MHCII-Moleküle führt zu einer verringerten Oberflächenexpression (van Niel G. *et al.*, 2006). Da in MJ-gB-Zellen eine höhere MHCII-Expression auf der Zelloberfläche nachgewiesen wurde (s. Abschnitt 3.8), wurde die Ubiquitinylierung der MHCII-Moleküle untersucht. Zu diesem Zweck wurden MHCII-Moleküle mittels Immunpräzipitation isoliert und in der anschließenden Western Blot-Analyse Ubiquitinmodifikationen (mAk FK2; spez. für Mono- und Poly-Ubiquitin) detektiert. Um zu kontrollieren, dass gleiche MHCII-Mengen präzipitiert wurden, wurde bei einem Teil jeder IP die DR α -Kette nachgewiesen. Die Bandenstärken der DR α -Ketten zeigen, dass bei MJ- und MJ-gB-Zellen gleiche Mengen von MHCII-Molekülen isoliert wurden. Im Falle der Detektion der Ubiquitinreste sind weder bei MJ- noch bei MJ-gB-Zellen Banden um 40-70 kDa zu erkennen. Dabei handelt es sich um den Bereich, in dem ubiquitinylierte Klasse II-Moleküle vorhanden sind (van Niel G. *et al.*, 2006). Nach IP von DR aus dem Lysat von MJ-gB-Zellen sind zudem keine ubiquitinylierten Proteine bei einem MW von ca. 120 kDa vorhanden. Dies spricht dafür, dass an MHCII-Moleküle assoziiertes gB nicht mit Ubiquitinresten modifiziert ist. Zur Kontrolle der Reaktivität des FK2-Antikörpers wurde eine Zelllysatsprobe separiert (Spur 4). Diese zeigt ein typisches Bandenmuster ubiquitinylierter Proteine. Der Schwerpunkt dieser Signale liegt im höhermolekularen Bereich. Eine Wiederholung der Immunpräzipitationen unter Verwendung eines weiteren Ubiquitin-spezifischen Antikörpers für die Western Blot-Analyse (mAk P4D1, s. Lapaque *et al.*, 2008) zeigte ein identisches Ergebnis (Daten nicht gezeigt). In MJ-Zellen sind MHCII-Moleküle demnach entweder gar nicht oder nur zu einem sehr geringen Anteil mit Ubiquitin modifiziert.

Es wäre aber möglich, dass die gB-assoziierten MHCII-Moleküle ubiquitinyliert sind. Um dies zu überprüfen, wurde gB aus MJ-gB-Zellen präzipitiert und in der Western Blot-Analyse der Immunpräzipitationen überprüft, ob durch gB koisolierte MHCII-Moleküle (bzw. gB selbst) mit Ubiquitinresten versehen sind (Abbildung 3.9. D). Spur 1 und 3 zeigen die Präzipitationen aus MJ-, Spuren 2 und 4 die IPs aus MJ-gB-Zellen. In den Spuren 1 und 2 wurde gB nachgewiesen, in den Spuren 3 und 4 Ubiquitinreste. Die Immunpräzipitation von gB (Spur 2) zeigt zusätzlich zu einer 120 kDa Hauptbande noch zwei weitere Banden bei ca. 55 und 65 kDa. In Spur 4 ist ein Bandenmuster ubiquitinylierter Proteine vorhanden, das sich von ca. 70 kDa bis über 150 kDa erstreckt. Die Signale oberhalb von 120 kDa entsprechen dem ubiquitinylierten aber nicht prozessierten gB. Die Banden unter 120 kDa gehören vermutlich

zu den gB-Spaltprodukten. Keine Banden sind im Bereich von 40-70 kDa vorhanden, dem Bereich in dem ubiquitinylierte MHCII β -Ketten zu erwarten wären (s.o.).

Schließlich wurde untersucht, ob sich die gB-Expression auf das Gesamtmuster ubiquitinylierter Proteine auswirkt. Mittels Western Blot-Analyse wurde die Gesamtheit ubiquitinylierter Proteine im Lysat von MJ- und MJ-gB-Zellen untersucht (Abb. 3.9 C). Zur Kontrolle der verwendeten Lysatmengen wurde die Aktinmenge bestimmt. Die Ubiquitinsignale zeigen keinerlei Unterschied zwischen MJ- (Spur 1) und MJ-gB-Zellen (Spur 2). Die Ubiquitinylierung zellulärer Proteine bei MJ-gB-Zellen ist verglichen mit den untransfizierten MJ-Zellen demnach nicht verändert.

Diese Experimente zeigen, dass in MJ-gB-Zellen gB, nicht aber die MHCII-Moleküle mit einem bzw. mehreren Ubiquitinresten modifiziert wird. Diese Daten legen auch nahe, dass weder gB noch MHCII-Moleküle im gB-MHCII-Komplex ubiquitinyliert sind.

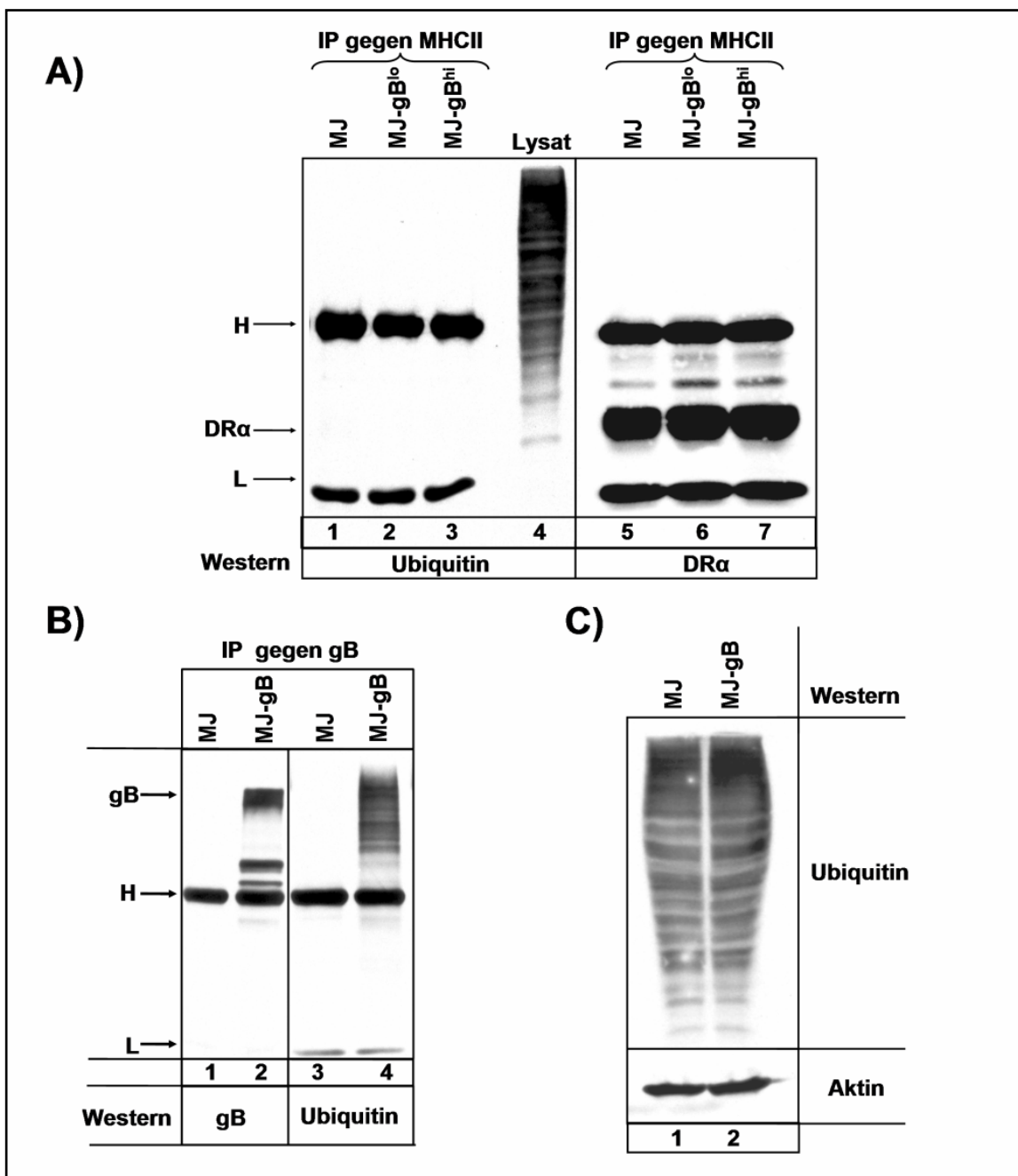


Abb. 3.9: gB, nicht aber die MHCII-Moleküle sind in MJ-gB-Zellen ubiquitinyliert

A) MHCII-Moleküle in MJ-gB Zellen sind nicht mit Ubiquitin modifiziert: MJ- und MJ-gB^{hi/lo}-Zellen wurden mit 0,5 % NP-40 lysiert und Immunpräzipitationen mit dem mAk L243 gegen MHCII-Moleküle durchgeführt. Die Präzipitate wurden in der SDS-PAGE separiert und nach elektrophoretischem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit den mAks FK2 (spez. für Mono- und Poly-Ubiquitin) und TAL-1B5 (spez. für DR α) behandelt. **B) Ubiquitylierung von gB:** Das Lysat von ca. 1×10^7 -Zellen wurde für IPs mit dem mAk 2c2 (spez. für gB) eingesetzt. Die Western Blot-Analyse der Präzipitate erfolgte mit Antikörpern für gB (Spuren 1 und 2; mAk 10B7) und Mono- bzw. Polyubiquitin (Spuren 3 und 4: mAk FK2). Die Pfeile markieren die Positionen der schweren und leichten Immunglobulinketten (H, L) bzw. von DR α und gB. **C) Die Gesamtubiquitylierung von Proteinen in MJ-gB-Zellen ist nicht erhöht:** Western Blot-Analyse von Lysaten aus MJ- und MJ-gB-Zellen. Es wurde mit den mAks FK2 und AC-40 gegen Ubiquitin bzw. Aktin detektiert.

3.10 MJ-gB-Zellen besitzen vergrößerte endosomale Kompartimente

In HSV-1 und HHV-6 infizierten Zellen ist die Organisation des späten endosomalen Systems verändert (Calistri A. *et al.*, 2007; Mori Y. *et al.*, 2008). Mittels Immunfluoreszenzanalysen wurde aus diesem Grund die intrazelluläre Verteilung der MHCII-Moleküle in MJ-gB-Zellen analysiert. In Abbildung 3.10 A sind Immunfluoreszenzanalysen von MHCII-Molekülen bei MJ- und MJ-gB^{hi/lo}-Zellen dargestellt. Die MHC Klasse II-Moleküle (grün) wurden mit dem mAk ISCR3 und einem Alexa-488 gekoppelten Sekundärantikörper und die Zellkerne (blau) mit Bisbenzimid angefärbt. MJ-Zellen zeigen eine typische vesikuläre Verteilung für MHCII-Moleküle. Diese ist durch zahlreiche kleine Vesikel gekennzeichnet, die vermehrt im perinukleären Bereich vorhanden sind. In MJ-gB^{hi/lo}-Zellen sind dagegen viele der MHCII-positiven Vesikel wesentlich größer und besitzen einen Durchmesser von ca. 1 μ m oder mehr. Diese Vesikel sind in der gesamten Zelle zu finden, verteilen sich schwerpunktmäßig aber in Kernnähe. In MJ-gB^{hi}-Zellen ist dieser Effekt stärker als in MJ-gB^{lo}-Zellen. Dort finden sich z.T. Vesikel, bei denen MHCII-Moleküle nur in der begrenzenden Membran, nicht aber im luminalen Bereich angefärbt sind. Um zu untersuchen, ob auch gB in diesen veränderten Vesikeln enthalten ist, wurde das intrazelluläre Verteilungsmusters von gB analysiert (Abb. 3.10 B). Auch gB kommt in sehr großen intrazellulären Vesikeln mit einem Durchmesser von ca. 1 μ m vor. Es konnten auch gB-positive Vesikel identifiziert werden, bei welchen die begrenzende Membran, nicht aber der luminal Teil angefärbt war (Abb. 3.10 C).

In MJ-Zellen befinden sich MHCII-Moleküle vor allem in spät-endosomalen Kompartimenten, die auch das Tetraspannin CD63 enthalten (Wubbolts R. *et al.*, 1996). Um zu testen, ob die in MJ-gB-Zellen identifizierten Vesikel zu den spät-endosomalen Kompartimenten gehören, wurden Kollokalisationsstudien von gB und CD63 durchgeführt. gB diente dabei als Marker für die vergrößerten Kompartimente (Abb. 3.10 C). Die Abbildung 3.10 C zeigt in roter Farbe die gB-, in grüner Farbe die CD63-Färbungen. In dem Überlagerungsbild beider Kanäle (merge) entspricht die gelbe Farbe einer Kofärbung von gB und CD63. Wie anhand der Abbildung zu sehen ist, enthalten die vergrößerten Vesikel sowohl gB als auch CD63. Um die Struktur der Vesikel zu verdeutlichen, wurde ein Teil der Zelle vergrößert dargestellt (Abb. 3.10 C untere Reihe). Zu erkennen sind wiederum vergrößerte Vesikel, die sowohl gB als auch CD63 enthalten. Bei diesen Analysen ist aufgefallen, dass zwei Arten von vergrößerten Vesikeln existieren. In einer Form kommt gB nur in der begrenzenden Membran vor, während CD63 im Lumen der Vesikel zu finden ist (s. Pfeile in der Vergrößerung). Bei der zweiten Variante sind gB und CD63 gemeinsam im Lumen vorhanden (s. Pfeile in der Vergrößerung).

Proteine, die in spät-endosomale (multivesikuläre) Endosomen transportiert werden, sind oft mit Ubiquitin modifiziert (Piper R. C. und Katzmann D. J., 2007). Untersucht wurde daher, ob die vergrößerten Vesikel auch ubiquitinylierte Proteine enthalten. Die Abbildung 3.10 D zeigt Kofärbungen von CD63 (grün) mit Ubiquitinresten (rot; Mono- und Poly-Ubiquitin). Die Bilder stellen einen Ausschnitt aus dem perinukleären Bereich von MJ-gB-Zellen dar. Das Ubiquitinsignal verteilt sich über die ganze Zelle mit starken punktuellen Anhäufungen im Kern (nicht gezeigt) und in der perinukleären Region. Im perinukleären Bereich der Zellen kann, v.a. in den vergrößerten endosomalen Vesikeln, Kollokalisierung von Ubiquitin und CD63 identifiziert werden (s. Pfeile; gelbe Farbe im Überlagerungsbild).

Diese Analysen deuten an, dass gB zum einen die subzelluläre Organisation des endosomalen Systems und zum anderen die Sortierung von CD63- und MHCII-Molekülen innerhalb dieses Systems verändert. Da diese vergrößerten CD63 enthalten, könnte es sich um MIICs handeln.

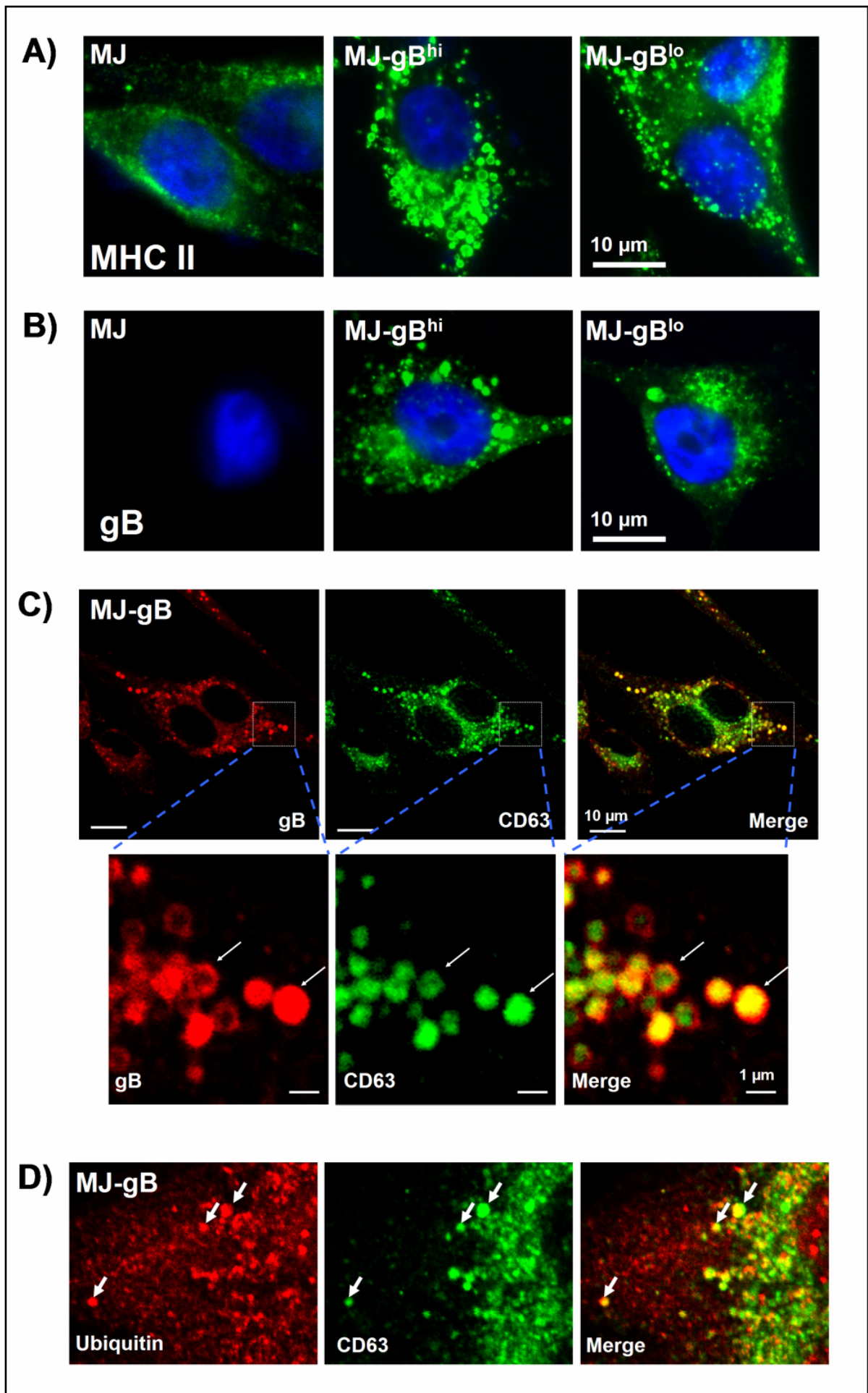


Abb. 3.10: MJ-gB Zellen zeigen vergrößerte endosomale Vesikel, die gB, MHCII, CD63 und Ubiquitin enthalten
A, B) Intrazelluläre Verteilung von MHCII-Molekülen und gB in MJ- und MJ-gB^{hi/lo}-Zellen: MJ- und MJ-gB-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, 24 h später fixiert und permeabilisiert. Die MHCII-Moleküle wurden mit dem mAk ISCR3 und gB über den mAk 2c2 markiert. Zur Darstellung der Kerne wurde Bisbenzimid verwendet. Die Visualisierung erfolgte mit einem Alexa-488 gekoppelten Sekundärantikörperkonjugat. Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot von Zeiss, Oberkochen) gemacht. Der Größenbalken entspricht 10 µm. **C) Kolokalisation von gB und CD63 in MJ-gB Zellen:** MJ-gB-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit einem gB-spezifischen Antikörper und einem entsprechenden Alexa-594 gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem anti-CD63-Alexa-488 Antikörper (mAk MEM-259) behandelt. Für die Analysen wurde ein konfokales Laserscanning Mikroskop (LSM 510 Meta von Zeiss) verwendet. Die optische Schichtdicke betrug 1 µm. Die Größenbalken entsprechen 10 µm bzw. 1 µm. **D) Kofärbung von CD63 und Ubiquitin im perinukleären Bereich von MJ-gB-Zellen:** MJ-gB-Zellen wurden nach Fixierung und Permeabilisierung zunächst mit einem Ubiquitin-spezifischen Antikörper und einem spezifischem Alexa-594 markierten Sekundärantikörperkonjugat behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit einem anti-CD63-Alexa-488 Antikörperkonjugat angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten am konfokalen Laserscanning Mikroskop (s.o.). Die Pfeile in den Abb. C und D kennzeichnen charakteristisch-vergrößerte Vesikel.

3.11 gB-MHCII-Komplexe werden über Exosomen sezerniert

Charakterisierung von Exosomen aus MJ-Zellen

Bei Exosomen handelt es sich um die in den extrazellulären Raum freigesetzten intraluminalen Vesikeln (ILVs) der multivesikulären Endosomen (MVEs) (Simons M. und Raposo G., 2009). Um herauszufinden, ob gB-MHCII-Komplexe über Exosomen sezerniert werden, wurde zuerst die Exosomenproduktion von MJ-Zellen überprüft.

Zunächst wurde im Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht, ob in MJ-Zellen auf subzellulärer Ebene MVE-ähnliche Strukturen identifiziert werden können. MJ-Zellen wurden zur Erhaltung der natürlichen Morphologie auf MillicellTM-HA Membranen ausgesät und für 24 h kultiviert. Nach Fixierung mit einer Mischung aus Paraformaldehyd und Glutaraldehyd und Nachfixierung mit Osmiumtetroxyd wurden die Membranen in dem Epoxidharz Epon eingebettet. Daraus hergestellte Ultradünnschnitte wurden im Elektronenmikroskop untersucht. In Abbildung 3.11 A und B sind Ausschnitte von MJ-Zellen dargestellt, auf denen man mehrere MVE-ähnliche Strukturen mit darin enthaltenen intraluminalen Vesikeln erkennen kann (s. Pfeile). Die Abbildungen 3.11 C und D zeigen etwas vergrößerte Ausschnitte von MJ-Zellen, in welchen die multivesikulären Endosomen (Abb. 3.11 C) bzw. die darin enthaltenen Vesikel (Abb. 3.11 D) vermessen wurden. Dies ergab, dass die MVBs einen Durchmesser von ca. 600 nm, die darin enthaltenen ILVs einen Durchmesser von ca. 50 nm aufweisen. In MJ Zellen finden sich also multivesikuläre Strukturen, deren intraluminalen Vesikel von der Größe her Exosomen entsprechen.

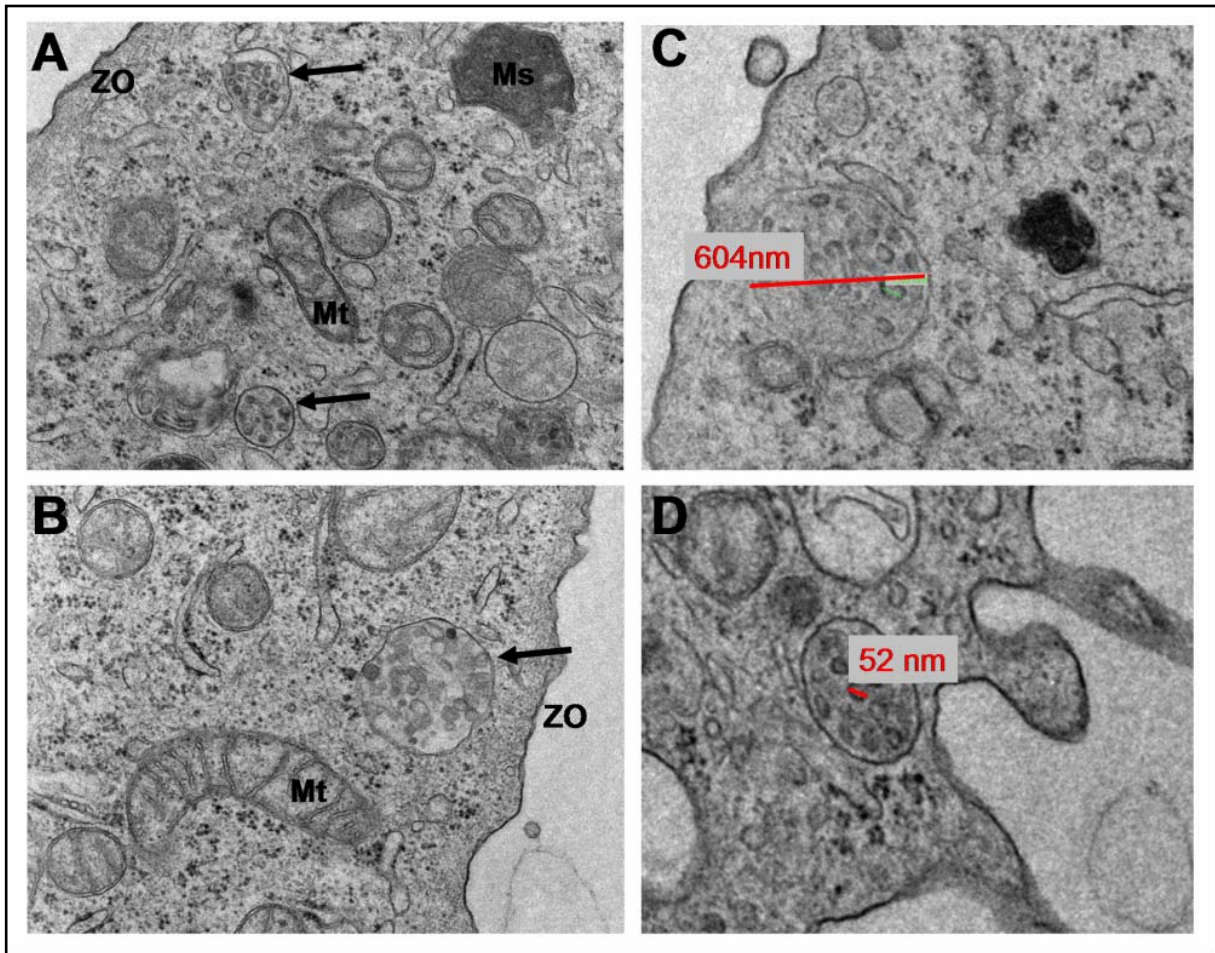


Abb. 3.11) Elektronenmikroskopische Darstellung von MVE-ähnlichen Strukturen in MJ-Zellen: Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen (Elektronenmikroskop Philips CM-10) von Ultradünnschnitten in Epon eingebetteter MJ-Zellen (A + B). Vergrößerte Darstellungen von MVB-ähnlichen Strukturen, in denen der Durchmesser von MVB-ähnlichen Vesikeln (C) bzw. der darin enthaltenen ILVs (D) ermittelt wurde. Die Pfeile markieren MVE-ähnliche Kompartimente. ZO = Zelloberfläche, Ms = Melanosom, Mt = Mitochondrium [In Kooperation mit J. Bedorf; Institut für Pathologie; Universitätsklinikum Bonn]

Exosomen lassen sich über mehrere Zentrifugationsschritte aus dem Zellkulturüberstand vieler Zellen isolieren (Raposo G. *et al.*, 1996). Da FCS, das gewöhnlich Zellkulturmedien zugesetzt wird, Exosomen enthält, wurden die MJ-Zellen zur Exosomengewinnung in dem serumfreien Medium Hybridomed DIF-1000 (Biochrom) kultiviert. Zur Aufreinigung der Exosomen wurde der Zellkulturüberstand abzentrifugiert und durch einen 0,22 μm Filter filtriert. Auf diese Weise werden Zelltrümmer und größere Proteinaggregate entfernt. Schließlich wurden die Exosomen durch Zentrifugation bei 100.000 x g sedimentiert. Die Bestimmung der Proteinbestandteile und der Morphologie der Vesikel erfolgte anhand von Western Blot-Analysen, Durchflusszytometrie und Transmissions-Elektronenmikroskopie (Abb. 3.12 A-D). In der Abbildung 3.12 A ist eine vergleichende Western Blot-Analyse von Lysaten aus MJ-Zellen (Spur 2) und Exosomen aus MJ-Zellen (Spur 1) dargestellt. Die Lysate wurden auf die gleiche Konzentration der HLA-DR α Kette eingestellt. Wie in Abbildung 3.12 A zu sehen ist, ist im Lysat der MJ-Exosomen, im Gegensatz zum Zelllysat, keine Ii und kein Calnexin nachzuweisen. MHCI-Moleküle, Tsg101 und HLA-DR α konnten sowohl in den Exosomen als auch in den Zellen nachgewiesen werden. Bezogen auf die DR α -Menge besitzen die Exosomen aus MJ-Zellen weniger HLA-DM α und MHCI, aber eine größere

Menge an Tsg101 und CD63. CD63 war bei den eingesetzten Mengen nur in den Exosomen zu detektieren. Dies zeigt eine hohe Anreicherung von CD63 in Exosomen von MJ-Zellen.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden Exosomen aus MJ-Zellen in PBS resuspendiert und an Latexkugeln gekoppelt. Die Färbungen erfolgten mit einem Kontrollantikörper, Antikörpern gegen die Tetraspännine CD63 bzw. CD81 und mit einem mAk gegen MHCII-Moleküle (mAk LG-II). Um zu bestimmen wie groß die Hintergrundfluoreszenz durch direkt an die Latexkugeln gekoppelte Antikörper ist, wurden die Färbungen auch mit Latexkugeln durchgeführt, an welche keine Exosomen gekoppelt worden waren. Die Abbildung 3.12 B zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität der durchflusszytometrischen Analyse von Exosomen aus MJ-Zellen. Zu erkennen sind hohe MFI-Werte für CD63, CD81 und MHC Klasse II-Moleküle, nicht aber für den unspezifischen Kontrollantikörper oder für Latexkugeln ohne Exosomen. Neben Exosomen werden auch andere Vesikel von Zellen sezerniert (z.B. apoptotische Vesikel). Diese unterscheiden sich aufgrund der Größe und der Morphologie von Exosomen (McLellan A. D., 2009). Daher wurde das Erscheinungsbild der Vesikel aus MJ-Zellen mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht. Für die elektronenmikroskopische Analyse wurden die Exosomen aus MJ-Zellen fixiert (PBS mit 1 % PFA, 0,05 % Glutaraldehyd), mit in PBS gepuffertem Osmiumtetroxyd nachfixiert und anschließend in das Epoxidharz Epon eingebettet. Anschließend erfolgte die Herstellung von Ultradünnschnitten und die Analyse im Elektronenmikroskop. Anhand der Abbildung 3.12 C ist zu erkennen, dass es sich um eine relativ homogene Population runder Vesikel handelt. Die Vermessung ergab einen Durchmesser von 30 – 60 nm. Es handelt sich auch um die für Exosomen typische Morphologie (McLellan A. D., persönliche Mitteilung). Aufgrund der Morphologie, der Größe und der Proteinbestandteile kann man schließen, dass es sich bei den von MJ-Zellen freigesetzten Vesikeln um Exosomen handelt.

Um Informationen darüber zu erhalten, welcher Anteil von MHCII-Molekülen in Form von Exosomen sezerniert wird, wurden die Menge an DR α -Kette, die während 48 h über Exosomen freigesetzt wird, mit definierten Zelllysatzmengen verglichen. Die Abbildung 3.12 D zeigt eine vergleichenden Western Blot-Analyse. Die DR α -Menge, die in Exosomen von 10^6 Zellen freigesetzt wird, entspricht etwa dem Lysat von 2×10^4 MJ-Zellen. Anhand dieser Daten lässt sich ableiten, dass MJ-Zellen in 48 Stunden ca. 2 % der MHCII-Moleküle über die Sekretion von Exosomen freisetzen.

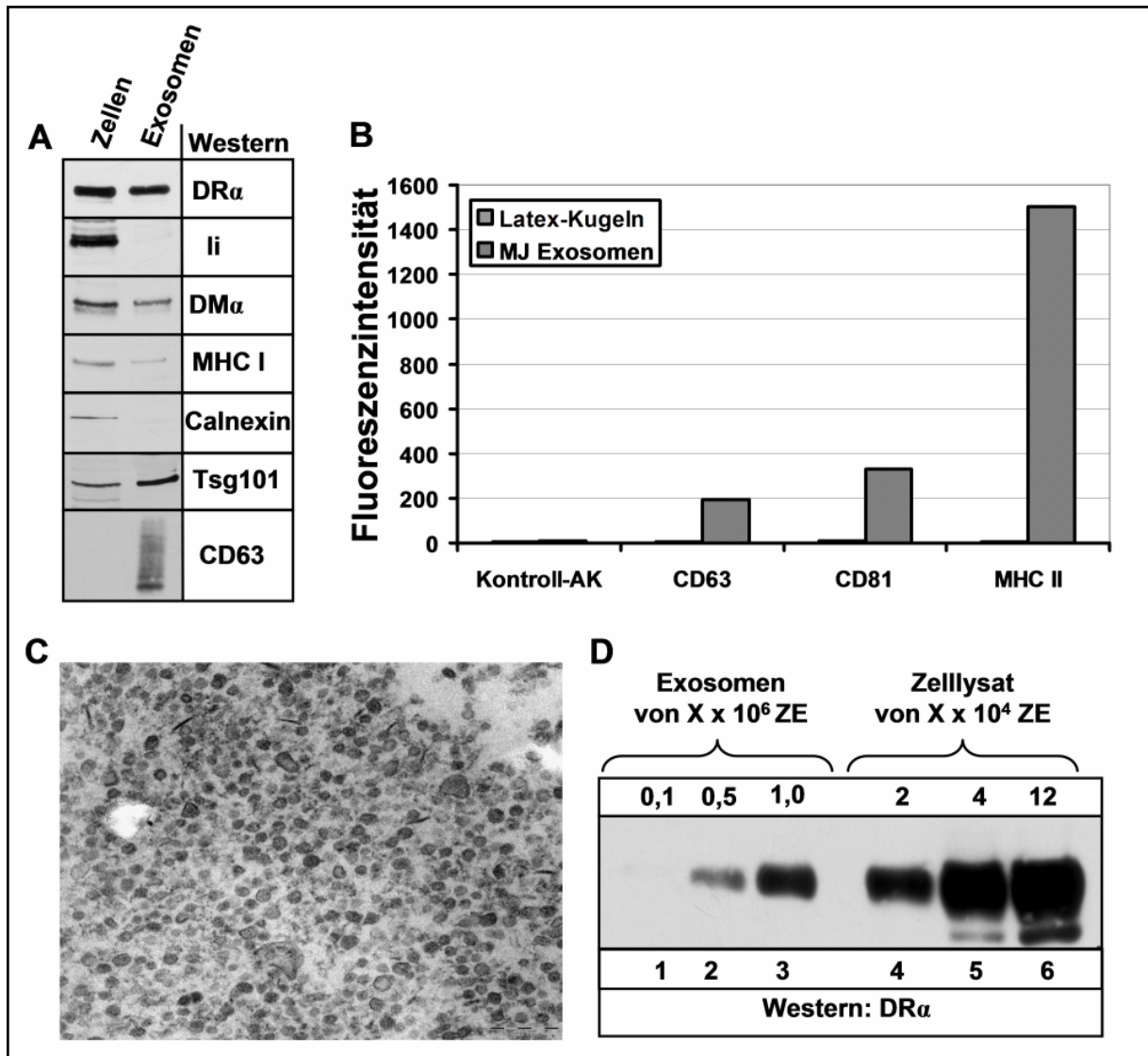


Abb. 3.12) Charakterisierung von Exosomen aus MJ-Zellen:

A) Western Blot-Analyse: MJ-Zellen und Exosomen aus diesen Zellen wurden lysiert, die Lysate auf eine vergleichbare Menge HLA-DR α eingestellt, in der SDS-PAGE separiert und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. In der Western Blot-Analyse wurden folgende Moleküle untersucht: DR α (mAk TAL-1B5), li (mAk Bu43), DM α (mAk 5c1), MHCI (mAk HC-10), Calnexin (mAk Clone 37), Tsg101, CD63 (mAk MEM-259). **B) Durchflusszytometrie:** In PBS resuspendierte Exosomen wurden über Nacht an Latexkugeln gekoppelt. In der FACS-Analyse wurde CD81 (mAk JS-81), CD63 (mAk MEM-259) sowie MHCII-Moleküle (mAk LG-II) angefärbt. Zur Kontrolle wurden der unspezifische Kontrollantikörper MAR18.5 und Latexkugeln ohne Exosomen, verwendet. Hellgrau = Latexkugeln ohne Exosomen; Dunkelgrau = Exosomen von MJ-Zellen **C) Transmissions Elektronenmikroskopie:** Exosomen von MJ-Zellen wurden fixiert (PBS mit 1 % PFA, 0,05 % Glutaraldehyd; mit in PBS gepuffertem Osmiumtetroxyd nachfixiert), in Epon eingebettet und Ultradünnschnitte hergestellt. Die Analyse erfolgte am Transmissions-Elektronenmikroskop Philips CM-10. [In Kooperation mit J. Bedorf; Institut für Pathologie; Universitätsklinikum Bonn] **D) Kinetik der über Exosomen sezernierten MHCII-Menge:** MJ-Zellen wurden für 48 h in serumfreiem Medium kultiviert, aus dem anschließend die Exosomen isoliert wurden. Die Exosomen wurden lysiert und zusammen mit Lysaten aus MJ-Zellen in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion der DR α -Kette mit dem mAk TAL-1B5. ZE = Zelläquivalente (1 ZE = 1 MJ-Zelle).

HSV-1 gB wird über Exosomen sezerniert

Nachdem sichergestellt war, dass MJ-Zellen Exosomen produzieren, wurde untersucht ob auch gB über Exosomen sezerniert wird. Ein erster Hinweis dafür war, dass gB mit CD63 kolokalisiert, einem Marker für späte- bzw. multivesikuläre Endosomen (Murk J. L. *et al.*, 2002) (s. Abb. 3.10 C). Zu diesem Zweck wurden Exosomen aus Zellkulturüberständen von MJ- und MJ-gB-Zellen isoliert und mittels Durchflusszytometrie bzw. Western Blot-Analysen auf das Vorkommen von gB hin untersucht (Abb. 3.13 A + B). Für beide Untersuchungen wurde die CD63-Menge angeglichen. Sowohl die durchflusszytometrische, als auch die Western Blot-Analyse zeigen, dass bei MJ-gB^{hi}- und MJ-gB^{lo}-Exosomen gB nachgewiesen werden kann. Ferner ist anhand der Abbildung zu erkennen, dass Exosomen der MJ-gB^{hi}-Linie eine größere Menge gB enthalten als die der Linie MJ-gB^{lo}. Während die Western Blot-Analysen für den Exosomen-Marker CD63 bei MJ-gB^{hi}- und MJ-gB^{lo}- Zellen ähnliche Bandenstärken zeigen, ist das gB-Signal bei MJ-gB^{hi} stärker als bei MJ-gB^{lo}. Das intensivere CD63-Signal in der MJ-Probe ergibt sich daher, dass dort mehr Material aufgetragen wurde. Die durchflusszytometrischen Analysen sind in Form von eines Balkendiagramms in Abbildung 3.13 B zu sehen. Diese zeigen ein höheres Fluoreszenzsignal für gB bei MJ-gB^{hi} verglichen mit MJ-gB^{lo}-Zellen (MFI = 1900 zu 1500). Die Färbung der Exosomen-beladenen Latexkugeln mit einem unspezifischen Kontrollantikörper (MAR18.5) zeigt lediglich eine geringere Hintergrundfluoreszenz. Western Blot- und FACS-Analyse zeigen, dass bezogen auf die CD63-Menge, die Exosomen von MJ-gB^{hi}-Zellen mehr gB enthalten als die der MJ-gB^{lo}-Zellen.

Eine sehr spezifische Aufreinigungsmethode der Exosomen ist die Auftrennung in einem Saccharose-Dichtegradienten. Die Exosomen verbleiben während der Zentrifugation in einem engen Dichtebereich zwischen 1 und 1,2 g/ml und werden dadurch von weiteren nicht exosomal-Zellvesikeln und Proteinaggregaten abgetrennt. Mittels dieser Methode sollte untersucht werden, ob gB in dem für Exosomen charakteristischen Dichtebereich nachzuweisen ist. Exosomen aus dem Zellkulturüberstand von MJ-gB-Zellen wurden über Nacht in einem 0,2-2,2 M Saccharosegradienten separiert, Fraktionen von der Oberseite des Gradienten abgenommen und deren Dichte mittels Refraktometrie bestimmt. Nach Verdünnung der Fraktionen mit PBS wurden die Exosomen durch Ultrazentrifugation erneut sedimentiert und dann lysiert. Da belegt ist, dass MHCII-Moleküle in Exosomen vorkommen (Raposo G. *et al.*, 1996), diente die DR α -Kette als Markerprotein für Fraktionen, die Exosomen enthalten. Die Abbildung 3.12 C zeigt die Western Blot-Analyse der MHC Klasse II-positiven Fraktionen 6-10. Die Dichte dieser Fraktionen liegt zwischen 1,13 und 1,2 g/ml, einem für Exosomen charakteristischen Bereich (Escola J. M. *et al.*, 1998). Die Expression von gB und DR α überlappen in den Fraktionen 7-10 und besitzen zudem ein ähnliches Verteilungsmuster bezüglich der Stärke der Banden. Sowohl gB und DR α zeigen die stärksten Signale in den Fraktionen 7-9, d.h. zwischen 1,15 und 1,18 g/ml. Dies zeigt, dass gB und DR-Moleküle in extrazellulären Vesikeln mit einer Dichte vorkommen, wie sie für Exosomen beschrieben ist.

Um zu überprüfen, ob gB neben MJ-gB-Zellen auch von anderen Zelllinien über Exosomen freigesetzt wird, wurden die Affennierenzelllinie COS-7, die humane Lungenfibroblastenlinie IMR90S und die menschliche embryonale Nierenzelllinie HEK-293T transient mit gB transfiziert und für 48 h in serumfreiem Medium kultiviert. Die Exosomen wurden aus dem Überstand von ca. 2×10^7 Zellen isoliert und nach Kopplung an Latexkugeln mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die FACS-Analysen der transfizierten Zellen zeigen Fluoreszenzsignale für gB. Keine gB-Signale sind bei den Exosomen der untransfizierten

Zellen nachzuweisen (Abb. 3.12 D). Die CD63-Signale sind in den transfizierten COS-7- und 293T-Zellen weniger stark als in den untransfizierten Zellen. Beachtenswert ist, dass die CD63-Signale für Exosomen zwischen den Zelllinien variieren. Dies beruht wahrscheinlich auf Unterschieden in der CD63-Expression der jeweiligen Zellen. HEK-293T-Zellen zeigen die höchsten CD63-Signale und IMR90S-Zellen die geringsten. Unterschiedlich stark sind auch die Signale für gB. Die Exosomen der transfizierten HEK 293T-Zellen zeigen höchsten Fluoreszenzintensitäten für gB, COS-7 die niedrigsten. Die Stärke der Signale korreliert mit der Oberflächenexpression von gB bei den transfizierten Zellen (MFI für gB der transfizierten Zellen: HEK 293T = 76; IMR = 56; COS-7 = 30). Die Unterschiede in der Intensität der gB-Signale zwischen den Exosomen der transfizierten Zellen lassen sich daher sehr wahrscheinlich durch die Transfektionsraten erklären.

Die vorherigen Versuche belegten, dass gB in Exosomen transfizierter Zellen nachzuweisen ist. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob gB auch in Exosomen HSV-1 infizierter Zellen vorhanden ist. Um dies zu testen, wurden Exosomen aus HSV-1-infizierten Raji-Zellen präpariert. Nach der Lyse der Exosomen wurde gB mittels Immunpräzipitation isoliert und in der Western Blot-Analyse nachgewiesen (Abb. 3.13 E). Um eine Kontamination durch Viruspartikel so weit wie möglich zu verhindern, wurden entsprechende Versuchsbedingungen gewählt. Der Zellkulturüberstand zur Exosomenisolation wurde nach 16 h abgenommen, während der HSV-Replikationszyklus ca. 18 h dauert. Der Zellkulturüberstand, aus dem die Exosomen aufgereinigt werden, wurde durch einen 0,22 µm Filter filtriert. Dieser Filter ist für HSV-Viruspartikel nur schwer passierbar (Eis-Hübinger A. M., persönliche Mitteilung). In Abb. 3.14 E ist in Spur 1 der Ansatz nicht infizierter Zellen, in Spur 2 der Ansatz der HSV-1 infizierten Raji-Zellen dargestellt. Nur aus dem Überstand der HSV-1 infizierten Raji Zellen konnte gB isoliert werden.

Diese Analysen zeigen, dass gB in stabil und transient transfizierten Zellen und wahrscheinlich auch in infizierten Zellen über Exosomen freigesetzt wird.

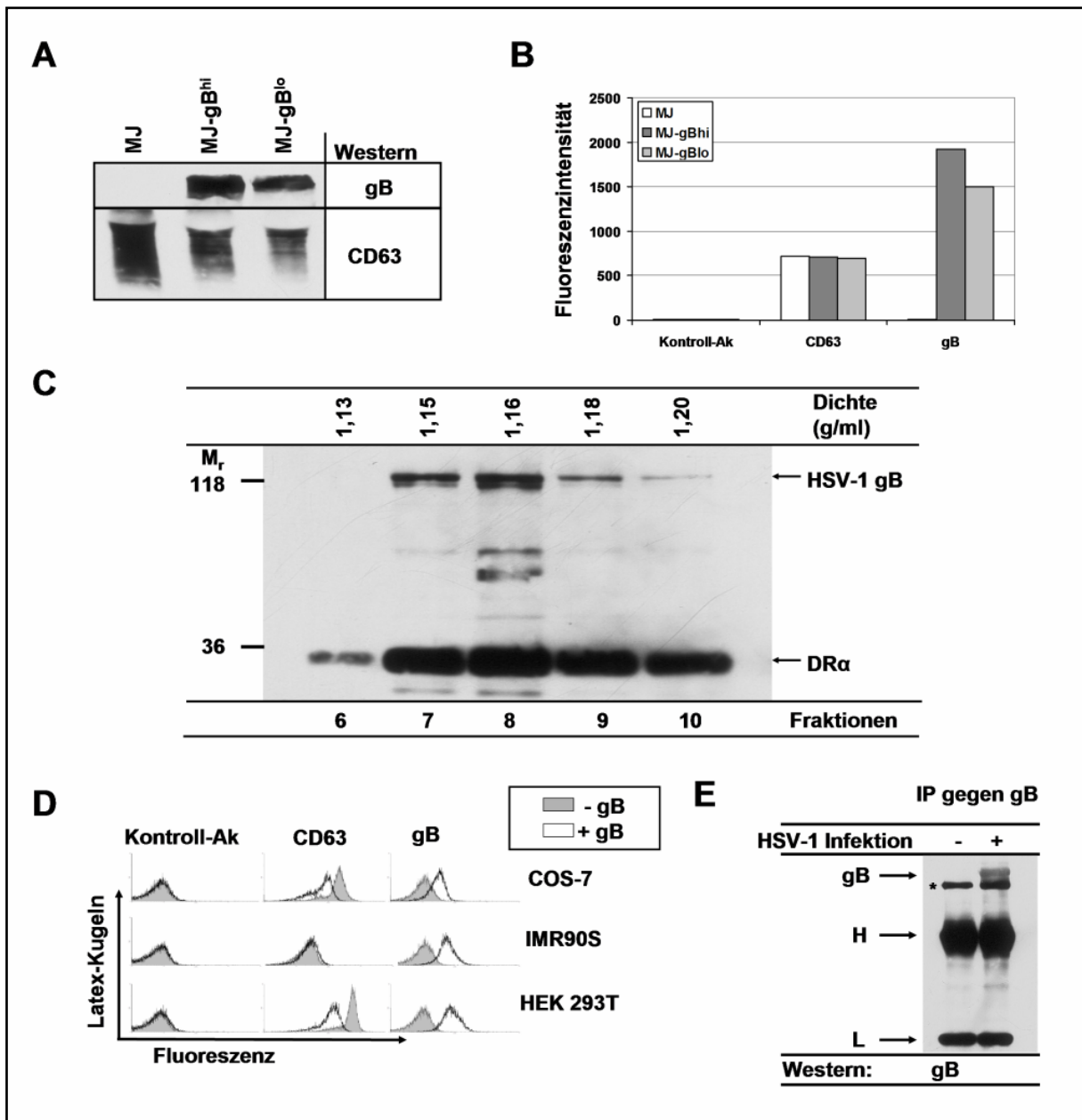


Abb. 3.13: Nachweis von HSV-1-gB in Exosomen

A) Western Blot-Analyse der Exosomen von MJ- und MJ-gB-Zellen: Exosomen wurden lysiert und in einer 12 %igen SDS-PAGE separiert. Nach elektrophoretischem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion von gB und CD63 mit den mAKs 10B7 und MEM-259. **B) Durchflusszytometrische Analyse:** Exosomen wurden in PBS resuspendiert, an Latexkugeln gekoppelt und mit einem Kontrollantikörper (MAR18.5), sowie mit mAKs gegen gB (2c2) und CD63 (MEM-259) inkubiert. In der Histogramm-Darstellung wurden die Anzahl der Latexkugeln gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die Zahlenwerte entsprechen den jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensitäten (Geometrischer Mittelwert). **C) Auftrennung von MJ-gB-Exosomen im Saccharose Dichtegradient:** Exosomen von MJ-gB Zellen wurden über Nacht einen 0,2 – 2,2 M linearen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt, Fraktionen von der Oberseite des Gradienten her abgenommen und deren Dichte mittels Refraktometrie bestimmt. Nach Verdünnung der einzelnen Fraktionen mit PBS wurden die Exosomen pelletiert und lysiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer 12 %igen SDS-PAGE. Im Anschluß an den Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion von gB und DRα mit den mAKs 10B7 bzw. TAL-1B5. Die Pfeile markieren die Positionen von gB und DRα. **D) FACS-Analysen von transient transfizierten Zelllinien:** COS-7-, HEK-293T- und IMR-Zellen wurden mit gB transfiziert, in serumfreiem Medium kultiviert, die Überstände nach 48 h abgenommen und Exosomen über mehrere Zentrifugationsschritte isoliert. Die Exosomen wurden in PBS resuspendiert an Latexkugeln gekoppelt und durchflusszytometrisch analysiert. Für die FACS-Analysen wurden ein Kontrollantikörper (MAR18.5), ein CD63 spezifischer mAK (MEM-259) und der mAK 2c2 gegen gB verwendet. **E) Nachweis von gB in Exosomenpräparationen von HSV-1 infizierten Raji-Zellen:** Raji-Zellen wurden mit einer MOI von 1 infiziert und in serumfreiem Medium kultiviert. 16 h nach

Infektion wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und Exosomen über Zentrifugation und Filtration (0,22µm) isoliert. Die Exosomen wurden lysiert und Immunpräzipitationen mit dem mAk 2c2 durchgeführt. In der Western Blot-Analyse der Präzipitate wurde der gB spezifische mAk 10B7 eingesetzt. Die Pfeile zeigen die Positionen von gB und den Immunglobulinketten an (H, L). Das Sternchen (*) zeigt eine Hintergrundbande des IP-Antikörpers an.

Nachdem sichergestellt war, dass MJ-gB-Zellen Exosomen sezernieren, die sowohl MHCII-Moleküle als auch gB enthalten, wurde überprüft, ob gB-MHCII-Komplexe in Exosomen nachzuweisen sind. Exosomen stammen aus den ILVs der multivesikulären Endosomen. Ein Markerprotein für MVEs ist CD63. Daher wurde zunächst analysiert, ob gB und MHCII-Moleküle gemeinsam in CD63 positiven Kompartimenten vorhanden sind. Fixierte und permeabilisierte MJ-gB-Zellen wurden mit Antikörpern gegen gB (Abb. 3.14 A; blau), CD63 (Abb. 3.14 A; grün) und DR (Abb. 3.14 A; rot) gefärbt. Wie in der Abbildung 3.14 A zu erkennen ist, zeigen alle drei Proteine eine vesikuläre Verteilung mit einer Konzentration in der Nähe des Kernes. Eine Überlagerung (merge) der gB-, DR- und CD63-Färbungen ist an der leicht bläulichen/weißen Farbe zu erkennen. Eine Kolo-kalisation von gB, DR und CD63 findet sich vor allem in den größeren Vesikeln (s. Pfeile). Aufgrund der Kofärbung von gB, DR und CD63 in den vergrößerten endosomalen Vesikeln kann man annehmen, dass dort auch gB-MHCII-Komplexe vorhanden sind.

Um zu testen, ob gB-MHCII-Komplexe über Exosomen freigesetzt werden, wurden Exosomen aus MJ- und MJ-gB-Zellen isoliert und mit 0,5 % NP-40 lysiert. Danach wurden IPs mit dem gB-spezifischen mAk 2c2 durchgeführt und in der Western Blot-Analyse der Präzipitate überprüft, ob gB und DR α koisoliert werden kann (Abb. 3.14 B). Im Ansatz der MJ-gB-Exosomen ist nach IP von gB eine Bande für DR α zu erkennen. Diese findet sich nicht im Ansatz der MJ-Exosomen, was die Spezifität der Präzipitation belegt. Dieser Versuch zeigt, dass gB-MHCII-Komplexe in Exosomen von MJ-gB-Zellen enthalten sind.

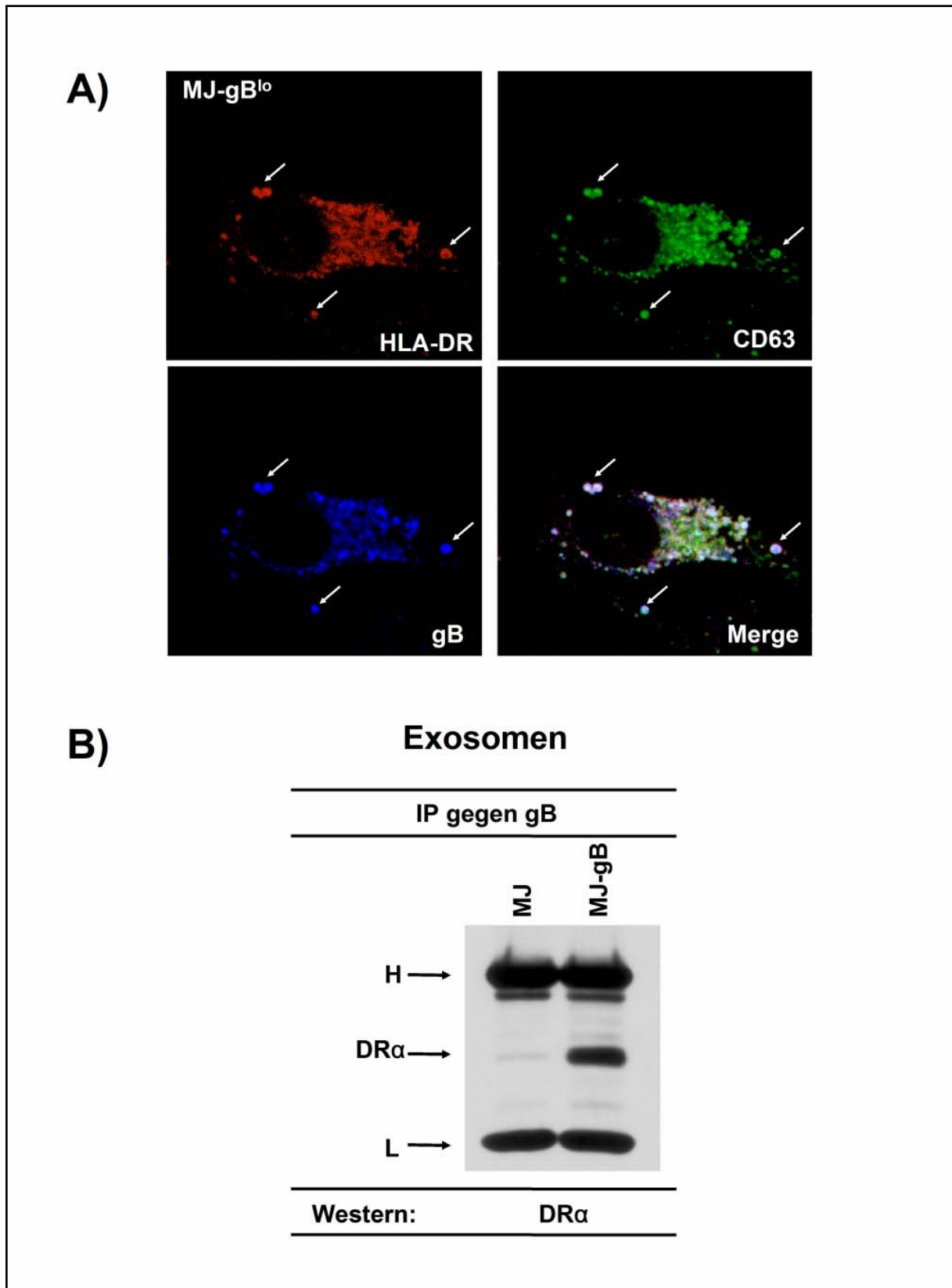


Abb. 3.14) Sekretion von gB-DR-Komplexen über Exosomen

A) Kolokalisation von gB, DR und CD63: MJ-gB-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit einem gB spezifischen mAk (2c2) sowie einem Alexa-594 markierten Sekundärantikörper inkubiert. Daraufhin wurde CD63 und HLA-DR über fluoreszenzmarkierte Antikörper (MEM-259-Alexa-488, MEM-12-Alexa-700) angefärbt. Die Analysen wurden mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) durchgeführt. Die Dicke der optischen Schnittebene betrug 1 μm . Die rote Farbe entspricht DR, die grüne Farbe CD63 und blau

stellt die gB-Färbung dar. **B) Koisolierung von gB und DR aus Exosomen von MJ-gB-Zellen:** Exosomen aus MJ- und MJ-gB-Zellen wurden in 0,5 % NP-40 lysiert und Immunpräzipitationen mit dem mAk 2c2 (spez. für gB) durchgeführt. Die Präzipitate wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE separiert und auf eine Nitrozellulosemembran übertrugen. Der Immunoblot erfolgte mit dem DR α spezifischen mAK TAL-1B5. Die Pfeile zeigen die Positionen von DR α und den Immunglobulinketten (H, L).

3.12 gB-Expression fördert die Exosomensekretion von MHCII-Molekülen

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass MJ- und MJ-gB-Zellen Exosomen sezernieren und dass gB-MHCII-Komplexe über Exosomen freigesetzt werden. Es sollte nun untersucht werden, ob sich die Expression von gB auf die Freisetzung oder die Zusammensetzung der Exosomen auswirkt. Zu diesem Zweck wurden je 2×10^6 MJ- und MJ-gB^{hi/lo}-Zellen für 24 h in serumfreien Medium kultiviert und aus diesem Zellkulturüberstand Exosomen isoliert. Die Exosomen wurden in PBS resuspendiert und an Latexkugeln gekoppelt. Die mit Exosomen beladenen Latexkugeln wurden mit einem Kontrollantikörper (MAR18.5), Antikörpern gegen CD63, CD71 (TfR, Transferrin-Rezeptor), gB und diversen MHCII-spezifischen Antikörpern (D1-12, L243, I80Ag-11, ISCR3, I251SB, 2.06, 16.23) inkubiert. Zur Kontrolle des durch die Antikörper verursachten Hintergrundes wurden auch nicht mit Exosomen beladene Latexkugeln untersucht. In der Abbildung 3.16 sind die Ergebnisse der FACS-Analysen in Form eines Balkendiagrammes dargestellt. Das Diagramm zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität der Färbungen. Der durch die Latexkugeln verursachte Hintergrund wurde von den Fluoreszenzintensitäten der Exosomen subtrahiert. Die blauen Balken entsprechen den Werten der MJ-Zellen, die roten den MJ-gB^{hi}- und die gelben Balken den MJ-gB^{lo}-Zellen. Die Färbung mit dem Kontrollantikörper zeigt nur ein sehr geringes Fluoreszenzsignal. Das bedeutet, dass keine unspezifische Bindung von Antikörpern an die Latexkugeln erfolgt ist. Erwartungsgemäß zeigen die gB-Signale, dass die Expression von gB in Exosomen von MJ-gB^{hi}-Zellen wesentlich stärker als in MJ-gB^{lo}-Zellen ist. Die Signalstärke der gB-Färbung bei MJ-gB^{lo} Zellen betrug etwa 30 % von dem Wert der MJ-gB^{hi}-Zellen. In MJ-Zellen konnte kein Signal für gB detektiert werden. Nur sehr geringe Signalstärken waren für den Transferrinrezeptor (TfR, CD71) nachzuweisen. Die Werte für das Exosomen-Markerprotein CD63 lagen bei Exosomen aus MJ-gB^{hi}-Zellen am höchsten (MFI = 92). Die Werte für CD63 der MJ-gB^{lo}-Zellen betragen etwa 1/3 (MFI = 31) der Fluoreszenzintensität der MJ-gB^{hi}-Zellen, die der MJ-Zellen lediglich 1/13 (MFI = 6). Ein ähnliches Ergebnis ergab sich bei Färbungen der Exosomen mit MHCII-Antikörpern. Im Falle der MJ-gB^{hi}-Exosomen waren die Signale für MHCII-Moleküle stärker als in MJ-gB^{lo}- und MJ-Exosomen. Die MHCII-Signalstärken betragen im Falle der MJ-gB^{lo}-Exosomen etwa 30 % der Werte der MJ-gB^{hi}-Exosomen. Die MHCII-Werte der MJ-Exosomen liegen bei etwa 10-20 % verglichen mit den MJ-gB^{hi}-Exosomen.

Aus diesen Daten kann man schließen, dass gB entweder das Sortieren der Proteine in Exosomen oder die Menge der von den Zellen freigesetzten Exosomen positiv beeinflusst. Da das Verhältnis der Signale mit der Menge der gB-Expression übereinstimmt, kann man vermuten, dass der Effekt von der Menge des gB abhängig ist.

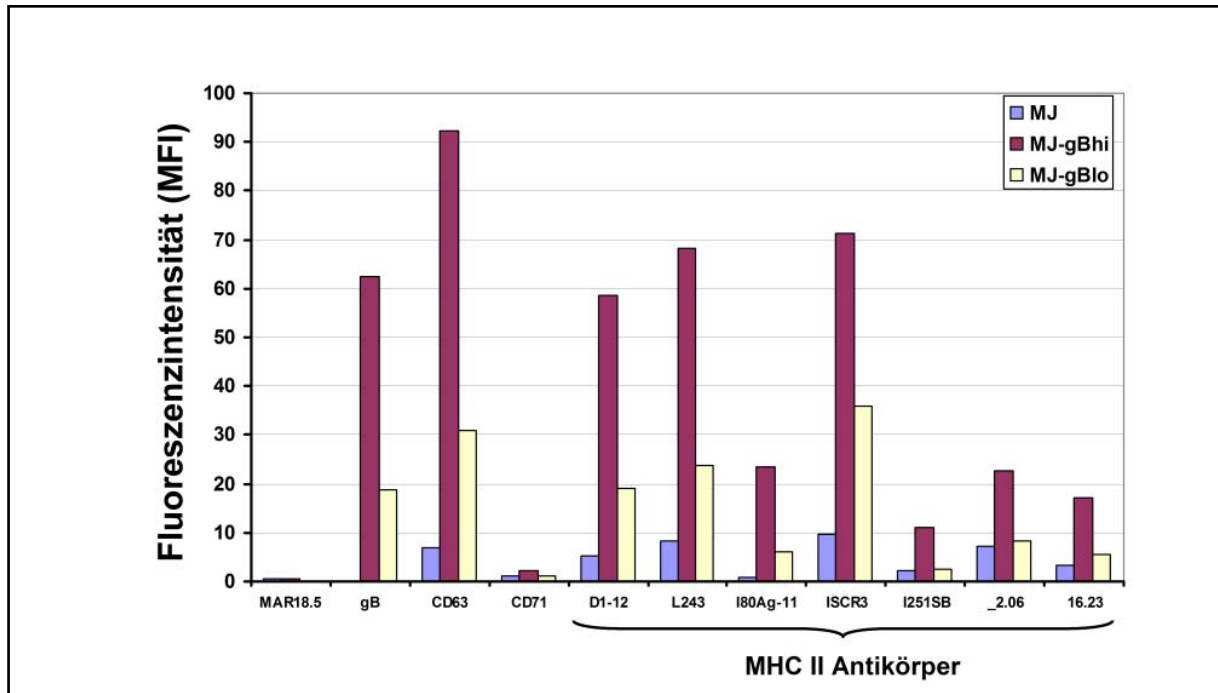


Abb. 3.16) gB-Expression erhöht die über Exosomen sezernierte Menge von CD63 und von MHCII-Molekülen: 2×10^6 MJ- und MJ-gB Zellen wurden in serumfreiem Medium kultiviert, die Überstände nach 24 h abgenommen und Exosomen über mehrer Zentrifugationsschritte isoliert. Die Exosomen wurden in PBS resuspendiert an Latexkugel gekoppelt und durchflusszytometrisch analysiert. Für die FACS-Analysen wurden ein Kontrollantikörper (MAR18.5), ein CD63-spezifischer mAk (MEM-259), ein mAk gegen den Transferrin-Rezeptor (TfR/CD71; MEM-75), der mAk 2c2 gegen gB und MHCII-spezifische Antikörper (D1-12, L243, I80Ag-11, ISCR3, I251SB, 2.06, 16.23) verwendet. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten, nachdem der durch die Latexkugeln verursachte Hintergrund subtrahiert wurde. Die blauen Balken entsprechen den Exosomen der MJ-Zellen, die roten Balken den MJ-gB^{hi}-Exosomen und die gelben den MJ-gB^{lo}-Exosomen.

4. Diskussion

Herpes Simplex Virus Typ 1 verbleibt nach der Primärinfektion lebenslang im Wirtsorganismus (Whitley R. J. und Roizman B., 2001; Subak-Sharpe J. H. und Dargan D. J., 1998). Um der Eliminierung zu entgehen, hat HSV-1 viele Mechanismen entwickelt, die das Immunsystem zu Gunsten des Virus beeinflussen (Whitley R. J. *et al.*, 1998; Whitley R. J. und Roizman B., 2001). Bei der Verteidigung des Körpers gegen Herpes Simplex Viren spielen CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle. Sie entwickeln zytotoxische Eigenschaften, sind für die Bildung HSV-1 spezifischer CD8⁺ T-Zellen essentiell und stimulieren B-Zellen zur Sekretion von Antikörpern (Rajasagi N. K. *et al.*, 2009; Ghiasi H. *et al.*, 1997; Yasukawa M. *et al.*, 1988). HSV-1 besitzt daher Strategien, um in die Antigenpräsentation über den MHCII-Weg und auf diese Weise in die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen einzugreifen (Neumann J. *et al.*, 2003; Wiertz E. J. *et al.*, 2007; Barcy S und Corey L., 2001).

4.1. Einfluss der gB-Expression auf die subzelluläre Verteilung und die Exosomen-vermittelte Sekretion von MHCII-Molekülen

In unserer Arbeitsgruppe wurde vor einiger Zeit nachgewiesen, dass das Glykoprotein B in HSV-1 infizierten Zellen mit MHCII-Molekülen assoziiert (Neumann J. *et al.*, 2003). Da gB-MHCII-Komplexe aber nicht auf der Zelloberfläche zu finden waren, blieb unbekannt, auf welchem Wege gB die subzelluläre Verteilung der Klasse II-Moleküle verändert. Ein Faktor, der die intrazelluläre Verteilung der MHCII-Moleküle beeinflusst, ist eine Modifikation durch Ubiquitin (van Niel G. *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich die gB-Expression auf die intrazelluläre Verteilung von MHCII-Molekülen ausübt und ob dies mit einer Ubiquitylierung in Verbindung steht. Da HSV-1 ein lytisches Virus ist und die infizierten Zellen nur eine kurze Lebensdauer besitzen, wurden für diese Untersuchungen MJ-Zellen (Mel JuSo) stabil mit dem HSV-1 kodierten gB transfiziert (MJ-gB-Zellen). Bei MJ-Zellen handelt es sich um eine MHCII- und li-exprimierende humane Melanomzelllinie, die ein etabliertes Modellsystem für den MHCII-Weg darstellt (Wubbolts R. *et al.*, 1996; Ramm G. *et al.*, 2000; Zachgo S. *et al.*, 1992; Fernandez-Borja M. *et al.*, 1996 und 1999; van Ham M. S. *et al.*, 1997). Um das Auftreten klonaler Effekte bei den stabilen Transfektanten weitgehend ausschließen zu können, wurden zwei unabhängig erzeugte Zellklone mit unterschiedlicher gB-Expression etabliert (s. Abb. 3.1).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HSV-1 Glykoprotein B einen starken Einfluss auf die subzelluläre Verteilung und die Exosomen-vermittelte Sekretion von MHCII-Molekülen ausübt. In gB-transfizierten Zellen sind vergrößerte endosomale Kompartimente vorhanden, die sowohl gB als auch MHCII-Moleküle und Ubiquitin enthalten. Zwar konnte in MJ-gB-Zellen ubiquityliertes gB, aber keine ubiquitylierten MHCII-Moleküle nachgewiesen werden. Anhand der Daten lässt sich ableiten, dass durch gB MHCII-Moleküle in multivesikulären Endosomen akkumulieren, von wo aus sie in die intraluminalen Vesikel sortiert und über Exosomen von den MJ-gB-Zellen sezerniert werden (s. Abb. 4.1).

Eine Infektion mit HSV-1 oder HHV-6 führt zu einer Veränderung des endosomalen, multivesikulären Systems (Calistri A. *et al.*, 2007; Mori Y. *et al.*, 2008). In HSV-1 als auch in HHV-6 infizierten Zellen akkumulieren MVEs im perinukleären Bereich. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass gB in die intrazelluläre Organisation der Endosomen eingreift und die

subzelluläre Verteilung von MHCII-Molekülen verändert. In MJ-gB-Zellen sind gB, CD63 und MHCII-Moleküle in Vesikeln vorhanden, die sich morphologisch stark von MHCII- und CD63-positiven Vesikeln in MJ-Zellen unterscheiden. Die Größe und Anzahl der Vesikel nehmen mit der Expressionsstärke von gB zu. Daher ist anzunehmen, dass es sich um eine durch gB induzierte Veränderung der Zellen handelt. Dass diese Vesikel CD63 und MHCII-Moleküle enthalten zeigt, dass es sich dabei um MIICs bzw. Kompartimente handelt, die zum spät-endosomalen bzw. multivesikulären System gehören. Multivesikuläre Endosomen sind u.a. dadurch charakterisiert, dass sie zahlreiche intraluminale Vesikel besitzen, die nach der Fusion der MVEs mit den Lysosomen abgebaut werden (Piper R. C. und Katzmann D. J., 2007).

Das Auftreten von vergrößerten endosomalen Vesikeln kann durch eine Vielzahl von Stimuli hervorgerufen werden. Oft geht dies mit einer Beeinflussung des Transports zu den Lysosomen einher. Die Expression des Nef-Proteins aus HIV resultiert in HeLa-CIITA und MJ-Zellen (Mel JuSo) in einer höheren Zahl an MHCII-positiven MVEs (Stumptner-Cuvelette P. *et al.*, 2003). Der Transport von MHCII-Ii-Komplexen in Lamp-1 positive, spät-endosomale Kompartimente ist in Nef-exprimierenden Zellen inhibiert. Dies führt zur Akkumulation von MHCII-Ii-Komplexen in MVEs und auf der Zelloberfläche. PI3-Kinasen (PI3 = Phosphatidylinositol 3-Phosphat) sind für die Biogenese der MVEs wichtig (Bright N. A. *et al.*, 2001). Daher wurde vermutet, dass die Wirkung von Nef durch die Aktivierung bestimmter PI3-Kinasen erfolgt. Die Behandlung von MJ-Zellen mit dem PI3-Kinasehemmer Wortmannin führt ebenfalls zu vergrößerten endosomalen Strukturen, die allerdings keine intraluminale Vesikel enthalten (Fernandez-Borja M. *et al.*, 1999). In Folge der Behandlung mit Wortmannin werden keine ILVs von der begrenzenden Membran in das Lumen der MVBs abgeschnürt, wodurch sich auch die Menge an sezernierten Exosomen verringert (Llorente A. *et al.*, 2004). Einen ähnlichen Effekt auf die Morphologie der MVEs hat eine Hemmung der PI3-Kinase Vps34 (Futter C. *et al.*, 2001). Ein weiteres Protein, das einen Einfluss auf die Struktur der Endosomen hat ist die invariante Kette. Die Akkumulation von Ii in Cathepsin S defizienten Mäusen führt zu vergrößerten endosomalen Strukturen (Boes M. *et al.*, 2005). Verantwortlich dafür ist der zytoplasmatische Anteil von Ii, der mit Hsc70 interagiert (Lagaudriere-Gesbert *et al.*, 2002). Hsc70 ist eine ATPase, die Clathrin Triskelions von den Clathrin-umhüllten Vesikeln entfernt (Schlossman D.M. *et al.*, 1984). Eine Interaktion von Hsc70 und Ii verhindert die Bildung einer Clathrin-Hülle und unterbindet bzw. verzögert so den Transport zu den lysosomalen Kompartimenten (Romagnoli P. *et al.*, 1993; Gorvel J. P. *et al.*, 1995). Auch die Deletion von CHMP5 (**Charged MVB Protein 5**), einer Komponente des ESCRT-III-Komplexes, resultierte in dem Anhäufen von vergrößerten, spät-endosomalen MVEs (Shim J. H. *et al.*, 2006). Der Verlust von CHMP5 führte auch zur Reduktion des lysosomalen Abbaus und dem Ansammeln von Proteinen in vergrößerten Endosomen sowie zu einer stärkeren Freisetzung von HIV Partikeln (Ward D. M. *et al.*, 2005). Diese Daten zeigen, dass die Expression oder Deletion einzelner Moleküle oder die Behandlung von Zellen mit verschiedenen Reagenzien einen starken Einfluss auf die Morphologie und Funktionalität des endosomalen Systems haben kann. Eine größere Menge an MHCII-Molekülen oder Ii, wie in Nef-exprimierenden Zellen, konnte in MJ-gB-Zellen nicht nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass der gB-induzierte Effekt sich von dem des Nef-Proteins unterscheidet. Möglicherweise wirkt gB auf endosomale Strukturen, in denen Ii schon abgebaut ist. Würde bei diesen die Fusion mit den Lysosomen gehemmt, hätte dies keine Auswirkung auf die Ii-Menge. Auf welchem Wege gB diesen Effekt induziert ist unbekannt. Denkbar ist eine Beeinflussung bestimmter ESCRT-Komponenten, PI3-Kinasen oder auch eine Interaktion mit Hsc70. Möglich wäre auch, dass gB in den Endosomen Ii z.T.

von den MHCII-Molekülen verdrängt. Nicht MHCII-gebundene Ii könnte mit Hsc70 interagieren und die Vergrößerung der Vesikel verursachen.

MVEs können auch mit der Zelloberfläche fusionieren. Dies führt dazu, dass die intraluminalen Vesikel der MVEs als Exosomen in den extrazellulären Raum freigesetzt werden (Lakkaraju A. und Rodriguez-Boulan E., 2008). Um zu untersuchen, ob sich gB auf das Freisetzen von Exosomen auswirkt, wurde zunächst überprüft, ob MJ-Zellen Exosomen sezernieren. Es konnte gezeigt werden, dass MJ-Zellen Vesikel sezernieren, die einen Durchmesser von 30-60 nm besitzen und die typische Morphologie von Exosomen aufweisen (McLellan A. D., persönliche Auskunft). Die Größe und die Morphologie der von MJ-Zellen sezernierten Vesikeln zeigen auch, dass es sich dabei nicht um apoptotische Vesikel handelt. Apoptotische Vesikel sind größer (> 200 nm) und von der Morphologie her wesentlich heterogener (Thery C. *et al.*, 2001; Thery C. *et al.*, 2006). In den von MJ-Zellen sezernierten Vesikeln sind die Moleküle CD63 und Tsg101 im Vergleich zu dem Zelllysate stärker vorhanden. Die von MJ-Zellen sezernierten Vesikel enthalten auch große Mengen von MHC Klasse II-Molekülen. Im Gegensatz dazu waren Calnexin und Ii in den Exosomenpräparationen nicht nachzuweisen. CD63 gehört zu der Familie der Tetranspannine und ist in Exosomen vieler Zellen sehr stark angereichert (Escosa J. M. *et al.*, 1998; Pols M. S. und Klumperman J., 2009). Tsg101, eine Komponente des ESCRT-I-Komplexes, ist ebenfalls in Exosomen nachgewiesen worden (Kesimer M. *et al.*, 2009; Hakulinen J. *et al.*, 2008). Ein weiteres Charakteristikum für Exosomen ist die Abwesenheit von Ii und dem ER-Protein Calnexin (McLellan A., 2009; s. Referenzen dort). Exosomen, die aus APCs wie B-Zellen oder DCs stammen, enthalten große Mengen von MHCII-Molekülen (Saunderson S. C. *et al.*, 2008; Johansson S. M. *et al.*, 2008; Segura E. *et al.*, 2005; Muntasell A. *et al.*, 2007). Die typische Größe von Exosomen liegt zwischen 50 und 100 nm, kann aber zwischen Zelllinien variieren (Clayton A. *et al.*, 2001). Zieht man Größe, Morphologie und Proteinbestandteile in Betracht, handelt es sich bei den von MJ und MJ-gB-Zellen sezernierten und in dieser Arbeit analysierten Mikropartikeln um Exosomen. Die von MJ- und MJ-gB-Zellen freigesetzten Exosomen enthielten nur geringe Mengen des Transferrin Rezeptors (TfR, CD71). Der TfR ist eine typische Komponente des frühen endosomalen Systems. In Exosomen von Retikulozyten, der murinen B-Zelllinie LK35.2 und der Erythroleukämiezelllinie K562 ist der TfR nachgewiesen worden (Geminard C. *et al.*, 2001; Abache T. *et al.*, 2007; Muntasell A. *et al.*, 2007), nicht aber in der humanen RN B-Zelllinie (Raposo G. *et al.*, 1996). Der geringe TfR-Anteil in Exosomen von MJ- und MJ-gB-Zellen ist ein Hinweis darauf, dass die Biogenese der Exosomen in diesen Zellen getrennt vom frühen endosomalen Weg verläuft.

In der vorliegenden Arbeit wurde herausgefunden, dass die Menge der über Exosomen freigesetzten MHCII- und CD63-Moleküle in MJ-gB-Zellen wesentlich höher liegt als in MJ-Zellen. Noch unklar ist, ob es sich dabei tatsächlich um Unterschiede in der Menge der Exosomen handelt. Möglich wäre auch, dass die Konzentration von CD63 und MHCII-Molekülen pro Vesikel durch gB erhöht wird. Daraus ergibt sich die Frage, auf welche Weise gB die Sekretion von MHCII-Molekülen bzw. CD63 über Exosomen verstärken könnte? Verschiedene Einflüsse verändern die Sekretion oder den Einbau bestimmter Proteine in Exosomen (McLellan A. D., 2009). Die Aktivierung von B-Zellen über CD4+ T-Zellinteraktion, die Quervernetzung des B-Zellrezeptors (BCR) oder die Zugabe von TLR9-Liganden fördern die Exosomensekretion (Arita S. *et al.*, 2008). Die Stimulation von primären B-Zellen über CD40 und den IL4R führte ebenfalls zu einem sehr starken Anstieg der Exosomensekretion (Saunderson S. C. *et al.*, 2008). In T-Zellen resultiert das Quervernetzen des T-Zellrezeptors (TCR), aber nicht die Behandlung mit PMA oder Ionomycin in einer Erhöhung der

Exosomensekretion (Blanchard N. *et al.*, 2002). Es sind zwei Transskriptionsfaktoren bekannt, die in die Regulation der Exosomensekretion involviert sind. Nach DNS-Schädigung wird die Exosomensekretion durch p53 reguliert (Lespagnol A. *et al.*, 2008). Zumindest in B-Zellen ist die Freisetzung der Exosomen z. T. an die Aktivierung von NF κ B gekoppelt (Arita S. *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu unterdrückte die Behandlung mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin die Bildung der intraluminalen Vesikel der MVEs sowie die Freisetzung von Exosomen (Fernandez-Borja M. *et al.*, 1999; Llorente A. *et al.*, 2004).

Das Sortieren von Proteinen in MVEs wird u.a. durch Ubiquitylierung reguliert (Nickerson D. P. *et al.*, 2006). Mit Ubiquitin modifizierte Transmembranproteine werden von Komponenten des sog. ESCRT-Komplexes (bestehen aus ESCRT-0, -I, -II, -III) erkannt und in die intraluminalen Vesikel der multivesikulären Endosomen transportiert (Pieper R. C. und Katzmann D. J., 2007). Obwohl noch kein direkter Zusammenhang zwischen der Ubiquitylierung der MHCII-Moleküle und der Exosomensekretion beschrieben worden ist, gibt es Hinweise auf einen solchen Zusammenhang. Bei der Differenzierung von unreifen DCs zu reifen DCs verringert sich nicht nur die Ubiquitylierung der MHCII-Moleküle (Shin J. S. *et al.*, 2006; van Niel G. *et al.*, 2006), sondern auch die Menge der sezernierten Exosomen (Thery C. *et al.*, 1999). D.h. in unreifen DCs, in denen viele MHCII-Moleküle ubiquityliert vorliegen, werden auch mehr MHCII-Moleküle über Exosomen sekretiert. Keinen Zusammenhang zwischen der Ubiquitylierung der MHCII-Moleküle und dem Einbau in Exosomen konnte jedoch in 293T und CIITA-transfizierten HeLa nachgewiesen werden (Gavreau M. E. *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde in MJ-gB-Zellen zwar eine Ubiquitylierung von gB, nicht aber von MHCII-Molekülen nachgewiesen. Demnach kann das verstärkte Sortieren der MHCII-Moleküle in Exosomen nicht durch eine Ubiquitylierung der Klasse II-Moleküle verursacht werden. Auch beim gB im gB-MHCII-Komplex konnte keine Ubiquitylierung nachgewiesen werden. Allerdings könnte hierbei das Problem der Nachweisgrenze bestehen. Möglich wäre, dass die Menge an gB, die mit den MHC Klasse II-Molekülen koisoliert wurde nicht ausreicht um eine Ubiquitylierung des gB nachzuweisen. Es ist nicht ganz unwahrscheinlich, dass die Ubiquitylierung des gB für die Sortierung des gB-MHCII-Komplexes in Exosomen wichtig ist. Eine Deletion von 37 Aminosäuren am C-Terminus des gB unterbindet sowohl die Ubiquitylierung als auch das Sortieren des gB in MVEs (Calistri A. *et al.*, 2007).

Bei aus MJ-Zellen isolierten MHC-II-Molekülen konnte keine Ubiquitylierung festgestellt werden. Dies bedeutet, dass in MJ-Zellen der Transport der MHCII-Moleküle in MVEs nicht durch Ubiquitylierung reguliert ist. Die Ubiquitylierung der MHCII-Moleküle bestimmt möglicherweise nicht in allen Zellen die intrazelluläre Sortierung. Dies wurde anhand von mutierten MHC Klasse II-Molekülen gezeigt, die nicht ubiquityliert werden können (Lapaque N. *et al.*, 2009). Eine Veränderung der relevanten Lysinreste beeinflusste in transient transfizierten HEK-293T-Zellen nicht die Kolo-kalisation mit dem spät-endosomalen Marker Lamp1. Im Gegensatz dazu fördert die Ubiquitylierung der MHCII-Moleküle in DCs, B-Zellen und Monozyten das Sortieren der MHCII-Moleküle in die MVEs, ist dafür aber nicht essentiell (van Niel G. *et al.*, 2006).

Es sind auch von der Ubiquitylierung unabhängige Wege bekannt, die dazu führen, dass Proteine in MVEs bzw. Exosomen sortiert werden. Dazu gehören Endozytosemotive (Vega M. A. und Strominger J. L., 1989; Pelchen-Matthews A. *et al.*, 2004), die Assoziation mit Lipid-Rafts oder Ceramid (De Gassart A. *et al.*, 2003; Matsuo H. *et al.*, 2004; Trajkovic K. *et al.*, 2008), die Interaktion mit dem B-Zellrezeptor (Lankar D. *et al.*, 2002) oder eine starke

Quervernetzung auf der Zelloberfläche (Fang Y. *et al.*, 2007). Auch durch einen Hitzeschock kann die Sekretion von bestimmten Proteinen über Exosomen induziert werden, wie anhand des Bat3 Proteins gezeigt wurde (Simhadri V. R. *et al.*, 2008). Bezüglich der MHCII-Moleküle gibt es Hinweise darauf, dass eine Assoziation mit Tetraspannin-Mikrodomänen den Einbau in Exosomen bestimmt und weniger die Modifikation mit Ubiquitin (Simons M. und Raposo G., 2009; Gavreau M. E. *et al.*, 2009). Zum Beispiel könnte die Interaktion mit CD63 entscheidend für den Einbau von MHCII-Molekülen in Exosomen sein. Ob gB die Interaktion von MHCII-Molekülen mit CD63 fördert ist noch unbekannt. Dies könnte erklären, warum in den Exosomen von MJ-gB-Zellen neben MHCII-Molekülen auch die Menge von CD63 erhöht ist. Eine direkte Interaktion von HSV-1 gB und CD63 ist bisher nicht beschrieben, ist aber nicht unwahrscheinlich. In MJ-gB-Zellen wurde gezeigt, dass gB und CD63 eine sehr starke Kolokalisation aufweisen (s. Abb. 3.13). Ähnliches wurde für das gB aus HHV6 gefunden, das in der HHV6 infizierten T-Zelllinie HSB-2 eine starke Überlappung mit der CD63 Färbung zeigt (Mori Y. *et al.*, 2008). Eine direkte Interaktion mit Tetraspanninen ist von MHCII-Molekülen bekannt. Je nach subzellulärer Lokalisation binden MHCII-Moleküle an bestimmte Tetraspannine (Engering A. und Pieters J., 2001). Innerhalb der MIICs assoziieren Klasse II-Moleküle beispielsweise mit CD63 oder CD82 (Hammond C. *et al.*, 1998; Engering A. und Pieters J., 2001). Eine der Hauptfunktionen der Tetraspannine ist die Vermittlung von Interaktionen zwischen Transmembranproteinen. Sie bilden ein sog. Tetraspannin – Netz, was die laterale Diffusion verringert und so die Proteine in enger räumlicher Nähe hält (Vogt A. B. *et al.*, 2002). Interessanterweise ist eine derartige Oligomerisation höherer Ordnung ein Mechanismus, wie die Gag-Proteine von Retroviren in Exosomen sortiert werden (Fang Y. *et al.*, 2007). Denkbar wäre, dass gB die Bildung eines solchen Netzes organisiert. Dadurch könnte es dazu kommen, dass gB, MHCII und CD63 in die intraluminalen Vesikel sortiert werden.

Es sind einige virale Proteine bekannt, die über Exosomen in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Exosomen aus EBV-infizierten Zellen enthalten LMP-1 (**L**atent **M**embrane **P**rotein-1), das suppressiv auf T-Zellen wirkt (Kereyer-Bibens C. *et al.*, 2006, Flanagan J. *et al.*, 2003). Ebenfalls über Exosomen werden die Gag-Proteine diverser Retroviren (Fang Y. *et al.*, 2007) sowie das Glykoprotein B der β -Herpesviren HHV-6 bzw. HCMV sezerniert (Mori Y. *et al.*, 2008; Walker J. D. *et al.*, 2009). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass auch das Glykoprotein B aus HSV-1 in Exosomen enthalten ist. Es ist das erste Protein aus der Familie der α -Herpesviren, das in Exosomen nachgewiesen wurde. gB konnte in Exosomen von MJ-gB-, IMR-, COS-7- und HEK-293T-Zellen detektiert werden. Da IMR, COS-7 und HEK-293T Zellen keine MHCII-Moleküle exprimieren, belegt dies, dass gB auch unabhängig von MHCII-Molekülen in Exosomen eingebaut wird. Das Sortieren des gB in Exosomen ist mit Kolokalisationsstudien konsistent, durch die gB in Lamp1- bzw. CD63- positiven MVEs nachgewiesen wurde (Calistri A. *et al.*, 2007; s. Abb. 3.10).

Während einer Infektion repliziert sich HSV vor allem in Zellen, die keine MHCII-Moleküle exprimieren. Die Exosomen-vermittelte Sekretion von gB könnte deswegen auch in nicht-APCs immunologisch relevant sein. gB wird relativ früh im Infektionszyklus exprimiert. mRNA und Protein sind in den ersten 2-5 h nach Infektion nachweisbar (English L. *et al.*, 2009; Mueller S. N. *et al.*, 2003; Pederson N. E. *et al.*, 1992; Rice S. A. *et al.*, 1988). Auch in Gegenwart von DNA-Syntheseblockern wird gB exprimiert, wenn auch in geringerer Menge (Peake M. L. *et al.*, 1982; Rafield L. F. und Knipe D. M., 1988). gB wird also schon exprimiert, bevor Viruspartikel in großer Menge von der infizierten Zelle ausgeschüttet werden. Innerhalb von zwei Stunden nach Infektion sind auf der Zelloberfläche infizierter Zellen

MHCI-Moleküle vorhanden, die mit vom gB stammenden Peptiden beladen sind (Mueller S. N. *et al.*, 2003). Diese MHC-Komplexe sind ausreichend, um gB-spezifische T-Zellklone zu stimulieren. Exosomen, die von HSV-1 infizierten Zellen während dieser Zeit freigesetzt werden, könnten über diese MHC-Komplexe direkt oder indirekt gB-spezifische T-Zellen aktivieren. Eine CD8+ Antwort gegen gB könnte auch über die Kreuzpräsentation von exosomalem gB eingeleitet werden, wie es z.B. für HCMV beschrieben wurde (Walker J. D. *et al.*, 2009). Da HSV-1 gB eines der Hauptziele des Immunsystems bei der Bekämpfung einer HSV-Infektion ist, wäre es sehr interessant, die immunologische Bedeutung der Freisetzung von gB (oder anderer HSV-Proteine) über Exosomen genauer zu analysieren.

Von HSV-1 infizierten Zellen werden zusätzlich zu infektiösen Virionen auch in großer Menge nicht-infektiöse Vesikel sezerniert. Die Anzahl dieser Vesikel ist nahezu identisch mit der Anzahl der Viruspartikel (Szilagy J. F. und Cunningham C., 1991; Dargan D. J. *et al.*, 1995). Bei diesen Vesikeln handelt es sich um die L-Partikel (Light Partikel, Szilagy J. F. *et al.*, 1991) und die PREPs (Pre Replication Particles (Dargan D. J. *et al.*, 1995). Sie enthalten kein Nukleokapsid (Szilagy J. F. *et al.*, 1991; Rixon F. J. *et al.*, 1992; Dargan D. J. *et al.*, 1995) und sind von der Größe und Morphologie her den Exosomen ähnlich. L-Partikel und PREPs enthalten große Mengen viraler Proteine. Ob typische exosomale Proteine enthalten sind, ist noch nicht untersucht worden. Inwieweit gB in die Erzeugung dieser Partikel involviert ist, ist ebenso unbekannt. In diesem Zusammenhang wäre es aufschlussreich zu untersuchen, welche Rolle die Ubiquitylierung des gB spielt. Die Ubiquitylierung ist ein wichtiges Signal für den intrazellulären Transport von Transmembranproteinen über den ESCRT-Komplex. Eine Vielzahl von Viren nutzt das ESCRT-System zur Bildung von Viruspartikeln. Dazu rekrutieren sie ESCRT-Komponenten oder Ubiquitinligasen (Bieniasz P. D., 2006). Die Gag- oder Matrix-Proteine von einigen Viren besitzen sog. L-Domänen, mit welchen sie direkt an Komponenten des ESCRT-Komplexes binden, z.B. AIP/Alix (Pornillos O. *et al.*, 2002; Fisher R. D. *et al.*, 2007). AIP und Alix interagieren mit der ESCRT-I Komponente Tsg101 oder mit Vertretern der Nedd4-Familie der HECT-E3-Ubiquitinligasen, was zur Ubiquitylierung viraler Proteine führt (Martin-Serrano J. 2007). Auch HSV nutzt das ESCRT-System für die Viruspartikelbildung (Calistri A. *et al.*, 2007; Crump C. S. *et al.*, 2007). gB enthält zwar keine L-Domänen, wird aber mit Ubiquitin modifiziert und wahrscheinlich auf diesem Weg in die MVEs sortiert (Calistri A. *et al.*, 2007). Ob gB auch Komponenten des ESCRT-Systems bzw. Ubiquitinligasen für die Viruspartikelbildung rekrutiert, ist unbekannt.

4.2 Einfluss von gB auf die MHCII-Oberflächenexpression

In einigen HSV-1 infizierten Zellen kommt es zu einer Verringerung der MHCII-Oberflächenexpression. Trgovcich J. *et al.*, (2002) haben in Glioblastomzellen nach Infektion mit HSV-1 (Stamm F) eine drastische Reduktion der MHCII-Moleküle auf der Plasmamembran beobachtet. Deletion der Gene γ 34.5 oder UL41 bei diesem HSV-1 Stamm führte dazu, dass dieser Effekt des Virus aufgehoben wurde. Eine geringere Menge von MHCII-Moleküle auf der Zelloberfläche hatten auch Neumann J. *et al.* (2003) nach Infektion einer B-Lymphomzelllinie mit HSV-1 Stamm 17+ gefunden. Im Gegensatz dazu konnten Barcy S. und Corey L. (2001) nach Infektion einer anderen B-Lymphomzelllinie mit dem HSV-1 Stamm F einen Einfluss auf die Aktivierung von CD4+ T-Zellen, aber keine Verringerung der MHCII-Zelloberflächenexpression nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde herausgefunden, dass MJ-gB-Zellen verglichen mit der Ausgangszelllinie eine stärkere MHCII-Oberflächenexpression besitzen. Die MHCII-Menge auf der Plasmamembran der MJ-gB^{hi}-

Zellen übertraf die der MJ-gB^{lo}-Zellen. Da die Klasse II-Oberflächenexpression mit der Expression des gB korreliert, ist wahrscheinlich keine zufällige Variation von Zellklonen für diesen Effekt verantwortlich. Eine Infektion von MHC Klasse II-exprimierenden Glioblastomzellen mit mit UL41- oder γ 34.5 defizienten HSV-1 Viren des Stammes F führt zu einer höheren MHCII-Expression auf der Plasmamembran (Trgovcich J. *et al.*, 2002). In Betracht der Ergebnisse dieser Arbeit kann vermutet werden, dass gB in diesen Effekt involviert sein könnte.

Wie groß der Anteil der MHCII-Moleküle auf der Zelloberfläche ist, wird durch den Transport zur Zelloberfläche bzw. die Internalisierung von der Zelloberfläche reguliert. In MJ-gB-Zellen konnte eine geringere Endozytoserate von MHCII-Molekülen nachgewiesen werden. Daher ist der Grund für die größere MHCII-Menge auf der Zelloberfläche der MJ-gB-Zellen wahrscheinlich eine längere Halbwertszeit der MHCII-Moleküle auf der Plasmamembran. Die Kinetik des Transports der MHCII-Moleküle zur Zelloberfläche wurde nicht untersucht. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass auch der Transport zur Zelloberfläche bei MJ-gB-Zellen zur stärkeren MHCII-Oberflächenexpression beiträgt.

Ein Faktor, der die Endozytose von MHCII-Molekülen von der Plasmamembran bewirkt, ist die Ubiquitynylierung (Shin J. S. *et al.*, 2006; van Niel G. *et al.*, 2006; Ohmura-Hoshino M. *et al.*, 2006). In MJ- und MJ-gB-Zellen konnte jedoch keine Ubiquitynylierung von MHCII-Molekülen nachgewiesen werden. D.h. die Menge der MHCII-Moleküle auf der Zelloberfläche wird bei MJ- bzw. MJ-gB-Zellen nicht durch Ubiquitynylierung reguliert. Da auch keine gB-MHCII-Komplexe auf der Zelloberfläche nachgewiesen wurden, kann der Effekt auch nicht dadurch erklärt werden, dass sich gB-MHCII-Komplexe auf der Zelloberfläche anhäufen.

Zusätzlich zu den MHCII-Molekülen sind in MJ-gB-Zellen auch die MHCI- und die TfR-Oberflächenexpression höher als in MJ-Zellen (Daten nicht gezeigt). Der Effekt von gB ist demnach nicht auf MHCII-Moleküle beschränkt. Die Internalisierung von Molekülen von der Zelloberfläche erfolgt über Clathrin-abhängige und unabhängige Mechanismen (Mayor S. und Pagano R. E., 2007). Während die Endozytose des Transferrinrezeptors (TfR) durch Clathrin vermittelt wird (van Dam E. M. und Stoorvogel W., 2002), erfolgt die Internalisierung der MHCII-Moleküle über Clathrin-abhängige und -unabhängige Mechanismen (Knorr R. *et al.*, 2009). MHCI-Moleküle werden gewöhnlich über Clathrin-unabhängige Endozytosemechanismen internalisiert (Naslowski N. *et al.*, 2003, Naslowski N. *et al.*, 2004). Da sich die gB-Expression auf alle drei Proteine (MHCI, MHCII, TfR) auswirkt, kann gB keinen spezifischen Einfluss auf Clathrin-abhängige oder -unabhängige Endozytosemechanismen ausüben. An der Endozytose von MHCII, MHCI und dem TfR ist die kleine GTPase Arf6 beteiligt. Arf6 gehört zur Arf-Familie der kleinen GTPasen, ist in Membrantransportprozesse involviert und wirkt an der Schnittstelle zwischen der Plasmamembran und den endosomalen Membranen (Gong Q. *et al.*, 2008). Sowohl Clathrin-abhängige (Krauss M. *et al.*, 2003), Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytoseprozesse (Donaldson J. G., 2003) sowie Exozytoseprozesse (D'Souza-Schorey C. und Chavrier P., 2006) werden über Arf6 reguliert. Es wäre daher möglich, dass gB über Arf6 die Oberflächenexpression von Molekülen beeinflusst. Arf6 ist in Exozytoseprozesse involviert und gB-exprimierende MJ-gB-Zellen sezernieren vermehrt MHCII und CD63 über Exosomen. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob auch Arf6-vermittelte Prozesse in die Exosomensekretion involviert sind.

4.3 Interaktion von gB mit MHCII-Molekülen

Sievers E. *et al.* (2002) und Neumann J. *et al.* (2003) hatten gezeigt, dass gB in transient transfizierten COS-7 Zellen und in einer HSV-1 infizierten B-Lymphomzelllinie (Jeshtom) mit MHCII-Molekülen assoziiert. Neumann J. *et al.* (2003) hatten zudem herausgefunden, dass gB-MHCII-Komplexe frei von Ii sind. Daraus wurde abgeleitet, dass in infizierten Zellen nur MHCII, MHCII-Ii- und MHCII-gB-Komplexe existieren, aber keine MHCII-Ii-gB-Komplexe. Die in dieser Arbeit erzielten Daten stimmen in diesen Punkten mit Neumann J. *et al.* (2003) und Sievers E. *et al.* (2002) überein. HSV-1 gB bindet auch in MJ-gB-Zellen an MHCII-Moleküle. Der daraus entstehende gB-MHCII-Komplex enthält ebenfalls keine invariante Kette. Ergänzend konnte nachgewiesen werden, dass der Grund dafür eine Konkurrenz von gB und Ii um die Bindung an MHCII-Moleküle ist. Die Analysen in dieser Arbeit legen zudem nahe, dass Ii eine höhere Affinität als gB für Klasse II-Moleküle hat, denn die Bindung von Ii verhindert eine gB-MHCII-Assoziation. Die Interaktion von Ii mit MHCII-Molekülen erfolgt im Wesentlichen über die Klasse II-Bindungssequenz (CBS), welche auch die CLIP-Sequenz enthält (Stern L. J. *et al.*, 1994; Siebenkotten I. M. *et al.*, 1998). Aufgrund der Konkurrenz von gB und Ii um die Bindung an MHCII-Moleküle kann man ableiten, dass gB ebenfalls die Peptidbindungsgrube der MHCII-Moleküle belegt. Da gB eine CBS-ähnliche Region besitzt, wurde schon früher postuliert, dass gB über die Peptidbindungsgrube an MHCII-Moleküle bindet (Sievers E. *et al.* (2002); s. Abschnitt 1.3). Mittels chimären Ii-gB-Konstrukten wurde gezeigt, dass über diese CBS-ähnliche Sequenz eine Bindung an MHCII-Moleküle erfolgen kann (Sievers E. *et al.*, 2002). Eine Bindung von gB an MHCII-Moleküle über die Peptidbindungsgrube wird auch dadurch unterstützt, dass gB-MHCII-Komplexe über den mAk L243 isoliert werden können. Der mAk L243 bindet spezifisch peptidbeladene MHCII-Moleküle. Die Reaktivität des mAk L243 mit gB-MHCII-Komplexen kann dadurch erklärt werden, dass gB über das DR1-Bindungsmotiv innerhalb der CBS-ähnlichen Region eine L243 reaktive Konformation unterstützt. Obwohl gB-MHCII-Komplexe von dem mAk L243 gebunden werden, besitzen die mit gB komplexierten MHCII-Moleküle aber keine SDS-stabile Konformation.

Die CBS-ähnliche Region ist möglicherweise nicht die einzige Bindungssequenz von gB an MHCII-Moleküle. Eine gB-Deletionsmutante, bei welcher die CBS-ähnliche Region deletiert wurde, konnte zumindest in transient transfizierten COS-7-Zellen an MHCII-Moleküle binden (Sievers E., 2001).

Neumann J. *et al.* (2003) hatten vermutet, dass gB analog zur invarianten Kette als Chaperon für Klasse II-Moleküle wirkt. Es wurde angenommen, dass gB-MHC Klasse II-Komplexe mit Hilfe von gB aus dem ER in den Golgi-Apparat transportiert werden, wo die Kohlenhydrate der DR-Moleküle zum komplexen Typ modifiziert werden. Vom Golgi-Apparat aus gelangen die gB-MHCII-Komplexe in ein nicht genau identifiziertes endosomales Kompartiment. In der hier vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass gB weder die Kohlenhydratreifung von HLA-DR noch von einem gemischten MHCII-Isotyp aus DR α und DPB1*0401 fördert. Im Gegensatz zu HLA-DR ist die Faltung dieses gemischten MHCII-Moleküls strikt von der Chaperonfunktion der Ii abhängig (Temme S. *et al.*, Manuskript in Bearbeitung). gB beeinflusst auch nicht die N-Glykane der MHCII-Moleküle in MJ-gB-Zellen. Zudem konnte hier gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Ii, gB-assoziierte MHCII-Moleküle nur mannosereiche N-Glykane besitzen (s. Abb. 3.3). Nur korrekt gefaltete MHCII-Moleküle verlassen gewöhnlich das ER (Cresswell P., 1994). Das Erlangen komplexer Glykanketten ist daher auch ein Zeichen für die richtige Tertiärstruktur des MHCII-Moleküls. In Abwesenheit

von Ii assoziiert gB vermutlich innerhalb des ER mit nicht vollständig gefalteten Klasse II-Molekülen, fördert aber nicht deren richtige Faltung und den Export aus dem ER. D.h. gB kann Ii als Chaperon für MHCII-Moleküle nicht ersetzen. Nicht ganz ausgeschlossen werden kann aber, dass gB-MHCII-Komplexe das ER verlassen, die N-Glykane aber nicht zum komplexen Typ modifiziert werden.

Anders ist die Situation in MJ-gB- und HSV-1 infizierten Jeshtom-Zellen. Die mit gB-assoziierten Klasse II-Moleküle infizierter- und der MJ-gB-Zellen besitzen N-Glykane des komplexen Typs. Dies zeigt, dass die MHCII-Moleküle korrekt gefaltet sind und in den Golgi-Apparat transportiert wurden. Ergänzend konnte mittels eines Puls-Markierungsversuches nachgewiesen werden, dass eine gB-MHCII-Interaktion erst 4-8 h nach Biosynthese von gB und der MHCII-Moleküle stattfindet. Das Auftreten von gB-MHCII-Komplexen korrelierte zudem mit dem proteolytischen Abbau von Ii. Dies stimmt mit der Annahme überein, dass gB nicht an Ii-assoziierte Klasse II-Moleküle bindet. Diese Daten werden von Untersuchungen von Pieters J. *et al.* (1991) über den intrazellulären Transport von MHCII-Ii-Komplexen in MJ-Zellen gestützt. Dort wurde gezeigt, dass MHCII-Moleküle eine Stunde nach Biosynthese komplexe N-Glykane erhalten und nach ca. 2 h Ii innerhalb der Endosomen vom C-Terminus her abgebaut wird. Allerdings bleiben Fragmente von Ii noch bis über 4 h nach Biosynthese mit MHCII-Molekülen assoziiert. Der Zeitpunkt der Interaktion von gB mit MHCII-Molekülen stimmt also mit dem Abbau von Ii und der Beladung der MHCII-Moleküle mit Peptiden überein. Die Tatsache, dass keine gB-MHCII-Komplexe auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnten, spricht dafür, dass gB innerhalb der MHCII-Beladungskompartimente an MHCII-Moleküle bindet und nicht auf der Zelloberfläche. Ein Vorkommen von gB-MHCII-Komplexen innerhalb der MIICs wird auch dadurch unterstützt, dass in MJ-gB-Zellen gB, MHCII und CD63 kolokalisieren. Das Tetraspannin CD63 ist neben MHCII-Molekülen einer der spezifischsten Marker für MIICs (Engering A. *et al.*, 2003). Der beste Beleg dafür, dass gB-MHCII-Komplexe in MIICs gelangen ist aber, dass gB-MHCII-Komplexe in Exosomen nachgewiesen werden konnten. MHCII-positive Exosomen werden durch Fusion der MIICs mit der Plasmamembran in den extrazellulären Raum freigesetzt (Raposo G. *et al.*, 1996). Zu welchem Zweck gB-MHCII-Komplexe über Exosomen sezerniert werden ist noch unklar. Möglich wäre, dass gB MHCII-Moleküle aus der Zelle entfernt, damit diese nicht mit HSV-Antigenen beladen werden können.

Exosomen dienen u.a. der Kommunikation zwischen Zellen und der Übertragung von MHC-Peptidkomplexen im Rahmen der Antigenpräsentation (Simons M. und Raposo G. *et al.*, 2009). Mit Peptid-beladene exosomale MHCII-Moleküle können entweder direkt CD4+-T-Zellen aktivieren (Muntasell A. *et al.*, 2007; Raposo G. *et al.*, 1996) oder nach Übertragung auf DCs die Stimulation von T-Zellen vermitteln (Thery C. *et al.*, 2002). Exosomen werden von Viren oder Tumoren auch dazu genutzt eine Immunantwort zu unterdrücken (Clayton A. und Mason M. D., 2009). HIV z.B. nutzt den exosomalen Weg, um HIV-spezifische T-Zellen zu infizieren (Izquierdo-Useros N. *et al.*, 2009; Wiley R. D. und Gummulurun S., 2006). EBV-infizierte B-Lymphomzellen setzen die immunsuppressiv-wirkenden Proteine LMP-1 und Galectin 9 über Exosomen frei (Keryer-Bibens C. *et al.*, 2006; Klibi J. *et al.*, 2009). Von Tumoren sezernierte Exosomen unterdrücken die Entwicklung von Dendritischen Zellen (Yu S. *et al.*, 2007), hemmen NK-Zellen (Liu C. *et al.*, 2006) oder induzieren in T-Zellen Apoptose (Andreola G. *et al.*, 2002). Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass gB über die Bindung an MHCII-Moleküle und die Sekretion der gB-MHCII-Komplexe über Exosomen in die Aktivierung von T-Zellen eingreift.

An welche MHCII-Moleküle innerhalb der MIICs könnte gB binden? In MIICs befinden sich li-assoziierte, leere-, CLIP- und peptidbeladene MHCII-Moleküle (pMHCII). Wie hier gezeigt wurde, schließt eine Assoziation von MHCII-Molekülen mit li die Bindung von gB an MHCII-Moleküle aus. Eine Bindung von gB an CLIP-beladene bzw. pMHCII-Moleküle ist nicht mit der Vorstellung vereinbar, dass gB die Peptidbindungsgrube belegt. Möglich wäre aber, dass gB niederaffin gebundene Peptide wie CLIP aus der Grube verdrängt. Problemlos sollte gB an leere MHCII-Moleküle binden können. Leere MHCII-Moleküle sind in MIICs aber wahrscheinlich nur sehr kurzlebig. MHCII-Moleküle werden nach der Proteolyse von li sehr schnell durch HLA-DM mit Peptiden beladen (van Niel *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass zusätzlich zu der Interaktion mit DR eine Assoziation von gB mit HLA-DM gezeigt wurde (Neumann J. *et al.*, 2003). HLA-DM interagiert mit MHCII-Molekülen und stabilisiert eine offene Konformation, wodurch CLIP bzw. ein niederaffines Peptidantigen freigesetzt wird (Cresswell P., 2003; Busch R. *et al.*, 2005). Über die Interaktion mit HLA-DM könnte gB daher Zugang zu leeren MHCII-Molekülen erlangen.

Welchen Einfluss besitzt gB auf die Beladung von MHCII-Molekülen? HSV-1 infizierte Jeshtom-Zellen zeigen einen verringerten Anteil SDS-stabiler MHCII-Moleküle (Neumann J. *et al.*, 2003). In MJ-gB-Zellen dagegen konnte kein Effekt der gB-Expression auf den Anteil SDS-stabiler MHCII-Moleküle nachgewiesen werden, obwohl gezeigt wurde, dass gB-assoziierte Klasse II-Moleküle nicht SDS-stabil sind. Eine Erklärung wäre, dass der Anteil gB-MHCII-Komplexe in MJ-gB-Zellen geringer als in HSV-1 infizierten Jeshtom-Zellen ist. Da die Menge an li in infizierten Jeshtom Zellen wesentlich kleiner als in MJ-gB-Zellen ist (Neumann J. *et al.*, 2003), könnte der Effekt auf die SDS-stabilen MHCII-Moleküle in HSV-1 infizierten Zellen deutlicher hervortreten. Denkbar wäre aber auch, dass noch andere virale Proteine die Peptidbeladung der MHCII-Moleküle beeinflussen, w.z.B. das US1-Genprodukt (Barcy S. und Corey L., 2001).

Was ist das Schicksal der gB-MHCII-Komplexe nach der Assoziation innerhalb der MIICs? Neumann J. *et al.* (2003) haben beobachtet, dass nach transienter Kotransfektion von gB und HLA-DR die subzelluläre Verteilung von DR-Molekülen verändert ist. In Anwesenheit von gB war die Kolo-kalisation von DR mit dem lysosomalen Marker Cathepsin B reduziert. Dies kann so interpretiert werden, dass gB den Transport der MHCII-Moleküle in die Lysosomen inhibiert. Immunfluoreszenzanalysen in dieser Arbeit legen nahe, dass gB-MHCII-Komplexe in vergrößerten CD63-positiven endosomalen Vesikeln vorhanden sind. In vielen Fällen geht das Phänomen von vergrößerten Endosomen mit einem verringerten Transport in Lysosomen einher (s. Abschnitt 4.1). In einem Puls-Markierungsversuch wurde nach Immunpräzipitation von gB beobachtet, dass die Signale der koi-solierten MHCII-Ketten bis zum 24 h-Wert stärker wurden. Dies deutet darauf hin, dass die gB-MHCII-Komplexe innerhalb dieser Zeit nicht in den Lysosomen abgebaut werden, sondern sich intrazellulär anhäufen. gB-MHCII-Komplexe konnten zudem aus Exosomen isoliert werden, deren Ursprungsort die MVEs sind, nicht aber die Lysosomen. Ob gB tatsächlich den Transport in die Lysosomen beeinflusst, wird derzeit untersucht.

Dass gB-MHCII-Komplexe zwar über Exosomen freigesetzt werden, aber nicht auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden können, ist ein Beleg dafür, dass gB über einen gezielten Sortierungsprozess den intrazellulären Transport der MHCII-Moleküle verändert.

gB-MHCII-Komplexe befinden sich daher im Gegensatz zu einzelnen gB bzw. den MHCII-Molekülen nur in den intraluminalen Vesikeln. Über welchen Mechanismus diese Sortierung

der gB-MHCII-Komplexe erfolgt ist noch unklar. Eine Ubiquitinmodifikation der MHCII-Moleküle ist dafür nicht verantwortlich. Ein anderer Weg wäre eine Assoziation des gB-MHCII-Komplexes mit Tetraspännigen wie CD63 oder CD82. Es gibt Hinweise, dass MHCII-Moleküle über eine Interaktion mit bestimmten Mikrodomänen und nicht durch Ubiquitylierung in Exosomen transportiert werden (Simons M. und Raposo G., 2009; Gavreau M. E. *et al.*, 2009).

4.4 Darstellung eines Modells über die Interaktion von gB und MHCII-Molekülen und der Sortierung von gB-MHCII-Komplexen in Exosomen

Ein Modell, das die in dieser Arbeit erzielten Daten schematisch zusammenfasst, ist in Abbildung 4.1 dargestellt. MHCII-Moleküle und gB verlassen getrennt voneinander das ER und gelangen über den Golgi-Apparat in die endosomalen Kompartimente. Dort wird Ii abgebaut, wodurch es möglich wird, dass gB an MHCII-Moleküle bindet. Da die Bindung von gB an MHCII-Moleküle über die Bindungsgrube erfolgt, handelt es sich um leere Klasse II-Moleküle. Auf unbekannte Weise verändert gB die Morphologie der Endosomen, was zur Ansammlung von gB und MHCII-Molekülen in MVEs führt. gB-MHCII-Komplexe werden innerhalb der vergrößerten endosomalen Kompartimente in die intraluminalen Vesikel sortiert. Nach der Fusion der MVEs mit der Plasmamembran werden gB-MHCII-Komplexe über Exosomen in den extrazellulären Raum sezerniert. Hierbei handelt es sich um einen neuen Mechanismus, wie gB vermutlich im Rahmen einer Immunevasionsstrategie von HSV-1 DR-Moleküle in Exosomen sortiert und auf diese Weise aus der Zelle freisetzt.

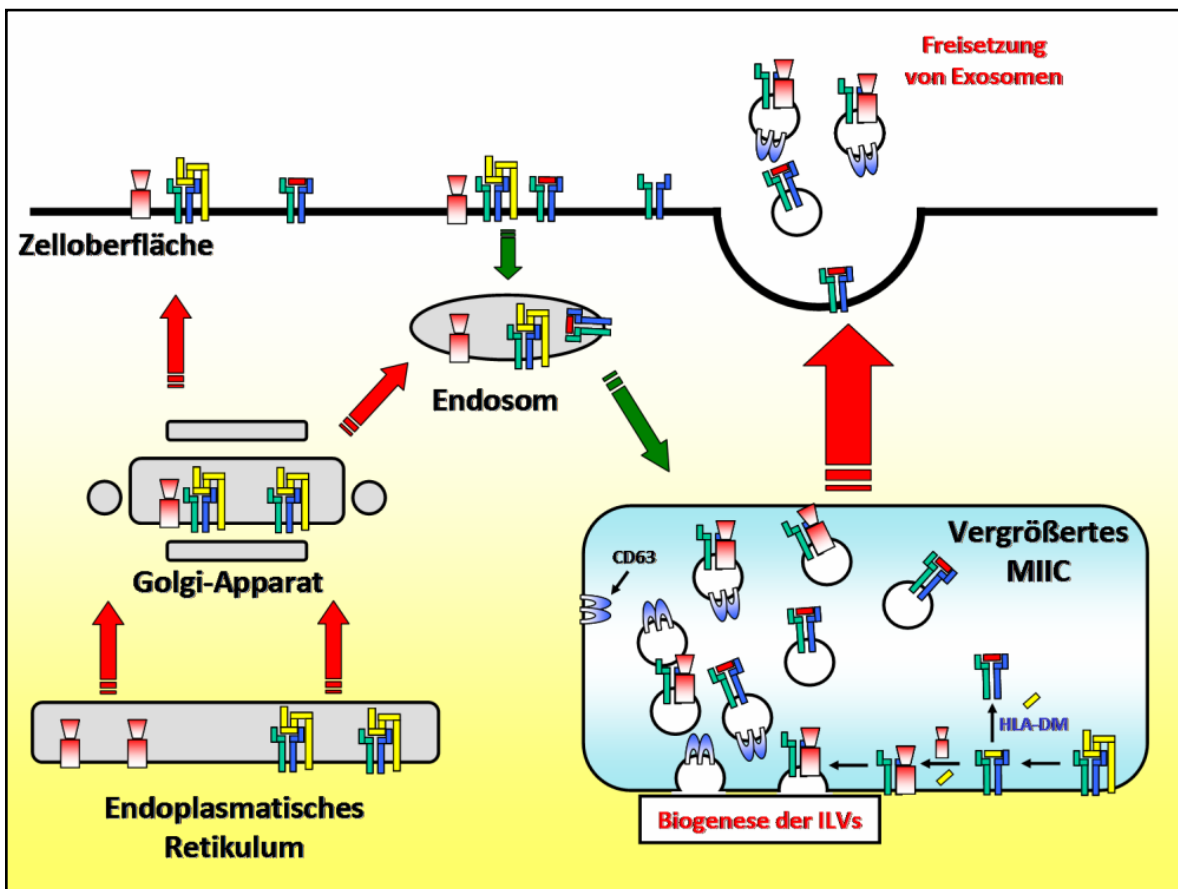


Abb. 4.1. Eingriff von gB in den intrazellulären Transport der MHCII-Moleküle

5. Zusammenfassung

Herpes-Simplex Virus Typ-1 (HSV-1) ist ein weltweit verbreitetes humanpathogenes Virus, welches nach der Primärinfektion lebenslang im Wirtsorganismus verbleibt. Die Persistenz von HSV-1 im Organismus wird durch Manipulation der Immunantwort erreicht. Das HSV-1 kodierte Hüllprotein Glykoprotein B (gB) ist an der Bindung und der Fusion des Virus mit der Zielzelle beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von gB auf den intrazellulären Transport und auf die intrazelluläre Verteilung von HLA-DR-Molekülen (DR) untersucht. Da HSV-1 ein lytisches Virus ist und infizierte Zellen nur eine kurze Lebensspanne haben, wurde eine humane Melanomzelllinie (MJ), welche DR und die invariante Kette (Ii) exprimiert, stabil mit gB transfiziert (MJ-gB). Mit Hilfe dieser Zellen konnte gezeigt werden, dass gB mit DR interagiert und dass Ii und gB um die Bindung an DR-Moleküle kompetieren. Da innerhalb des endoplasmatischen Retikulums (ER) ein Überschuss an Ii vorliegt, erfolgt die Assoziation von gB an DR nicht im ER, sondern erst nach Degradation von Ii in den MHC Klasse II-Beladungskompartimenten (MIICs). Im Gegensatz zu freien DR-Molekülen werden gB-assoziierte DR-Moleküle innerhalb der MIICs nicht mit hochaffinen Peptiden beladen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass MJ-gB-Zellen vergrößerte endosomale Kompartimente besitzen. Diese Kompartimente enthalten gB, DR-Moleküle und das Tetraspannin CD63, einen Marker für MIICs. Nach der Fusion der limitierenden Membran der MIICs mit der Plasmamembran werden DR-positive intraluminale Vesikel in den extrazellulären Raum freigesetzt. Aus diesen Vesikeln, die auch als Exosomen bezeichnet werden, konnten gB-MHCII-Komplexe isoliert werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass MJ-gB-Zellen insgesamt eine größere Menge an DR-Molekülen und CD63 über Exosomen freisetzen als MJ-Zellen. Ein Mechanismus für die Sortierung von Proteinen in MVEs bzw. Exosomen ist eine Modifikation mit Ubiquitin. Ubiquitinylierte Proteine konnten in den vergrößerten Kompartimenten der MJ-gB-Zellen nachgewiesen werden. Es wurde auch gezeigt, dass aus MJ-gB-Zellen isoliertes gB, nicht aber DR-Untereinheiten ubiquitinyliert sind. Aus diesen Daten kann folgendes Modell abgeleitet werden: In MJ-gB-Zellen verursacht gB eine Vergrößerung endosomaler Vesikel, in denen sich gB, DR, gB-DR-Komplexe, CD63 und ubiquitinylierte Proteine anhäufen. In diesen Kompartimenten werden gB-DR-Komplexe und CD63 in die intraluminale Vesikel sortiert, verbleiben aber nicht in der limitierenden Membran der MIICs, welche später mit der Plasmamembran fusioniert. Nach Fusion der MIICs mit der Zellmembran, werden gB-DR-Komplexe enthaltende Exosomen in den extrazellulären Raum freigesetzt. In dieser Arbeit wurde ein bisher unbekannter Weg der Immunevasion von HSV-1 entdeckt. Bei diesem gB-vermittelten Mechanismus werden DR-Moleküle durch gB gezielt in Exosomen sortiert und in das extrazelluläre Milieu freigesetzt.

6. Literaturverzeichnis

Abache, T., F. Le Naour, S. Planchon, F. Harper, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2007. The transferrin receptor and the tetraspanin web molecules CD9, CD81, and CD9P-1 are differentially sorted into exosomes after TPA treatment of K562 cells. *J.Cell Biochem.* 102:650-664.

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

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

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

Aoki, F. Y. 2001. Management of genital herpes in HIV-infected patients. *Herpes.* 8:41-45.

Arita, S., E. Baba, Y. Shibata, H. Niuro, S. Shimoda, T. Isobe, H. Kusaba, S. Nakano, and M. Harada. 2008. B cell activation regulates exosomal HLA production. *Eur.J.Immunol.* 38:1423-1434.

Arnautova, I., C. L. Jackson, O. S. Al Awar, J. G. Donaldson, and Y. P. Loh. 2003. Recycling of Raft-associated prohormone sorting receptor carboxypeptidase E requires interaction with ARF6. *Mol.Biol.Cell* 14:4448-4457.

Aubert, M., E. M. Krantz, and K. R. Jerome. 2006. Herpes simplex virus genes Us3, Us5, and Us12 differentially regulate cytotoxic T lymphocyte-induced cytotoxicity. *Viral Immunol.* 19:391-408.

Bakke, O. and B. Dobberstein. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63:707-716.

Barcy, S. and L. Corey. 2001. Herpes simplex inhibits the capacity of lymphoblastoid B cell lines to stimulate CD4+ T cells. *J.Immunol.* 166:6242-6249.

Barnstable, C. J., W. F. Bodmer, G. Brown, G. Galfre, C. Milstein, A. F. Williams, and A. Ziegler. 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* 14:9-20.

Beitia Ortiz, d. Z., I, K. Kaelin, and F. Rozenberg. 2004. Effects of mutations in the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B on intracellular transport and infectivity. *J.Virol.* 78:1540-1551.

Benaroch, P., M. Yilla, G. Raposo, K. Ito, K. Miwa, H. J. Geuze, and H. L. Ploegh. 1995. How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J.* 14:37-49.

Bieniasz, P. D. 2006. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344:55-63.

Bikoff, E. K., R. N. Germain, and E. J. Robertson. 1995. Allelic differences affecting invariant chain dependency of MHC class II subunit assembly. *Immunity.* 2:301-310.

Blanchard, N., D. Lankar, F. Faure, A. Regnault, C. Dumont, G. Raposo, and C. Hivroz. 2002. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J.Immunol.* 168:3235-3241.

Blum, J. S. and P. Cresswell. 1988. Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85:3975-3979.

- Boes, M., W. N. van der, V. Peperzak, Y. M. Kim, P. J. Peters, and H. Ploegh. 2005.** In vivo control of endosomal architecture by class II-associated invariant chain and cathepsin S. *Eur.J.Immunol.* 35:2552-2562.
- Bonner, W. M. and R. A. Laskey. 1974.** A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur.J.Biochem.* 46:83-88.
- Bright, N. A., M. R. Lindsay, A. Stewart, and J. P. Luzio. 2001.** The relationship between luminal and limiting membranes in swollen late endocytic compartments formed after wortmannin treatment or sucrose accumulation. *Traffic.* 2:631-642.
- Brown, Z. A., C. Gardella, A. Wald, R. A. Morrow, and L. Corey. 2005.** Genital herpes complicating pregnancy. *Obstet.Gynecol.* 106:845-856.
- Bryant, P. W., A. M. Lennon-Dumenil, E. Fiebigler, C. Lagaudriere-Gesbert, and H. L. Ploegh. 2002.** Proteolysis and antigen presentation by MHC class II molecules. *Adv.Immunol.* 80:71-114.
- Busch, R., I. Cloutier, R. P. Sekaly, and G. J. Hämmerling. 1996.** Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 15:418-428.
- Busch, R., C. H. Rinderknecht, S. Roh, A. W. Lee, J. J. Harding, T. Burster, T. M. Hornell, and E. D. Mellins. 2005.** Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression. *Immunol.Rev.* 207:242-260.
- Calistri, A., P. Sette, C. Salata, E. Cancellotti, C. Forghieri, A. Comin, H. Gottlinger, G. Campadelli-Fiume, G. Palu, and C. Parolin. 2007.** Intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies. *J.Virol.* 81:11468-11478.
- Campadelli-Fiume, G., M. Amasio, E. Avitabile, A. Cerretani, C. Forghieri, T. Gianni, and L. Menotti. 2007.** The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *Rev.Med.Virol.* 17:313-326.
- Charron, D. J. and H. O. McDevitt. 1980.** Characterization of HLA-D-region antigens by two-dimensional gel electrophoresis. *Molecular-genotyping. J.Exp.Med.* 152:18s-36s.
- Clayton, A., J. Court, H. Navabi, M. Adams, M. D. Mason, J. A. Hobot, G. R. Newman, and B. Jasani. 2001.** Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 247:163-174.
- Cresswell, P. 1994.** Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 12:259-293.
- Cresswell, P. 2003.** The Biochemistry and Cell Biology of Antigen Processing. In *Fundamental Immunology*. William E. Paul, ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA 19106 USA, pp. 613-629.
- Crump, C. M., C. Yates, and T. Minson. 2007.** Herpes simplex virus type 1 cytoplasmic envelopment requires functional Vps4. *J.Virol.* 81:7380-7387.
- D'Souza-Schorey, C. and P. Chavrier. 2006.** ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 7:347-358.
- Dargan, D. J., A. H. Patel, and J. H. Subak-Sharpe. 1995.** PREPs: herpes simplex virus type 1-specific particles produced by infected cells when viral DNA replication is blocked. *J.Virol.* 69:4924-4932.
- Davidson, H. W. 1999.** Direct transport of newly synthesized HLA-DR from the trans-Golgi network to major histocompatibility complex class II containing compartments (MIICS) demonstrated using a novel tyrosine-sulfated chimera. *J.Biol.Chem.* 274:27315-27322.

- De Gassart, A., V. Camosseto, J. Thibodeau, M. Ceppi, N. Catalan, P. Pierre, and E. Gatti. 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* 105:3491-3496.
- Denzin, L. K., J. L. Fallas, M. Prendes, and W. Yi. 2005.** Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused. *Immunol.Rev.* 207:279-292.
- Dugast, M., H. Toussaint, C. Dousset, and P. Benaroch. 2005.** AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *J.Biol.Chem.* 280:19656-19664.
- Eis-Hübinger, A. M., D. S. Schmidt, and K. E. Schneeweis. 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 (Pt 3):379-385.
- Engering, A. and J. Pieters. 2001.** Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells. *Int.Immunol.* 13:127-134.
- Engering, A., L. Kuhn, D. Fluitsma, E. Hoefsmit, and J. Pieters. 2003.** Differential post-translational modification of CD63 molecules during maturation of human dendritic cells. *Eur.J.Biochem.* 270:2412-2420.
- English, L., M. Chemali, J. Duron, C. Rondeau, A. Laplante, D. Gingras, D. Alexander, D. Leib, C. Norbury, R. Lippe, and M. Desjardins. 2009.** Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat.Immunol.* 10:480-487.
- Escola, J. M., M. J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, J. M. Griffith, O. Yoshie, and H. J. Geuze. 1998.** Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 273:20121-20127.
- Fang, Y., N. Wu, X. Gan, W. Yan, J. C. Morrell, and S. J. Gould. 2007.** Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS.Biol.* 5:e158.
- Fernandez-Borja, M., D. Verwoerd, F. Sanderson, H. Aerts, J. Trowsdale, A. Tulp, and J. Neefjes. 1996.** HLA-DM and MHC class II molecules co-distribute with peptidase-containing lysosomal subcompartments. *Int.Immunol.* 8:625-640.
- Fernandez-Borja, M., R. Wubbolts, J. Calafat, H. Janssen, N. Divecha, S. Dusseljee, and J. Neefjes. 1999.** Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Curr.Biol.* 9:55-58.
- Finlay, B. B. and G. McFadden. 2006.** Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* 124:767-782.
- Fisher, R. D., H. Y. Chung, Q. Zhai, H. Robinson, W. I. Sundquist, and C. P. Hill. 2007.** Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* 128:841-852.
- Flanagan, J., J. Middeldorp, and T. Sculley. 2003.** Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. *J.Gen.Virol.* 84:1871-1879.
- Friedman, H. M. 2003.** Immune evasion by herpes simplex virus type 1, strategies for virus survival. *Trans.Am.Clin.Climatol.Assoc.* 114:103-112.
- Fujimuro, M., H. Sawada, and H. Yokosawa. 1994.** Production and characterization of monoclonal antibodies specific to multi-ubiquitin chains of polyubiquitinated proteins. *FEBS Lett.* 349:173-180.

- Fujimuro, M. and H. Yokosawa. 2005.** Production of antipolyubiquitin monoclonal antibodies and their use for characterization and isolation of polyubiquitinated proteins. *Methods Enzymol.* 399:75-86.
- Futter, C. E., L. M. Collinson, J. M. Backer, and C. R. Hopkins. 2001.** Human VPS34 is required for internal vesicle formation within multivesicular endosomes. *J.Cell Biol.* 155:1251-1264.
- Gauvreau, M. E., M. H. Cote, M. C. Bourgeois-Daigneault, L. D. Rivard, F. Xiu, A. Brunet, A. Shaw, V. Steimle, and J. Thibodeau. 2009.** Sorting of MHC Class II Molecules into Exosomes through a Ubiquitin-Independent Pathway. *Traffic.* [Epub ahead of print].
- Geminard, C., F. Nault, R. M. Johnstone, and M. Vidal. 2001.** Characteristics of the interaction between Hsc70 and the transferrin receptor in exosomes released during reticulocyte maturation. *J.Biol.Chem.* 276:9910-9916.
- Germain, R. N. 1994.** MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76:287-299.
- Ghosh, P., M. Amaya, E. Mellins, and D. C. Wiley. 1995.** The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378:457-462.
- Gianni, T., L. Menotti, and G. Campadelli-Fiume. 2005.** A heptad repeat in herpes simplex virus 1 gH, located downstream of the alpha-helix with attributes of a fusion peptide, is critical for virus entry and fusion. *J.Virol.* 79:7042-7049.
- Gianni, T., P. L. Martelli, R. Casadio, and G. Campadelli-Fiume. 2005.** The ectodomain of herpes simplex virus glycoprotein H contains a membrane alpha-helix with attributes of an internal fusion peptide, positionally conserved in the herpesviridae family. *J.Virol.* 79:2931-2940.
- Gong, Q., C. Huntsman, and D. Ma. 2008.** Clathrin-independent internalization and recycling. *J.Cell Mol.Med.* 12:126-144.
- Gorvel, J. P., J. M. Escola, E. Stang, and O. Bakke. 1995.** Invariant chain induces a delayed transport from early to late endosomes. *J.Biol.Chem.* 270:2741-2746.
- Gottlinger, H. G., F. M. Lobo, T. W. Grimm, G. Riethmuller, and J. P. Johnson. 1988.** Biochemical characterization and tissue distribution of the Cora antigen, a cell surface glycoprotein differentially expressed on malignant and benign gastrointestinal epithelia. *Cancer Res.* 48:2198-2203.
- Hakulinen, J., L. Sankkila, N. Sugiyama, K. Lehti, and J. Keski-Oja. 2008.** Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes. *J.Cell Biochem.* 105:1211-1218.
- Hammond, C., L. K. Denzin, M. Pan, J. M. Griffith, H. J. Geuze, and P. Cresswell. 1998.** The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J.Immunol.* 161:3282-3291.
- Han, J. Y., D. D. Sloan, M. Aubert, S. A. Miller, C. H. Dang, and K. R. Jerome. 2007.** Apoptosis and antigen receptor function in T and B cells following exposure to herpes simplex virus. *Virology* 359:253-263.
- Hannah, B. P., E. E. Heldwein, F. C. Bender, G. H. Cohen, and R. J. Eisenberg. 2007.** Mutational evidence of internal fusion loops in herpes simplex virus glycoprotein B. *J.Virol.* 81:4858-4865.
- Hannah, B. P., T. M. Cairns, F. C. Bender, J. C. Whitbeck, H. Lou, R. J. Eisenberg, and G. H. Cohen. 2009.** Herpes simplex virus glycoprotein B associates with target membranes via its fusion loops. *J.Virol.* 83:6825-6836.

- Hastings, K. T., R. L. Lackman, and P. Cresswell. 2006.** Functional requirements for the lysosomal thiol reductase GILT in MHC class II-restricted antigen processing. *J.Immunol.* 177:8569-8577.
- Heldwein, E. E., H. Lou, F. C. Bender, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and S. C. Harrison. 2006.** Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313:217-220.
- Hitzel, C., U. Gruneberg, M. van Ham, J. Trowsdale, and N. Koch. 1999.** Sodium dodecyl sulfate-resistant HLA-DR "superdimer" bands are in some cases class II heterodimers bound to antibody. *J.Immunol.* 162:4671-4676.
- Hofmann, M. W., S. Honing, D. Rodionov, B. Dobberstein, K. von Figura, and O. Bakke. 1999.** The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J.Biol.Chem.* 274:36153-36158.
- Honey, K. and A. Y. Rudensky. 2003.** Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat.Rev.Immunol.* 3:472-482.
- Horejsi, V., M. Nemeč, P. Angelisova, H. Kristofova, J. C. Gorga, and I. Hilgert. 1986.** Characterization of seven new monoclonal antibodies against human DR, DR + DP and DQ1 + DQ3 antigens. *Tissue Antigens* 28:288-297.
- Hsing L. and A. Y. Rudensky. 2005.** The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunological Reviews* 207:229-241.
- Johansson, S. M., C. Admyre, A. Scheynius, and S. Gabrielsson. 2008.** Different types of in vitro generated human monocyte-derived dendritic cells release exosomes with distinct phenotypes. *Immunology* 123:491-499.
- Johnson, J. P., M. Demmer-Dieckmann, T. Meo, M. R. Hadam, and G. Riethmuller. 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.* 11:825-831.
- Keryer-Bibens, C., C. Pioche-Durieu, C. Villemant, S. Souquere, N. Nishi, M. Hirashima, J. Middeldorp, and P. Busson. 2006.** Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC.Cancer* 6:283.
- Kesimer, M., M. Scull, B. Brighton, G. DeMaria, K. Burns, W. O'Neal, R. J. Pickles, and J. K. Sheehan. 2009.** Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *FASEB J.* 23:1858-1868.
- Khanna, K. M., R. H. Bonneau, P. R. Kinchington, and R. L. Hendricks. 2003.** Herpes simplex virus-specific memory CD8+ T cells are selectively activated and retained in latently infected sensory ganglia. *Immunity.* 18:593-603.
- Klibi, J., T. Niki, A. Riedel, C. Pioche-Durieu, S. Souquere, E. Rubinstein, S. L. Moulec, J. Guigay, M. Hirashima, F. Guemira, D. Adhikary, J. Mautner, and P. Busson. 2009.** Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood* 113:1957-1966.
- Knorr, R., C. Karacsonyi, and R. Lindner. 2009.** Endocytosis of MHC molecules by distinct membrane rafts. *J.Cell Sci.* 122:1584-1594.
- Koch, N., A. D. McLellan, and J. Neumann. 2007.** A revised model for invariant chain-mediated assembly of MHC class II peptide receptors. *Trends Biochem.Sci.* 32:532-537.
- Koelle, D. M., L. Corey, R. L. Burke, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, R. Pichyangkura, and S. J. Triezenberg. 1994.** Antigenic specificities of human CD4+ T-cell clones recovered from recurrent genital herpes simplex virus type 2 lesions. *J.Virol.* 68:2803-2810.

- Koelle, D. M. and L. Corey. 2003.** Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. *Clin.Microbiol.Rev.* 16:96-113.
- Koelle, D. M. and L. Corey. 2008.** Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. *Annu.Rev.Med.* 59:381-395.
- Krauss, M., M. Kinuta, M. R. Wenk, P. De Camilli, K. Takei, and V. Haucke. 2003.** ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. *J.Cell Biol.* 162:113-124.
- Krummenacher, C., V. M. Supekar, J. C. Whitbeck, E. Lazear, S. A. Connolly, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, D. C. Wiley, and A. Carfi. 2005.** Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry. *EMBO J.* 24:4144-4153.
- Kurth, D., J. Neumann, K. Demleitner, J. Hildmann, M. Mehlig, C. Scheicher, U. Wendling, D. Sun, and K. Reske. 1997.** Full length cDNA of rat RT1.DMa and RT1.DMb and expression of RT1.DM genes in dendritic and Langerhans cells. *Biol.Chem.* 378:1005-1012.
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lagaudriere-Gesbert, C., S. L. Newmyer, T. F. Gregers, O. Bakke, and H. L. Ploegh. 2002.** Uncoating ATPase Hsc70 is recruited by invariant chain and controls the size of endocytic compartments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:1515-1520.
- Lakkaraju, A. and E. Rodriguez-Boulan. 2008.** Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol.* 18:199-209.
- Lampson, L. A. and R. Levy. 1980.** Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J.Immunol.* 125:293-299.
- Lanier, L. L., G. A. Gutman, D. E. Lewis, S. T. Griswold, and N. L. Warner. 1982.** Monoclonal antibodies against rat immunoglobulin kappa chains. *Hybridoma* 1:125-131.
- Lankar, D., H. Vincent-Schneider, V. Briken, T. Yokozeki, G. Raposo, and C. Bonnerot. 2002.** Dynamics of major histocompatibility complex class II compartments during B cell receptor-mediated cell activation. *J.Exp.Med.* 195:461-472.
- Lapaque, N., M. Jahnke, J. Trowsdale, and A. P. Kelly. 2009.** The HLA-DRalpha chain is modified by polyubiquitination. *J.Biol.Chem.* 284:7007-7016.
- Laquerre, S., R. Argnani, D. B. Anderson, S. Zucchini, R. Manservigi, and J. C. Glorioso. 1998.** Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *J.Virol.* 72:6119-6130.
- Lespagnol, A., D. Duflaut, C. Beekman, L. Blanc, G. Fiucci, J. C. Marine, M. Vidal, R. Amson, and A. Telerman. 2008.** Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. *Cell Death.Differ.* 15:1723-1733.
- Ljungman, P. 2001.** Prophylaxis against herpesvirus infections in transplant recipients. *Drugs* 61:187-196.
- Llorente, A., M. C. de Marco, and M. A. Alonso. 2004.** Caveolin-1 and MAL are located on prostasomes secreted by the prostate cancer PC-3 cell line. *J.Cell Sci.* 117:5343-5351.

- Lopez, C. and R. J. O'Reilly. 1977.** Cell-mediated immune responses in recurrent herpesvirus infections. I. Lymphocyte proliferation assay. *J.Immunol.* 118:895-902.
- Lubinski, J. M., M. Jiang, L. Hook, Y. Chang, C. Sarver, D. Mastellos, J. D. Lambris, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and H. M. Friedman. 2002.** Herpes simplex virus type 1 evades the effects of antibody and complement in vivo. *J.Virol.* 76:9232-9241.
- Manickan, E. and B. T. Rouse. 1995.** Roles of different T-cell subsets in control of herpes simplex virus infection determined by using T-cell-deficient mouse-models. *J.Virol.* 69:8178-8179.
- Marks, M. S., R. N. Germain, and J. S. Bonifacino. 1995.** Transient aggregation of major histocompatibility complex class II chains during assembly in normal spleen cells. *J.Biol.Chem.* 270:10475-10481.
- Martin-Serrano, J. 2007.** The role of ubiquitin in retroviral egress. *Traffic.* 8:1297-1303.
- Matsuo, H., J. Chevallier, N. Mayran, B. Le, I, C. Ferguson, J. Faure, N. S. Blanc, S. Matile, J. Dubochet, R. Sadoul, R. G. Parton, F. Vilbois, and J. Gruenberg. 2004.** Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303:531-534.
- Mayor, S. and R. E. Pagano. 2007.** Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8:603-612.
- McCormick, P. J., J. A. Martina, and J. S. Bonifacino. 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* 102:7910-7915.
- McGill, S. N. and R. C. Cartotto. 2000.** Herpes simplex virus infection in a paediatric burn patient: case report and review. *Burns* 26:194-199.
- McGrath, B. J. and C. L. Newman. 1994.** Genital herpes simplex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacotherapy* 14:529-542.
- McLellan, A. D. 2009.** Exosome release by primary B cells. *Crit Rev.Immunol.* 29:203-217.
- Mettenleiter, T. C. 2002.** Herpesvirus assembly and egress. *J.Virol.* 76:1537-1547.
- Mettenleiter, T. C. 2004.** Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 106:167-180.
- Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow. 2006.** Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr.Opin.Microbiol.* 9:423-429.
- Mettenleiter, T. C. 2006.** Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet.Microbiol.* 113:163-169.
- Mikloska, Z. and A. L. Cunningham. 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):353-361.
- Mikloska, Z., P. P. Sanna, and A. L. Cunningham. 1999.** Neutralizing antibodies inhibit axonal spread of herpes simplex virus type 1 to epidermal cells in vitro. *J.Virol.* 73:5934-5944.
- Miyazaki, T., P. Wolf, S. Tourne, C. Waltzinger, A. Dierich, N. Barois, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis. 1996.** Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* 84:531-541.

- Mogensen, T. H., J. Melchjorsen, L. Malmgaard, A. Casola, and S. R. Paludan. 2004.** Suppression of proinflammatory cytokine expression by herpes simplex virus type 1. *J.Virol.* 78:5883-5890.
- Mori, Y., M. Koike, E. Moriishi, A. Kawabata, H. Tang, H. Oyaizu, Y. Uchiyama, and K. Yamanishi. 2008.** Human herpesvirus-6 induces MVB formation, and virus egress occurs by an exosomal release pathway. *Traffic.* 9:1728-1742.
- Morton, E. R. and J. A. Blaho. 2007.** Herpes simplex virus blocks Fas-mediated apoptosis independent of viral activation of NF-kappaB in human epithelial HEp-2 cells. *J.Interferon Cytokine Res.* 27:365-376.
- Moser M. 2003. Dendritic Cells.** In *Fundamental Immunology.* William E.Paul, ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 455-480.
- Mueller, S. N., C. M. Jones, W. Chen, Y. Kawaoka, M. R. Castrucci, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 2003.** The early expression of glycoprotein B from herpes simplex virus can be detected by antigen-specific CD8+ T cells. *J.Virol.* 77:2445-2451.
- Muntasell, A., A. C. Berger, and P. A. Roche. 2007.** T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *EMBO J.* 26:4263-4272.
- Murk, J. L., W. Stoorvogel, M. J. Kleijmeer, and H. J. Geuze. 2002.** The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation. *Semin.Cell Dev.Biol.* 13:303-311.
- Nash, A. A., A. Jayasuriya, J. Phelan, S. P. Cobbold, H. Waldmann, and T. Prospero. 1987.** Different roles for L3T4+ and Lyt 2+ T cell subsets in the control of an acute herpes simplex virus infection of the skin and nervous system. *J.Gen.Virol.* 68:825-833.
- Naslavsky, N., R. Weigert, and J. G. Donaldson. 2003.** Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Mol.Biol.Cell* 14:417-431.
- Naslavsky, N., R. Weigert, and J. G. Donaldson. 2004.** Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol.Biol.Cell* 15:3542-3552.
- Natarajan, S. K., M. Assadi, and S. Sadegh-Nasseri. 1999.** Stable peptide binding to MHC class II molecule is rapid and is determined by a receptive conformation shaped by prior association with low affinity peptides. *J.Immunol.* 162:4030-4036.
- Neumann, J., A. M. Eis-Hübinger, and N. Koch. 2003.** Herpes simplex virus type 1 targets the MHC class II processing pathway for immune evasion. *J.Immunol.* 171:3075-3083.
- Neumann, J. and N. Koch. 2005.** Assembly of major histocompatibility complex class II subunits with invariant chain. *FEBS Lett.* 579:6055-6059.
- Neumann, J. 2005.** Novel antibody tags from the rat lysosomal protein RT1.DM for immunodetection of recombinant proteins. *J.Immunol.Methods* 301:66-76.
- Nickerson, D. P., M. R. Russell, and G. Odorizzi. 2007.** A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting. *EMBO Rep.* 8:644-650.
- Norais, N., D. Tang, S. Kaur, S. H. Chamberlain, F. R. Masiarz, R. L. Burke, and F. Marcus. 1996.** Disulfide bonds of herpes simplex virus type 2 glycoprotein gB. *J.Virol.* 70:7379-7387.
- Novak, N. and W. M. Peng. 2005.** Dancing with the enemy: the interplay of herpes simplex virus with dendritic cells. *Clin.Exp.Immunol.* 142:405-410.

- Ohmura-Hoshino, M., Y. Matsuki, M. Aoki, E. Goto, M. Mito, M. Uematsu, T. Kakiuchi, H. Hotta, and S. Ishido. 2006.** Inhibition of MHC class II expression and immune responses by c-MIR. *J.Immunol.* 177:341-354.
- Pasieka, T. J., T. Baas, V. S. Carter, S. C. Proll, M. G. Katze, and D. A. Leib. 2006.** Functional genomic analysis of herpes simplex virus type 1 counteraction of the host innate response. *J.Virol.* 80:7600-7612.
- Peake, M. L., P. Nystrom, and L. I. Pizer. 1982.** Herpesvirus glycoprotein synthesis and insertion into plasma membranes. *J.Virol.* 42:678-690.
- Pederson, N. E., S. Person, and F. L. Homa. 1992.** Analysis of the gB promoter of herpes simplex virus type 1: high-level expression requires both an 89-base-pair promoter fragment and a nontranslated leader sequence. *J.Virol.* 66:6226-6232.
- Pelchen-Matthews, A., G. Raposo, and M. Marsh. 2004.** Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol.* 12:310-316.
- Pereira, L., D. Dondero, B. Norrild, and B. Roizman. 1981.** Differential immunologic reactivity and processing of glycoproteins gA and gB of herpes simplex virus types 1 and 2 made in Vero and HEp-2 cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78:5202-5206.
- Pesando, J. M. and L. Graf. 1986.** Differential expression of HLA-DR, -DQ, and -DP antigens on malignant B cells. *J.Immunol.* 136:4311-4318.
- Pieters, J., H. Horstmann, O. Bakke, G. Griffiths, and J. Lipp. 1991.** Intracellular transport and localization of major histocompatibility complex class II molecules and associated invariant chain. *J.Cell Biol.* 115:1213-1223.
- Pieters, J., O. Bakke, and B. Dobberstein. 1993.** The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J.Cell Sci.* 106:831-846.
- Piper, R. C. and D. J. Katzmann. 2007.** Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 23:519-547.
- Pollara, G., D. R. Katz, and B. M. Chain. 2004.** The host response to herpes simplex virus infection. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 17:199-203.
- Pols, M. S. and J. Klumperman. 2009.** Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp.Cell Res.* 315:1584-1592.
- Pornillos, O., J. E. Garrus, and W. I. Sundquist. 2002.** Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol.* 12:569-579.
- PULVERTAFT, J. V. 1964.** CYTOLOGY OF BURKITT'S TUMOUR (AFRICAN LYMPHOMA). *Lancet* 1:238-240.
- Quaranta, V., O. Majdic, G. Stingl, K. Liszka, H. Honigsmann, and W. Knapp. 1984.** A human Ia cytoplasmic determinant located on multiple forms of invariant chain (gamma, gamma 2, gamma 3). *J.Immunol.* 132:1900-1905.
- Rafield, L. F. and D. M. Knipe. 1984.** Characterization of the major mRNAs transcribed from the genes for glycoprotein B and DNA-binding protein ICP8 of herpes simplex virus type 1. *J.Virol.* 49:960-969.
- Raftery, M. J., F. Winau, S. H. Kaufmann, U. E. Schaible, and G. Schonrich. 2006.** CD1 antigen presentation by human dendritic cells as a target for herpes simplex virus immune evasion. *J.Immunol.* 177:6207-6214.

- Rajasagi, N. K., S. H. Kassim, C. M. Kollias, X. Zhao, R. Chervenak, and S. R. Jennings. 2009.** CD4+ T cells are required for the priming of CD8+ T cells following infection with herpes simplex virus type 1. *J.Virol.* 83:5256-5268.
- Ramm, G., L. Pond, C. Watts, and W. Stoorvogel. 2000.** Clathrin-coated lattices and buds on MHC class II compartments do not selectively recruit mature MHC-II. *J.Cell Sci.* 113:303-313.
- Rammensee, H. G., T. Friede, and S. Stevanoviic. 1995.** MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41:178-228.
- Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief, and H. J. Geuze. 1996.** B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J.Exp.Med.* 183:1161-1172.
- Rice, S. A. and D. M. Knipe. 1988.** Gene-specific transactivation by herpes simplex virus type 1 alpha protein ICP27. *J.Virol.* 62:3814-3823.
- Rixon, F. J., C. Addison, and J. McLauchlan. 1992.** Assembly of enveloped tegument structures (L particles) can occur independently of virion maturation in herpes simplex virus type 1-infected cells. *J.Gen.Virol.* 73:277-284.
- Robinson, J. H. and A. A. Delvig. 2002.** Diversity in MHC class II antigen presentation. *Immunology* 105:252-262.
- Rocha, N. and J. Neefjes. 2008.** MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. *EMBO J.* 27:1-5.
- Roche, P. A., C. L. Teletski, E. Stang, O. Bakke, and E. O. Long. 1993.** Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:8581-8585.
- Rohn, T. A., M. Boes, D. Wolters, S. Spindeldreher, B. Muller, H. Langen, H. Ploegh, A. B. Vogt, and H. Kropshofer. 2004.** Upregulation of the CLIP self peptide on mature dendritic cells antagonizes T helper type 1 polarization. *Nat.Immunol.* 5:909-918.
- Romagnoli, P., C. Layet, J. Yewdell, O. Bakke, and R. N. Germain. 1993.** Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *J.Exp.Med.* 177:583-596.
- Romagnoli, P. and R. N. Germain. 1994.** The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J.Exp.Med.* 180:1107-1113.
- Satoh, T., J. Aii, T. Suenaga, J. Wang, A. Kogure, J. Uehori, N. Arase, I. Shiratori, S. Tanaka, Y. Kawaguchi, P. G. Spear, L. L. Lanier, and H. Arase. 2008.** PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell* 132:935-944.
- Sattentau, Q. 2008.** Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat.Rev.Microbiol.* 6:815-826.
- Saunderson, S. C., P. C. Schuberth, A. C. Dunn, L. Miller, B. D. Hock, P. A. MacKay, N. Koch, R. W. Jack, and A. D. McLellan. 2008.** Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. *J.Immunol.* 180:8146-8152.
- Schaiff, W. T., K. A. Hruska, Jr., C. Bono, S. Shuman, and B. D. Schwartz. 1991.** Invariant chain influences post-translational processing of HLA-DR molecules. *J.Immunol.* 147:603-608.
- Schlossman, D. M., S. L. Schmid, W. A. Braell, and J. E. Rothman. 1984.** An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J.Cell Biol.* 99:723-733.

- Sedy, J. R., P. G. Spear, and C. F. Ware. 2008.** Cross-regulation between herpesviruses and the TNF superfamily members. *Nat.Rev.Immunol.* 8:861-873.
- Sette, A., S. Southwood, J. Miller, and E. Appella. 1995.** Binding of major histocompatibility complex class II to the invariant chain-derived peptide, CLIP, is regulated by allelic polymorphism in class II. *J.Exp.Med.* 181:677-683.
- Shackelford, D. A. and J. L. Strominger. 1983.** Analysis of the oligosaccharides on the HLA-DR and DC1 B cell antigens. *J.Immunol.* 130:274-282.
- Shim, J. H., C. Xiao, M. S. Hayden, K. Y. Lee, E. S. Trombetta, M. Pypaert, A. Nara, T. Yoshimori, B. Wilm, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, B. L. Hogan, I. Mellman, and S. Ghosh. 2006.** CHMP5 is essential for late endosome function and down-regulation of receptor signaling during mouse embryogenesis. *J.Cell Biol.* 172:1045-1056.
- Shin, J. S., M. Ebersold, M. Pypaert, L. Delamarre, A. Hartley, and I. Mellman. 2006.** Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature* 444:115-118.
- Shukla, D. and P. G. Spear. 2001.** Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J.Clin.Invest* 108:503-510.
- Siebenkotten, I. M., C. Carstens, and N. Koch. 1998.** Identification of a sequence that mediates promiscuous binding of invariant chain to MHC class II allotypes. *J.Immunol.* 160:3355-3362.
- Siegel, F. P., C. Lopez, G. S. Hammer, A. E. Brown, S. J. Kornfeld, J. Gold, J. Hassett, S. Z. Hirschman, C. Cunningham-Rundles, and B. R. Adelsberg. 1981.** Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N.Engl.J.Med.* 305:1439-1444.
- Sievers, E., J. Neumann, M. Raftery, G. Schonrich, A. M. Eis-Hübinger, and N. Koch. 2002.** Glycoprotein B from strain 17 of herpes simplex virus type 1 contains an invariant chain homologous sequence that binds to MHC class II molecules. *Immunology* 107:129-135.
- Sievers, E. 2002.** Assoziation von Herpes Simplex Virus Typ 1 Glykoprotein B und MHC Klasse II-Molekülen. Dissertation, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Simhadri, V. R., K. S. Reiners, H. P. Hansen, D. Topolar, V. L. Simhadri, K. Nohroudi, T. A. Kufer, A. Engert, and v. S. Pogge. 2008.** Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS.One.* 3:e3377.
- Simons, M. and G. Raposo. 2009.** Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. *Curr.Opin.Cell Biol.* [Epub ahead of print].
- Simonsen, A., E. Stang, B. Bremnes, M. Roe, K. Prydz, and O. Bakke. 1997.** Sorting of MHC class II molecules and the associated invariant chain (Ii) in polarized MDCK cells. *J.Cell Sci.* 110:597-609.
- Slifkin, M., S. Doron, and D. R. Snyderman. 2004.** Viral prophylaxis in organ transplant patients. *Drugs* 64:2763-2792.
- Smith, C. M., N. S. Wilson, J. Waithman, J. A. Villadangos, F. R. Carbone, W. R. Heath, and G. T. Belz. 2004.** Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat.Immunol.* 5:1143-1148.
- Southern, J. A., D. F. Young, F. Heaney, W. K. Baumgartner, and R. E. Randall. 1991.** Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. *J.Gen.Virol.* 72 (Pt 7):1551-1557.
- Spear, P. G. 2004.** Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol.* 6:401-410.

- Springer, T. A., J. F. Kaufman, C. Terhorst, and J. L. Strominger. 1977.** Purification and structural characterisation of human HLA-linked B-cell antigens. *Nature* 268:213-218.
- Stern, L. J., J. H. Brown, T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, R. G. Urban, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1994.** Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215-221.
- Stern, L. J., I. Potolicchio, and L. Santambrogio. 2006.** MHC class II compartment subtypes: structure and function. *Curr.Opin.Immunol.* 18:64-69.
- Stumptner-Cuvelette, P. and P. Benaroch. 2002.** Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochim.Biophys.Acta* 1542:1-13.
- Stumptner-Cuvelette, P., M. Jouve, J. Helft, M. Dugast, A. S. Glouzman, K. Jooss, G. Raposo, and P. Benaroch. 2003.** Human immunodeficiency virus-1 Nef expression induces intracellular accumulation of multivesicular bodies and major histocompatibility complex class II complexes: potential role of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol.Biol.Cell* 14:4857-4870.
- Szilagyi, J. F. and C. Cunningham. 1991.** Identification and characterization of a novel non-infectious herpes simplex virus-related particle. *J.Gen.Virol.* 72:661-668.
- Tan, H. H. and C. L. Goh. 2006.** Viral infections affecting the skin in organ transplant recipients: epidemiology and current management strategies. *Am.J.Clin.Dermatol.* 7:13-29.
- Temponi, M., U. Kekish, C. V. Hamby, H. Nielsen, C. C. Marboe, and S. Ferrone. 1993.** Characterization of anti-HLA class II monoclonal antibody LGII-612.14 reacting with formalin fixed tissues. *J.Immunol.Methods* 161:239-256.
- Theodoridis, A. A., A. T. Prechtel, N. M. Turza, M. Zenke, and A. Steinkasserer. 2007.** Infection of human dendritic cells with herpes simplex virus type 1 dramatically diminishes the mRNA levels of the prostaglandin E(2) receptors EP2 and EP4. *Immunobiology* 212:827-838.
- They, C., A. Regnault, J. Garin, J. Wolfers, L. Zitvogel, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, and S. Amigorena. 1999.** Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J.Cell Biol.* 147:599-610.
- They, C., M. Boussac, P. Veron, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, J. Garin, and S. Amigorena. 2001.** Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J.Immunol.* 166:7309-7318.
- They, C., L. Duban, E. Segura, P. Veron, O. Lantz, and S. Amigorena. 2002.** Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat.Immunol.* 3:1156-1162.
- They, C., S. Amigorena, G. Raposo, and A. Clayton. 2006.** Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3: Unit 3.22.
- Tigges, M. A., D. Koelle, K. Hartog, R. E. Sekulovich, L. Corey, and R. L. Burke. 1992.** Human CD8+ herpes simplex virus-specific cytotoxic T-lymphocyte clones recognize diverse virion protein antigens. *J.Virol.* 66:1622-1634.
- Trajkovic, K., C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwillle, B. Brugger, and M. Simons. 2008.** Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319:1244-1247.
- Trgovcich, J., D. Johnson, and B. Roizman. 2002.** Cell surface major histocompatibility complex class II proteins are regulated by the products of the gamma(1)34.5 and U(L)41 genes of herpes simplex virus 1. *J.Virol.* 76:6974-6986.

- Tulp, A., D. Verwoerd, B. Dobberstein, H. L. Ploegh, and J. Pieters. 1994.** Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature* 369:120-126.
- van Dam, E. M. and W. Stoorvogel. 2002.** Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles. *Mol.Biol.Cell* 13:169-182.
- van Ham, S. M., E. P. Tjin, B. F. Lillemeier, U. Gruneberg, K. E. van Meijgaarden, L. Pastoors, D. Verwoerd, A. Tulp, B. Canas, D. Rahman, T. H. Ottenhoff, D. J. Pappin, J. Trowsdale, and J. Neefjes. 1997.** HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr.Biol.* 7:950-957.
- van Niel, G., R. Wubbolts, T. Ten Broeke, S. I. Buschow, F. A. Ossendorp, C. J. Melief, G. Raposo, B. W. van Balkom, and W. Stoorvogel. 2006.** Dendritic cells regulate exposure of MHC class II at their plasma membrane by oligoubiquitination. *Immunity.* 25:885-894.
- Vega, M. A. and J. L. Strominger. 1989.** Constitutive endocytosis of HLA class I antigens requires a specific portion of the intracytoplasmic tail that shares structural features with other endocytosed molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:2688-2692.
- Verreck, F. A., C. A. Fargeas, and G. J. Hammerling. 2001.** Conformational alterations during biosynthesis of HLA-DR3 molecules controlled by invariant chain and HLA-DM. *Eur.J.Immunol.* 31:1029-1036.
- Viville, S., J. Neefjes, V. Lotteau, A. Dierich, M. Lemeur, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis. 1993.** Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72:635-648.
- Vogt, A. B., S. Spindeldreher, and H. Kropshofer. 2002.** Clustering of MHC-peptide complexes prior to their engagement in the immunological synapse: lipid raft and tetraspan microdomains. *Immunol.Rev.* 189:136-151.
- Vyas, J. M., A. G. Van der Veen, and H. L. Ploegh. 2008.** The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat.Rev.Immunol.* 8:607-618.
- Walker, J. D., C. L. Maier, and J. S. Pober. 2009.** Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing antigenic exosomes. *J.Immunol.* 182:1548-1559.
- Wang, K., P. A. Peterson, and L. Karlsson. 1997.** Decreased endosomal delivery of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes in dynamin-deficient cells. *J.Biol.Chem.* 272:17055-17060.
- Ward, D. M., M. B. Vaughn, S. L. Shiflett, P. L. White, A. L. Pollock, J. Hill, R. Schnegelberger, W. I. Sundquist, and J. Kaplan. 2005.** The role of LIP5 and CHMP5 in multivesicular body formation and HIV-1 budding in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* 280:10548-10555.
- Watanabe, M., T. Suzuki, M. Taniguchi, and N. Shinohara. 1983.** Monoclonal anti-Ia murine alloantibodies crossreactive with the Ia-homologues of other mammalian species including humans. *Transplantation* 36:712-718.
- Whitley, R. J. and R. L. Miller. 2001.** Immunologic approach to herpes simplex virus. *Viral Immunol.* 14:111-118.
- Whitley, R. J. 2006.** Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res.* 71:141-148.
- Wiley, R. D. and S. Gummuluru. 2006.** Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103:738-743.
- Williams, R. L. and S. Urbe. 2007.** The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8:355-368.

Wraight, C. J., P. van Endert, P. Moller, J. Lipp, N. R. Ling, I. C. MacLennan, N. Koch, and G. Moldenhauer. 1990. Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface. *J.Biol.Chem.* 265:5787-5792.

Wubbolts, R., M. Fernandez-Borja, L. Oomen, D. Verwoerd, H. Janssen, J. Calafat, A. Tulp, S. Dusseljee, and J. Neefjes. 1996. Direct vesicular transport of MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface. *J.Cell Biol.* 135:611-622.

Wubbolts, R. and J. Neefjes. 1999. Intracellular transport and peptide loading of MHC class II molecules: regulation by chaperones and motors. *Immunol.Rev.* 172:189-208.

Yuan, W., A. Dasgupta, and P. Cresswell. 2006. Herpes simplex virus evades natural killer T cell recognition by suppressing CD1d recycling. *Nat.Immunol.* 7:835-842.

Yuhasz, S. A. and J. G. Stevens. 1993. Glycoprotein B is a specific determinant of herpes simplex virus type 1 neuroinvasiveness. *J.Virol.* 67:5948-5954.

Zachgo, S., B. Dobberstein, and G. Griffiths. 1992. A block in degradation of MHC class II-associated invariant chain correlates with a reduction in transport from endosome carrier vesicles to the prelysosome compartment. *J.Cell Sci.* 103:811-822.

7. Abkürzungsverzeichnis

A

aa	Aminosäure („amino acid“)
A	Ampere
A	Purinbase Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat

B

bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (BSA, „bovine serum albumin“)
bzw.	beziehungsweise

C

C	Pyrimidinbase Cytosin
CLIP	Class II Invariant Chain Peptide
°C	Grad Celsius
c	zenti

D

d	desoxy
Da	Dalton ($1D = 1,66 \times 10^{-24} \text{ g}$)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol

DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
------	----------------------------------

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNA, „desoxyribonucleic acid“)
DTT	1,4-Dithiotreitol

E

EBV	Epstein Barr Virus
ECL	verstärkte Chemilumineszenz („enhanced chemiluminescence“)

<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
<i>et al.</i>	und andere („et alteri“)

F

FCS	Fötale Kälberserum (FCS, „fetal calf serum“)
-----	--

G

g	Gramm
G	Purinbase Guanin
gB	Glykoprotein B
gD	Glykoprotein D
gH	Glykoprotein H
gM	Glykoprotein M
GTP	Guanosintriphosphat

H

h	Stunde
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
H ₂ O	Wasser
HHV	Humanes Herpes Virus
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSV	Herpes Simplex Virus

I

ILV	Intraluminale Vesikel
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

K

k	kilo
kb	Kilobasen

L

l	Liter
LB	Luria Bertani

M

M	Molarität
m	Meter
μ-	mikro (1×10^{-6})
m-	milli (1×10^{-3})
MIIC	MHC Klasse II Beladungskompartiment
min	Minute
MOI	Infektionsmultiplizität (MOI, „multiplicity of infection“)
MVE	Multivesikuläres Endosom

N

n	nano (1×10^{-9})
NP40	Nonidet-40
N-Terminus	Aminotermiales Ende von Proteinen
NTP	Nukleosidtriphosphat

7. Abkürzungsverzeichnis

O		ü.N.	über Nacht
OD	optische Dichte	UV	Ultraviolett
P		V	
p	piko (1 x 10 ⁻¹²)	V	Volt
PAGE	Polyacrylamid- gelelektrophorese	v	Volumen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate- buffered saline“)	vgl. [v/v]	Vergleiche Volumen/Volumen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)	W w wt [w/v]	Gewicht („weight“) Wildtyp Gewicht/Volumen
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoff- ionenkonzentration	X, Y, Z x g	Erdbeschleunigung = 9,80665 m x s ⁻¹
pMHCII	Peptid-beladene MHCII- Moleküle	z.B.	zum Beispiel
R			
RT	Raumtemperatur		
S			
s	Sekunde		
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecylsulfate“)		
SV40	Affenvirus 40 („simian virus 40“)		
ST	Tris-gepufferte Salzlösung („Saline-Tris“)		
T			
T	Pyrimidinbase Thymidin		
Tab.	Tabelle		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>		
TCA	Trichloressigsäure		
TEMED	Tetramethyldiamin		
TfR	Transferrin-Rezeptor		
Tris	Tris-hydroxymethyl- aminomethan		
Tween	Polyoxyethylen- sorbitanmonolaurat		
U			
U	Einheit der Enzymaktivität („unit“)		
u.a.	unter anderem		