

**Analyse molekularer Mechanismen  
der Immundominanz MHC Klasse I-präsentierter  
Antigene bei Humaner Cytomegalovirus-Infektion**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie der  
Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

**Nadine Frankenberg**

geboren in Biedenkopf

Mainz, 2002

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 2002

meinen Eltern

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,  
dass die Dinge so sind, wie sie sind.

Aristoteles (384-322 v. Chr.)



## Zusammenfassung

Das Humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein Erreger von großer klinischer Relevanz. Infektionen mit diesem Virus sind insbesondere bei immunsupprimierten Patienten mit hoher Morbidität und Mortalität assoziiert. Die HCMV-Infektion wird vorwiegend durch CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) kontrolliert. Obwohl das Virus für mehr als 200 Proteine kodiert, stellen nur wenige davon CTL-Zielstrukturen dar. Das Tegumentprotein pp65 und das nicht-strukturelle *immediate early 1*-Protein (IE1) waren als die dominanten CTL-Antigene bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die zur Immundominanz des pp65 führenden molekularen Mechanismen aufzuklären und die Grundlagen für die Analyse der IE1-spezifischen Immunantwort zu erarbeiten. Im Rahmen dieser Untersuchungen gelang es, durch Peptidimmunisierung HLA-A2-transgener Mäuse hochaffine pp65-spezifische CTL-Klone zu generieren. Für die Generierung ähnlicher CTL-Klone gegen IE1 konnte erstmals ein HLA-A2-bindendes Peptid identifiziert werden, welches zwischen verschiedenen HCMV-Stämmen konserviert ist. Mit Hilfe der pp65-spezifischen CTL-Klone konnte gezeigt werden, dass das durch Viruspartikel in die Zelle eingebrachte pp65 noch vor Neusynthese des Proteins in den MHC Klasse I-Präsentationsweg eingeschleust wird und so die Erkennung infizierter Zellen vermittelt. Dies ist bemerkenswert, da hierdurch die HCMV-induzierte Immunevasion umgangen wird, die zu späteren Phasen der Virusinfektion die Erkennung der infizierten Zelle durch CTL verhindert. Durch den Nachweis der außergewöhnlichen Stabilität von pp65 in der Zelle gelang es, eine hohe metabolische Umsatzrate als eine Ursache von Immundominanz auszuschließen. Durch Etablierung eines transienten Expressionssystems in 293T-Zellen konnten verschiedene Varianten des pp65 hinsichtlich ihrer Prozessierung und Präsentation mit Hilfe der CTL-Klone analysiert werden. Es zeigte sich, dass die Erhöhung des Anteils an zytoplasmatisch lokalisiertem pp65 keine verstärkte Präsentation des Proteins im Kontext von MHC Klasse I zur Folge hat. Dagegen hob die Blockierung des CRM1-vermittelten nukleären Exportweges durch Zugabe von Hemmstoffen oder Zutransfektion kompetitiver Inhibitoren die Erkennung des pp65 im Kontext von MHC Klasse I nahezu auf. Hiermit wurde erstmalig eine Abhängigkeit der Präsentation eines immundominanten nukleären Proteins vom nukleozytoplasmatischen Transport nachgewiesen. Aufbauend hierauf konnte die Hypothese formuliert werden, dass pp65, möglicherweise modellhaft für andere immundominante Proteine, geregelt nukleär exportiert werden muss, um anschließend in den MHC Klasse I-Präsentationsweg eingeschleust zu werden. Erste Analysen im Rahmen dieser Arbeit deuten darauf hin, dass das *jun activation domain binding protein* (JAB-1) als Adaptormolekül zwischen pp65 und dem nukleären Exportrezeptor CRM1 fungiert. Die Erkenntnisse dieser Arbeit stellen die Grundlage für ein neues Projekt über die detaillierte Analyse der Zusammenhänge zwischen nukleärem Export und Antigenpräsentation dar.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Herpesviren	1
1.2	Das Humane Cytomegalovirus	2
1.2.1	Morphologie	2
1.2.2	Genom-Organisation	2
1.2.3	Replikation	3
1.2.4	Immunevasion	4
1.2.5	Latenz	4
1.2.6	Transmission	4
1.2.7	Pathogenese	5
1.2.8	Vakzine/Antivirale Therapie	6
1.3	Immunantwort	6
1.3.1	MHC Klasse I-Präsentationsweg	6
1.4	CD8+-T-Zell-Antwort gegen HCMV	8
1.4.1	Das Tegumentprotein pp65	9
1.4.2	Das <i>Immediate Early</i> 1-Protein	9
1.5	Immundominanz	10
1.5.1	Rolle von Quantität und Qualität des Peptids	10
1.5.2	Affinität des Peptids	10
1.5.3	Antigenquelle	11
1.5.4	Degradation	11
1.5.5	Nukleozytoplasmatischer Transport	12
1.5.6	T-Zell-Repertoire	13
1.6	Aufgabenstellung	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1	Allgemeine Laborgeräte	15
2.2	Chemikalien	16
2.3	Peptide	16
2.4	Inhibitoren	17
2.4.1	Proteasom-Inhibitoren	17
2.4.2	Protease-Inhibitor	17
2.4.3	Inhibitor des Nukleären Exports	17
2.5	Bakterien und ihre Kultivierung	18
2.5.1	Bakterienstämme	18
2.5.2	Medien und Medienzusätze	18
2.5.3	Flüssigkulturen	18
2.5.4	Kultivierung auf Agarplatten	18
2.5.5	Kryokultivierung	19
2.6	Viren	19
2.7	Molekularbiologische Methoden	19

---

2.7.1	Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA	19
2.7.2	Reinigung von Plasmid-DNA	19
2.7.3	Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren	19
2.7.4	Mutagenese	20
2.7.5	Agarose-Gelelektrophorese	20
2.8	Proteinchemische Methoden	21
2.8.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	21
2.8.2	Western Blot	22
2.8.3	Western Blot „ <i>Stripping</i> “	23
2.8.4	GST-Fällungsexperimente	24
2.9	Kultivierung von Säugerzellen	26
2.9.2	Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität	27
2.9.3	Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen	27
2.9.4	Suspensionszellen	27
2.9.5	Adhärente Zellen	28
2.9.6	Transfektion von Säugerzellen	29
2.9.7	Infektion	30
2.9.8	Aufreinigung von Viruspartikeln aus Zellkultur-Überstand	30
2.9.9	Bestrahlung von DB	31
2.9.10	Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC)	31
2.9.11	Anlage und Kultivierung von humanen T-Zell-Linien	31
2.9.12	Anlage von murinen T-Zell-Linien	32
2.9.13	Durchflusszytometrie/Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	34
2.9.14	HLA-A2 Stabilisierungsassay	35
2.10	Immunologische Methoden	36
2.10.1	Chromfreisetzungstest	36
2.10.2	ELISpot (Enzyme linked immuno spot assay)	37
2.10.3	Immunfluoreszenz	39
2.10.4	Immunfluoreszenzfärbung für die Laser-Scan-Mikroskopie	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1	Untersuchungen zur Prozessierung und Präsentation von pp65 mit Hilfe von murinen zytotoxischen T-Lymphozyten-Linien	41
3.1.1	Messung von T-Zell-Aktivität	41
3.1.1.1	Generierung von Zielzellen	42
3.1.2	Herstellung einer pp65-spezifischen CTL-Linie aus der $\alpha$ 2K <sup>b</sup> -transgenen Maus	44
3.1.2.1	Charakterisierung der CTLL $\alpha$ 2K <sup>b</sup> pp65	45
3.1.2.2	Erkennung von transfizierten Zellen	46
3.1.2.3	Vergleich der Erkennung von Peptid-beladenen T2- und T2A2K <sup>b</sup> -Zellen	47
3.1.3	Herstellung einer CTLL aus der CD8x $\alpha$ 2-transgenen Maus	48
3.1.3.1	Charakterisierung der CTLL CD8x $\alpha$ 2pp65	49
3.1.3.2	Erkennung infizierter und transfizierter Zellen durch CTL-Klone	50
3.1.3.3	Abhängigkeit der Lyse infizierter Zellen von moi und Infektionsdauer	52
3.1.3.4	Erkennung exogen durch DB beladener Zellen	54
3.1.4	Stabilität von pp65 in DB-beladenen Fibroblasten	55

---

3.1.5	Einfluss von Proteasomen-Inhibitoren auf die Erkennung transfizierter Zellen	56
3.1.6	Einfluss der subzellulären Lokalisation auf die Präsentation von pp65	58
3.1.7	Rolle des nukleären Exports bei der Erkennung von transfizierten und infizierten Zellen	60
3.1.7.1	Einfluss von LMB	61
3.1.7.2	Wirkung von HTLV-1 Rex Überexpression auf die Erkennung von pp65	63
3.1.7.3	Einfluss der Überexpression von CANc auf die Erkennung von pp65	64
3.1.7.4	Erkennung von pp65 nach Mutation einer putativen NES	65
3.2	Untersuchung der Interaktion von pp65 mit dem zellulären JAB-1	67
3.2.1	GST-Fällungsexperimente	67
3.2.2	Laser Scan Mikroskopie	69
3.2.2.1	Lokalisation von JAB-1 und pp65 in infizierten Zellen	69
3.2.2.2	Lokalisation von JAB-1 und dem viralen Kapsidprotein sCP in infizierten Zellen	70
3.2.2.3	Untersuchung von Viruspartikeln auf das Vorhandensein von JAB-1	71
3.2.3	Einfluss von JAB-1-Überexpression auf die pp65 Erkennung	72
3.3	Identifikation eines HLA-A2-präsentierten Peptids aus dem IE1-Protein des HCMV	74
3.3.1	Auswahl von Peptiden mit HLA-A*0201-Bindemotiv aus IE1	74
3.3.2	Untersuchung der HLA-A2-Bindungskapazität	75
3.3.3	Anlage von humanen T-Zell-Linien	76
3.3.4	Lyse von Peptid-beladenen und infizierten Zellen	77
3.3.5	IFN- $\gamma$ -Produktion P6-spezifischer CTLL	79
3.3.6	Messung von Frequenzen P6-spezifischer T-Zellen im Blut HLA-A2 positiver gesunder Spender	79
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>81</b>
4.1	Immundominanz des pp65	82
4.2	Prozessierung und Präsentation von pp65	83
4.2.1	Generierung von pp65-spezifischen stabilen CTLL	83
4.2.2	Erkennung von infizierten Zellen durch pp65-spezifische CTL	83
4.2.3	Proteasomale Degradation	85
4.2.4	Rolle der subzellulären Lokalisation des pp65	85
4.2.5	Rolle des nukleären Exports	87
4.3	Untersuchungen zur Interaktion von pp65 und JAB-1	89
4.4	Identifikation eines HLA-A2-bindenden Epitops aus dem IE1-Protein	91
<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>109</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Herpesviren

Die Familie der Herpesviren umfasst sowohl human- als auch tierpathogene Erreger mit ubiquitärer Verbreitung. Die Zuordnung erfolgt in erster Linie anhand des charakteristischen Aufbaus der Viruspartikel (Abbildung 1). Die innere Struktur dieser Virionen wird durch ein ikosahedrisches Kapsid gebildet, welches das lineare doppelsträngige DNA-Genom enthält. Umgeben wird das Kapsid von einer amorphen Proteinmasse, dem Tegument, welches nach außen durch eine Hüllmembran abgegrenzt wird. In diese Membran sind virale Oberflächen-Glykoproteine eingebettet, die die Anheftung der Partikel an die Wirtszelle vermitteln. Wesentliches Charakteristikum der Infektion mit Herpesviren ist die Etablierung lebenslanger Latenz.

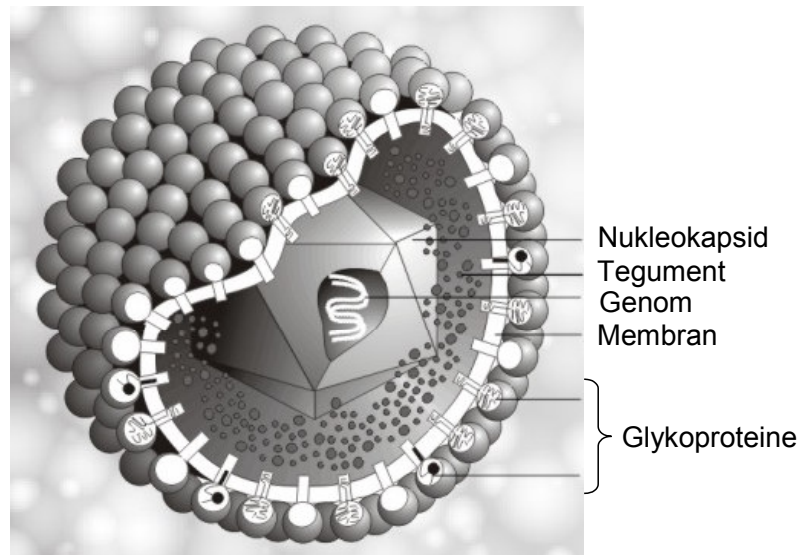
Die *Herpesviridae* werden nach Pathogenität, Tropismus und Vermehrungseigenschaften in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Herpesviren unterteilt. Die  $\alpha$ -Herpesviren zeichnen sich durch ihr breites Wirtsspektrum, einen kurzen Reproduktionszyklus und die Ausbildung von Latenz in sensorischen Ganglienzellen aus.  $\beta$ -Herpesviren hingegen zeigen ein engeres Wirtsspektrum und einen langsamen Vermehrungszyklus. Auch die  $\gamma$ -Herpesviren haben ein enges Wirtsspektrum und besitzen die Fähigkeit, T- und B- Lymphozyten zu infizieren und in ihnen zu persistieren (Roizman & Pellett, 2001).

**Tabelle 1:** Einteilung der Herpesviren, verändert nach Van Regenmortel *et al.*, 2000.

Unter-Familie	Genus	Mensch	Tier
$\alpha$ -Herpesviren	Simplexvirus	humanes Herpesvirus 1 humanes Herpesvirus 2	Bovines Mamillitisvirus (BoHV-2) Cercopithecine Herpesvirus 1 (Herpes B, CeHV-1)
	Varicellovirus	humanes Herpesvirus 3 <i>Varizella Zoster</i>	Pseudorabies-Virus (SuHV-1) Infektiöses Rhinotracheitis-Virus (BoHV-1) Equines Herpes-Virus 1 (EHV-1)
	Mardivirus		<i>Marek's disease</i> Herpesvirus 1 (GaHV-2)
	Illtovirus		Infektiöses Laryngotracheitis-Virus (GaHV-1)
$\beta$ -Herpesviren	Cytomegalovirus	humanes Herpesvirus 5 <i>hum. Cytomegalovirus</i>	Rhesusaffen-Cytomegalovirus (CeHV-5) Herpesvirus aotus Typ 1, 3 (AoHV-1, 3)
	Muromegalovirus		murines Cytomegalovirus (MuHV-1)
	Roseolovirus	humanes Herpesvirus 6 humanes Herpesvirus 7	Meerschweinchen-Cytomegalovirus (CavHV-2)
$\gamma$ -Herpesviren	Lymphocryptovirus	humanes Herpesvirus 4 <i>Epstein-Barr-Virus</i>	Orangutan-Herpesvirus (PoHV-2) Gorilla-Herpesvirus (PoHV-3)
	Rhadinovirus	humanes Herpesvirus 8	Herpesvirus ateles (AtHV-2) Herpesvirus saimiri (SaHV-2)

## 1.2 Das Humane Cytomegalovirus

Das Humane Cytomegalovirus (HCMV) gehört zu der Gruppe der  $\beta$ -Herpesviren. Seinen Namen verdankt das Virus dem charakteristischen Anschwellen CMV-infizierter Zellen.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung eines HCMV-Viruspartikels (Quelle: Dr. Marko Reschke, Marburg)

### 1.2.1 Morphologie

HCMV-Virionen besitzen die typische Herpesvirus-Morphologie (Abbildung 1). Ein aus 162 Kapsomeren bestehendes ikosaedrisches Kapsid umgibt das doppelsträngige DNA-Genom von etwa 235 kb. Das Kapsid wird aus mindestens 7 verschiedenen Proteinen gebildet; Hauptbestandteile sind die als *major*, *minor* und *smallest capsid* Proteine bezeichneten Polypeptide. Das zwischen Kapsid und Lipidhülle liegende Tegument von HCMV besteht aus mehr als 25 Proteinen. Zu den Hauptbestandteilen gehören die Phosphoproteine pp28 (ppUL99), pp65 (ppUL83), pp71 (ppUL82) und pp150 (ppUL32). Die Hülle des Virus wird durch eine Lipiddoppelschicht zellulären Ursprungs mit eingebetteten viralen Glykoproteinen gebildet. Das Glykoprotein B (gB, gpUL55) wurde als Hauptbestandteil der HCMV-Hülle identifiziert. Es beeinflusst u.a. die Bindung an und den Eintritt in die Zelle sowie die Zell-Zell-Transmission. Das gB ist ein immundominantes Antigen der humoralen Immunantwort gegen HCMV. Weitere abundante Hüllproteine sind gH (gpUL75), gL (gpUL115) und gO (gpUL74), die einen heterotrimeren Glykoproteinkomplex bilden und für den Viruseintritt mitverantwortlich gemacht werden (zusammengefasst in Mocarski & Courcelle, 2001).

### 1.2.2 Genom-Organisation

Der Laborstamm Ad169 ist der einzige HCMV-Stamm, dessen komplette Nukleotidsequenz publiziert wurde (Chee *et al.*, 1990). Das 230283 Basenpaare lange lineare Genom ist in

zwei Segmente unterteilt, die als *unique long* ( $U_L$ ) und *unique short* ( $U_S$ ) bezeichnet werden und die von *inverted repeats* eingefasst sind. Mit 208 offenen Leserahmen gehört das HCMV-Genom zu den größten und komplexesten Virusgenomen überhaupt (Mocarski & Courcelle, 2001).

### 1.2.3 Replikation

Während bei der natürlichen Infektion virale Replikation in Fibroblasten, Makrophagen, glatten Muskel-, Epithel- und Endothel-Zellen beobachtet werden kann (Sinzger *et al.*, 1995), zeigt HCMV in Zellkultur einen ausgeprägten Wirtszelltropismus. Primäre humane Haut- oder Lungen-Fibroblasten sind am besten für die Kultivierung des Virus geeignet. Permanente Zell-Linien sind nicht oder nur geringgradig permissiv. HCMV-infizierte Zellen produzieren drei verschiedene Arten an Viruspartikeln: Virionen, nicht infektiöse umhüllte Partikel (*non infectious enveloped partikels* (NIEPs)) und *Dense Bodies* (DB) (Irmiere & Gibson, 1983). NIEPs lassen sich im Elektronenmikroskop klar von Virionen unterscheiden, da sie ein DNA-loses Kapsid enthalten. DB bestehen aus verschiedenen Tegumentproteinen, hauptsächlich pp65, die von einer Lipidhülle umgeben sind. Sie enthalten weder DNA noch ein Kapsid.

Obwohl nur wenige Zellen die virale Replikation unterstützen, kann sich HCMV an viele Zelltypen effizient anlagern und in diese eindringen. Die HCMV-Adsorption kann dabei nicht durch andere Herpesviren kompetitiert werden. Daraus leitet sich die Annahme ab, dass HCMV spezifische Rezeptoren benutzt. Durch Heparinkompetition und Heparanase-Behandlung konnte gezeigt werden, dass Heparansulfat an der Adsorption beteiligt ist (Compton *et al.*, 1993).

Nach der Anlagerung an die Zelloberfläche erfolgt die Aufnahme des Virus durch Fusion von Virushülle und Zellmembran in pH-unabhängiger Weise (Compton *et al.*, 1992). Das virale Nukleokapsid wird rasch zum Zellkern transportiert. Bereits 20-30 Minuten nach Infektion wird das Tegumentprotein pp65 im Kern nachweisbar; zeitgleich kommt es zur Initiation der viralen Genexpression. Diese wird in drei aufeinanderfolgende Phasen eingeteilt, die kaskadenartig reguliert sind. Die sehr frühen (*immediate early*) Gene kodieren für regulatorische Proteine, die die nachfolgenden Schritte der viralen Genexpression steuern. Den Produkten der frühen (*early*) Gene werden wichtige enzymatische und regulatorische Funktionen bei der Replikation der viralen DNA zugeschrieben, während späte (*late*) Gene überwiegend für strukturelle Proteine kodieren. Ungefähr 16 Stunden nach Infektion beginnt die Replikation des HCMV Genoms, die mehrere Tausend Genomkopien pro Zelle hervorbringt. Die Replikation erfolgt vom zirkularisierten HCMV-Genom nach dem Prinzip des *rolling circle* (McVoy & Adler, 1994).

Die Formation der Nukleokapside findet in umschriebenen Regionen des Zellkerns statt. Diese im Lichtmikroskop als Einschlusskörperchen erkennbaren Bereiche haben zu der

Bezeichnung der HCMV-infizierten Gewebszelle als „Eulenaugen-Zelle“ geführt. Die initiale Umhüllung der Kapside findet durch Einknospung an der inneren Kernmembran statt. Die weiteren Prozesse, die zur Freisetzung umhüllter infektiöser Partikel an der Zytoplasmamembran führen, sind nur unzureichend aufgeklärt (zusammengefasst in Mocarski & Courcelle, 2001).

#### **1.2.4 Immunevasion**

HCMV codiert für mehrere Glykoproteine, die die Elimination von Virus-infizierten Zellen durch Immunzellen beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass die Genprodukte von US2 und US11 zur vermehrten Degradation von MHC (*Major Histocompatibility Complex*) Klasse I-Molekülen führen. Außerdem wurde beschrieben, dass US2 auch zwei Komponenten des MHC Klasse II-Weg zerstört (Tomazin *et al.*, 1999). Obwohl das US3-kodierte Glykoprotein zu US2 und US11 homolog ist, beeinflusst es die MHC Klasse I-Oberflächenexpression auf andere Weise. US3 bindet an die schwere Kette von MHC Klasse I-Molekülen und führt zur Retention des MHC Klasse I-Komplexes im endoplasmatischen Retikulum (ER). Das Glykoprotein US6 blockiert den Transport von Peptiden in das ER durch Bindung an den *Transporter associated with antigen presentation* (TAP) (Wiertz *et al.*, 1997).

Zellen, die keine MHC Klasse I-Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen, können durch natürliche Killerzellen (NK) erkannt und zerstört werden. Die Funktion derartiger NK-Zellen kann, zumindest *in vitro*, durch das von HCMV kodierte Klasse I Homolog UL18 inhibiert werden. Neuere Untersuchungen zeigen, dass auch gpUL40 Schutz vor der Lyse durch CD94+ NK-Zellen vermittelt (Wang *et al.*, 2002). Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass diese Immunevasionsmechanismen *in vivo* nur von begrenzter Wirkung sind. Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) können der HCMV-vermittelten Immunevasion entgegenwirken oder sie sogar aufheben (Hengel *et al.*, 1997, Benz *et al.*, 2001).

#### **1.2.5 Latenz**

Wie für alle Herpesviren charakteristisch folgt der primären Infektion mit HCMV eine lebenslange Persistenz des Virus im Organismus. Dabei sind die Mechanismen, die zur Latenz führen und die Zielzellen viraler Latenz nur unzureichend definiert. Die Primärinfektion beginnt in der Regel im mukosalen Epithelgewebe. Die weitere Ausbreitung des Virus im Körper kann durch infizierte Leukozyten und abgelöste vaskuläre Endothelzellen erfolgen. Neuere Studien legen Endothelzellen und Makrophagen als Ort der lebenslangen viralen Latenz nahe (zusammengefasst in Jarvis & Nelson, 2002).

#### **1.2.6 Transmission**

HCMV wird in der Regel durch direkten oder indirekten persönlichen Kontakt übertragen.



Körperflüssigkeiten wie Speichel, Vaginalsekret, Sperma, Urin, Muttermilch und Blut müssen als infektiös angesehen werden. Da das Virus gegenüber Umwelteinflüssen wie Hitze und Austrocknung empfindlich ist, wird angenommen, dass ein enger oder sogar intimer Kontakt zur Übertragung notwendig ist. HCMV kann aber auch diaplazentar während der Schwangerschaft übertragen werden. Die Durchseuchung liegt je nach Alter, Land und sozioökonomischem Status zwischen 40 und 100% (zusammengefasst in Pass, 2001).

### 1.2.7 Pathogenese

Bei immunkompetenten Personen verläuft eine HCMV-Infektion in der Regel asymptomatisch, in seltenen Fällen kann eine der infektiösen Mononukleose ähnliche Erkrankung auftreten. Im Gegensatz dazu kann HCMV bei immunsupprimierten Personen zu Erkrankungen mit hoher Morbidität und Mortalität führen. Besonders bei Transplantatempfängern und AIDS-Patienten kommt es zu schwerwiegenden Krankheitsverläufen.

Daneben ist HCMV in den Industrienationen die häufigste virale Ursache pränataler Schädigungen. Im Verlauf von etwa 2 % aller Schwangerschaften kommt es hier zu einer primären HCMV-Infektion, die wiederum in 20-40 % der Fälle zu einer Übertragung auf das Kind führt. Die kongenitale Infektion als Folge einer Primärinfektion der Mutter in der Schwangerschaft ist in 5-10 % der infizierten Neugeborenen symptomatisch; 10 % der infizierten Kinder mit symptomatischem Krankheitsverlauf sterben. 7-25 % der Kinder mit einer bei Geburt asymptomatischen kongenitalen Infektion bilden im Laufe ihrer Kindheit Schwerhörigkeit aus (Fowler *et al.*, 1997). Obwohl auch eine rezidivierende HCMV-Infektion bei schwangeren Frauen zu kongenitalen Infektionen führen kann, sind die Folgeschäden bei den Neugeborenen in der Regel deutlich geringer. Zu den bei einer kongenitalen Infektion auftretenden Symptomen gehören Gelbsucht, Petechien, Hepatosplenomegalie, Mikrozephalie, Chorioretinitis und Schwerhörigkeit (de Jong *et al.*, 1998).

Bei Transplantation solider Organe kommt es durch die Reaktivierung des latenten Virus im Empfänger oder durch Viren aus Transplantat oder Blutprodukten zu HCMV-Infektionen mit Symptomen wie Fieber, Unwohlsein, Leukopenie und Ausschlägen. Die Anzahl und Schwere der auftretenden Erkrankungen ist stark davon abhängig, ob Spender und Empfänger mit HCMV infiziert sind. Primärinfektionen mit HCMV nach Transplantation zeigen in der Regel schwerere Verläufe als Reaktivierungen und können durch die Entwicklung von Erkrankungen wie Pneumonie oder Leberinsuffizienz sogar lebensbedrohlich sein. Außerdem wird HCMV auch mit der Suppression der angeborenen Immunantwort gegen Bakterien und Pilze und einer akuten oder chronischen Transplantatschädigung in Verbindung gebracht (Reinke *et al.*, 1999)

Nach allogener Knochenmarkstransplantation (KMT) kommt es bei 30-40 % der Patienten,

die entweder vor der KMT HCMV-seropositiv waren oder Knochenmark eines HCMV-seropositiven Spenders erhielten, zu HCMV-bedingten Erkrankungen. Insbesondere bei Patienten mit interstitieller HCMV-Pneumonie liegt die Letalität bei 30 %. Durch den Einsatz von antiviralen Medikamenten wie Ganciclovir und von Immunglobulinen konnte die Sterblichkeit bei Transplantations-Patienten deutlich reduziert werden (Pass, 2001).

Bei AIDS-Patienten gehört die HCMV-Infektion zu den häufigsten opportunistischen Infektionen. Bei 20-40 % der mit HIV Infizierten mit einer CD4-Zellzahl unter 50 Zellen pro  $\mu$ l kam es in den 90er Jahren zu einer CMV-Erkrankung. Durch Einführung einer hochaktiven anti-Retroviralen Therapie (HAART) konnte die Zahl der HCMV-Erkrankungen bei AIDS-Patienten um 80 % reduziert werden (Salmon-Ceron, 2000).

### **1.2.8 Vakzine/Antivirale Therapie**

Trotz intensiver Forschungen seit mehr als 20 Jahren ist bisher keine zugelassene HCMV-Vakzine verfügbar. Es werden derzeit mehrere Ansätze zur Entwicklung einer solchen Vakzine verfolgt, deren Grundlage attenuierte Viren, subvirale *Dense Bodies*, DNA-Impfstoffe oder rekombinante Proteine sind.

Durch Einsatz der antiviralen Wirkstoffe Ganciclovir, Foscarnet und Cidofovir konnte die Anzahl und Schwere der HCMV-Erkrankungen bei Transplantat- und AIDS-Patienten stark reduziert werden. Allerdings weisen diese Medikamente erhebliche Nebenwirkungen auf. Außerdem kommt es bei längerer Therapiedauer zum Auftreten von Resistenzen, die durch Mutationen im UL97 Phosphotransferase- und UL54 DNA-Polymerase-Gen begründet sind (Pass, 2001).

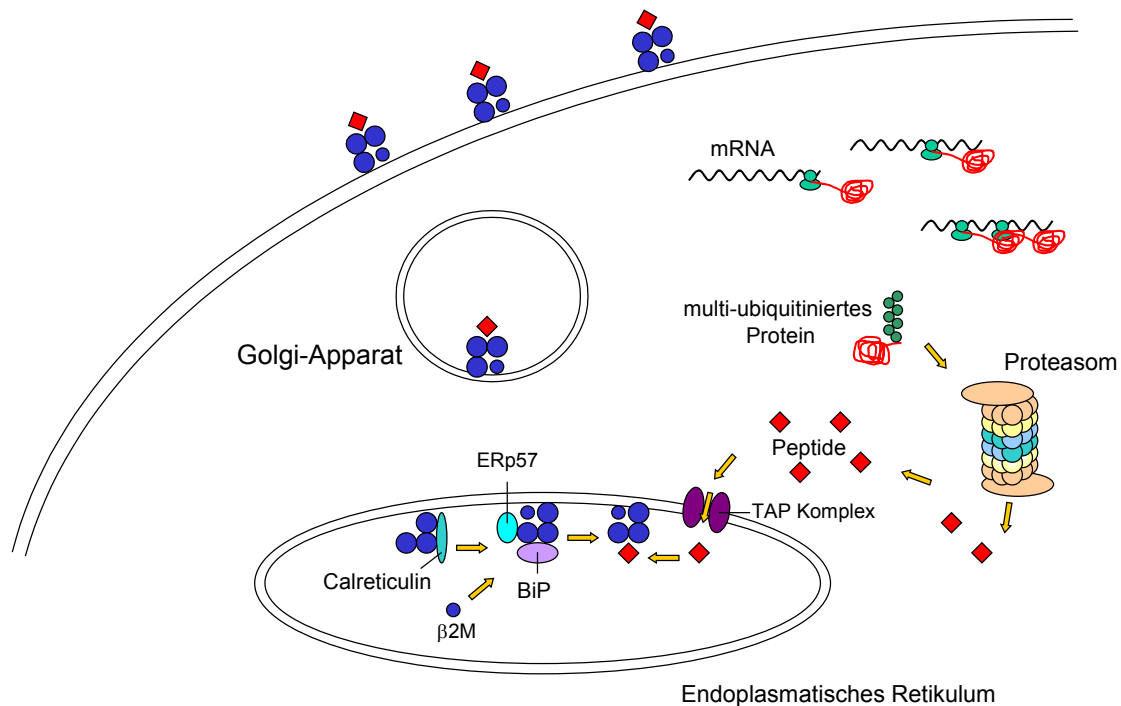
## **1.3 Immunantwort**

Die Kontrolle der CMV-Infektion wird hauptsächlich durch CD8+-T-Zellen vermittelt. Dies konnte sowohl im Tiermodell (Steffens *et al.*, 1998) als auch in klinischen Studien gezeigt werden. Bei Patienten nach allogener KMT korreliert der Krankheitsverlauf stark mit dem Vorhandensein HCMV-reaktiver zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) (Reusser *et al.*, 1991; Riddell *et al.*, 1991b). Walter und Kollegen zeigten 1995, dass der adoptive Transfer von *in vitro* expandierten HCMV-spezifischen T-Zell-Linien geeignet war, vor einer CMV-Reaktivierung zu schützen (Walter *et al.*, 1995).

### **1.3.1 MHC Klasse I-Präsentationsweg**

Im Rahmen der adaptiven Immunabwehr haben sich Mechanismen entwickelt, die geeignet sind, die Synthese von körperfremden oder mutierten Proteinen in Körperzellen zu erkennen und diese Zellen zu lysieren. Dadurch wird Schutz vor Infektionen und der Entstehung von Tumoren vermittelt. Eine wichtige Rolle bei dieser Überwachung spielen MHC Klasse I-Moleküle, die, mit Fragmenten aus zellulär exprimierten Proteinen beladen, an der

Zelloberfläche präsentiert werden. Unter normalen Bedingungen werden Peptide aus zellulären Proteinen präsentiert, die aufgrund der Selbsttoleranz nicht vom Immunsystem erkannt werden. Werden allerdings Peptide aus viralen oder mutierten Proteinen auf MHC Klasse I-Molekülen an der Zelloberfläche gezeigt, werden CTL stimuliert, die in der Lage sind, die betroffene Zelle zu lysieren (zusammengefasst in Rock & Goldberg, 1999).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des MHC Klasse I-Präsentationsweges. Multi-ubiquitinierte Proteine werden durch das Proteasom degradiert. Die entstandenen Peptide werden durch den TAP-Komplex in das ER transportiert und dort auf die neusynthetisierten MHC Klasse I-Moleküle geladen. Die Bildung des Komplexes wird durch die Chaperone Calreticulin, ERp57 und BiP kontrolliert. Der trinäre Komplex bestehend aus  $\alpha$ -Kette,  $\beta_2$  Mikroglobulin und Peptid gelangt über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche.

Voraussetzung für die Degradation von Proteinen ist deren Ubiquitinierung. In einer ATP-abhängigen Reaktion bildet das Enzym E1 mit dem 76 Aminosäuren-langen Ubiquitin eine Thiolester-Bindung und überträgt es daraufhin auf das Ubiquitin-Carrier-Protein E2. Die Ubiquitin-Protein Ligase E3 vermittelt anschließend die Übertragung des Ubiquitins auf ein Lysin eines Proteins oder ein bereits an ein Protein gebundenes Ubiquitin. Ubiquitinierte Proteine gelangen zum Proteasom und werden dort degradiert.

Das 26S Proteasom, bestehend aus einem 20S Hauptkomplex und zwei 19S regulatorischen Untereinheiten, ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachweisbar. Der proteolytische 20S Komplex besitzt eine tonnenförmige Struktur aus 4 Ringen mit jeweils 7 Untereinheiten. Die regulatorischen Untereinheiten besitzen ATPase-Aktivitäten, die eine wichtige Rolle bei der Entfaltung der Substrate spielen sollen und gleichzeitig die Aktivität des Hauptkomplexes stimulieren (Bogyo *et al.* 1997, Kloetzel, 2001).

Das Proteasom ist eine multikatalytische Protease mit drei unterschiedlichen Peptidase-Aktivitäten. Die Hydrolyse kann nach großen hydrophoben Resten (*chymotrypsin-like activity*), nach basischen Resten (*trypsin-like activity*) oder nach sauren Aminosäureresten erfolgen (*Peptidyl post glutamyl cleaving activity*). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Hydrolyse scheint die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität zu sein (Rock & Goldberg, 1999).

Als weitere Proteasomenuntereinheiten konnten die LMP (*low molecular weight* Proteine) 2 und 7 und MECL1 (*multicatalytic endopeptidase complex-like 1*) identifiziert werden. Diese Untereinheiten werden nur in lymphatischem Gewebe konstitutiv exprimiert, wohingegen in anderen Zellen die Expression durch IFN- $\gamma$  induziert wird. Nach der Expression werden die IFN- $\gamma$ -induzierbaren Untereinheiten in sich neu bildende Proteasomen anstelle ihrer konstitutiv exprimierten homologen Untereinheiten eingebaut. Derartig modifizierte Proteasomen werden auch als Immunproteasomen bezeichnet. Immunproteasomen weisen im Vergleich zu Proteasomen veränderte proteolytische Eigenschaften auf, wobei die Qualität, nicht jedoch die Menge der entstehenden Spaltprodukte variiert (Gaczynska *et al.*, 1993).

Die vom Proteasom generierten Peptide bestehen in der Regel aus 10-12 Aminosäuren. Eine N-terminale Extension, die vor der Beladung der MHC-Moleküle durch Aminoexopeptidasen im ER abgespalten wird, erleichtert den Transport durch TAP in das ER-Lumen. TAP ist ein heterodimerer Komplex bestehend aus zwei Transmembranproteinen. Der TAP-vermittelte Transport der vom Proteasom generierten Vorläuferpeptide ist ATP-abhängig. Im ER bildet sich aus einer  $\alpha$ -Kette, dem  $\beta_2$  Mikroglobulin und einem Peptid mit Hilfe verschiedener Chaperone (Calreticulin, ERp57, BiP) ein trinärer Komplex, der anschließend über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert wird. An der Zelloberfläche ist der Komplex mehrere Stunden stabil und kann durch T-Zellen mit entsprechendem T-Zell-Rezeptor erkannt werden.

## 1.4 CD8+-T-Zell-Antwort gegen HCMV

Obwohl HCMV für mehr als 200 Proteine kodiert, fungieren nur wenige als Antigene für Virus-spezifische CTL. Schon früh konnte das *immediate early 1* Protein (IE1) als Zielstruktur der HCMV-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort identifiziert werden (Borysiewicz *et al.*, 1988a; Borysiewicz *et al.*, 1988b). Weitere Untersuchungen zeigten, dass im Blut seropositiver gesunder Spender CD8+-T-Zellen gegen die Tegumentproteine pp65 und pp150, sowie gegen IE1 und gB zu finden sind. Dabei wurde pp65 als dominantes T-Zell-Antigen beschrieben (McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1996; Boppana & Britt, 1996), das durch Viruspartikel in die Zelle eingebracht wird und auch ohne endogene virale Genexpression zu einer Erkennung von infizierten Zellen führt (Riddell *et al.*, 1991a; McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994). Erst in neueren Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass

die Rolle des IE1 in der zellulären Immunantwort unterschätzt bislang wurde. Bei gesunden seropositiven Spendern wurden IE1-spezifische CTL gefunden, die in ihrer Prävalenz und Frequenz mit pp65-spezifischen CTL vergleichbar waren (Gyulai *et al.*, 2000). Bei einigen Spendern konnten sogar ausschließlich IE1-spezifische CTL, jedoch keine pp65-spezifischen CTL nachgewiesen werden (Kern *et al.*, 1999). Sowohl IE1-spezifische als auch pp65-spezifische CTL konnten bei ausgewählten Spendern in Frequenzen von bis zu mehreren Prozent der CD8+-T-Zellen im peripheren Blut gefunden werden (Kern *et al.*, 1999, Khan *et al.*, 2002). Die Strukturproteine gB und pp150 scheinen dagegen bei der CD8+-T-Zell-Antwort eine eher untergeordnete Rolle zu spielen (zusammengefasst in Reddehase, 2000).

#### 1.4.1 Das Tegumentprotein pp65

Das virale pp65, ein phosphoryliertes Polypeptid von 65 kDa, ist ein Hauptbestandteil des HCMV-Teguments. Es ist Hauptbestandteil von Virionen und subviralen DB. Pp65 ist ein 561 Aminosäuren langes Protein, welches überwiegend in der späten Phase der Virusinfektion exprimiert wird. Es wird durch Viruspartikel in die Zelle eingebracht und wandert aufgrund seiner nukleären Lokalisationssignale in den Zellkern (Gallina *et al.*, 1996, Schmolke *et al.*, 1995a). Durch Herstellung einer pp65-Deletionsmutante von HCMV konnte gezeigt werden, dass pp65 für die Virusreplikation nicht essentiell ist (Schmolke *et al.*, 1995b). Das pp65 weist Serin/Threonin Proteinkinase-Aktivität auf, die durch eine Punktmutation an Lysinrest 436 verloren geht (Somogyi *et al.*, 1990; Britt & Auger, 1986; Yao *et al.*, 2000).

#### 1.4.2 Das *Immediate Early 1*-Protein

Das *major immediate early* Protein IE1 (pUL123) ist ein Phosphoprotein von 72 kDa, das von den Exons 2-4 der *major immediate early* Region des HCMV kodiert wird. Das 491 Aminosäuren lange nukleäre Protein ist das während der sehr frühen Phase der Infektion am stärksten exprimierte virale Protein. Während IE1 bei Infektionen mit hoher *Multiplicity of Infection* (moi) nicht essentiell ist, scheint es allerdings für eine effiziente lytische Infektion in Zellkultur bei niedriger Infektionsdosis wichtig zu sein (Greaves & Mocarski, 1998). IE1 konnte als Transaktivator von verschiedenen viralen und zellulären Promotoren identifiziert werden. Unter anderem transaktiviert es im Zusammenspiel mit dem als IE2 bezeichneten viralen Protein den eigenen *Major immediate early* Promotor (Cherrington & Mocarski, 1989). Sowohl in stabilen Zell-Linien als auch in HCMV-infizierten Zellen kolokalisiert IE1 mit den Metaphase-Chromosomen (LaFemina *et al.*, 1989); außerdem ist es in der Lage, durch Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ - induzierte Apoptose in HeLa-Zellen zu inhibieren (Zhu *et al.*, 1995). Man findet IE1 in den promyeloischen Leukämie Protein (PML) assoziierten nukleären Domänen (als PML onkogene Domänen (POD) oder nukleäre Domänen 10 (ND10) bezeichnet). Diese PODs oder ND10 sind spherische Strukturen mit einem Durchmesser von

0,2-1  $\mu\text{m}$ , die mit einer Anzahl von 5-30 pro Zelle in allen Zellen zu finden sind. PODs sind in der Interchromatinregion lokalisiert und mit der nukleären Matrix assoziiert. Sie spielen bei vielen zellulären Prozessen wie z. B. Wachstumskontrolle, Chromatinremodellierung, Zelldifferenzierung und Apoptose eine Rolle (Eskiw & Bazett-Jones, 2002).

IE1 führt zu einer Proteasomen-unabhängigen Auflösung der PODs durch Dislokation von PML (Korioth *et al.*, 1996; Wilkinson *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2001). Auch bei anderen Herpesviren wurde eine Auflösung der PODs durch IE-Proteine (z.B. durch ICP0 bei HSV-1) beobachtet, allerdings erfolgt dieser Prozess Proteasomen-abhängig, d.h. durch Degradation von PML. Durch die IE1-vermittelte Auflösung der PODs wird die transkriptionelle Repression durch PML inhibiert. Dieser Vorgang ist Voraussetzung für die effiziente virale Genexpression während der HCMV-Infektion (Ahn & Hayward, 2000).

## 1.5 Immundominanz

Oft führen nur wenige der vielen tausend Peptide, die durch ein Pathogen kodiert werden, in Verbindung mit einem bestimmten MHC Klasse I-Allomorph zur Induktion von messbaren T-Zell-Antworten. Die Aufklärung des als Immundominanz bezeichneten Phänomens ist für das Verständnis der zellulären Immunantwort wichtig und Voraussetzung für die Entwicklung wirksamer Vakzinen (Yewdell & Bennink, 1999).

### 1.5.1 Rolle von Quantität und Qualität des Peptids

In der Regel korreliert ein Anstieg der Proteindegredation mit der erhöhten Produktion antigenen Peptide. Allerdings ist trotz intensiver Untersuchungen nicht geklärt, ob eine hohe Produktion von bestimmten antigenen Peptiden für deren Immundominanz verantwortlich ist. Einige antigene Peptide stammen aus Proteinen mit hoher metabolischer Stabilität, so dass deren Immundominanz nicht in einer vermehrten Synthese der Peptide begründet sein kann (Yewdell & Bennink, 1999). Der Annahme, dass die Menge an Peptiden in der Zelle die Dominanz einzelner Spezifitäten determiniert, widerspricht auch die Erkenntnis, dass in manchen Fällen weniger als 10 Peptid-MHC-Komplexe der insgesamt etwa  $10^5$  beladenen MHC-Moleküle auf der Oberfläche einer Zelle ausreichend sind, um eine T-Zell-Antwort hervorzurufen (Sykulev *et al.*, 1996).

### 1.5.2 Affinität des Peptids

Eine wichtige Rolle bei der Immundominanz spielt die Affinität des Peptids zum MHC Klasse I-Molekül. Die MHC Klasse I-bindenden Peptide haben eine Länge von 8-11 Aminosäuren. Die Amino- und Carboxy-Termini interagieren mit den für die meisten Klasse I Allomorphe hochkonservierten Resten der Peptidbindungsspalte (Rammensee *et al.*, 1998). Zusätzlich besitzt die Antigenbindungsspalte zwei (in seltenen Fällen drei) Taschen, die eine bis zwei der 20 möglichen Aminosäuren bevorzugen. Diese sogenannten Ankeramino-säuren

variieren von Allomorph zu Allomorph.

Wichtig für die Affinität eines Peptids zum präsentierenden MHC-Molekül ist die korrekte Spaltung am C-Terminus durch das Proteasom. Diese Spaltung wird durch benachbarte, aber auch durch im Epitop lokalisierte Aminosäuren beeinflusst. Der N-Terminus hingegen kann durch Aminoexopeptidasen im ER verkürzt werden. Mit Hilfe von Datenbanken ist mittlerweile eine Vorhersage von Lage und Affinität einzelner Peptide in Bezug auf bestimmte MHC-Allomorphe möglich (Falk *et al.*, 1991, Rammensee *et al.*, 1999).

### 1.5.3 Antigenquelle

Bei Untersuchungen zur Immundominanz stellt sich auch die entscheidende Frage nach der Quelle der antigenen Peptide. Interessanterweise stammen viele antigene Peptide aus metabolisch stabilen Proteinen (Yewdell *et al.*, 2001). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass hauptsächlich aufgrund von fehlerhafter Translation fehlgefaltete Abfallprodukte der Ribosomen (DRiPs, *defective ribosomal products*) die Hauptquelle antigener Peptide darstellen (Yewdell *et al.*, 1996; Yewdell, 2002). Diese Hypothese wurde durch Untersuchungen bekräftigt, die eine proteasomale Degradation von 30-80 % aller neu synthetisierter Proteinmoleküle nachweisen konnten (Schubert *et al.*, 2000). Diese Proteine sind unlöslich. Ungefaltete Proteine besitzen diese Eigenschaft aufgrund von Aggregation, die durch die Lösungsmittel-Exposition des hydrophoben Kerns hervorgerufen wird.

### 1.5.4 Degradation

Voraussetzung für die Generierung von Peptiden ist die Ubiquitylierung und Degradation von Proteinen. Dieser Vorgang der Proteindegradation kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

Die Degradation von Proteinen wird unter anderem durch deren Primärstruktur bestimmt. Untersuchungen zeigten, dass Proteine mit großen oder geladenen Aminosäuren am N-Terminus schnell ubiquitiniert und degradiert werden (*N-end-Rule*; Varshavsky, 1996). Glycin/Alanin-Repetitionen hingegen stabilisieren Proteine, wie am Beispiel des Epstein-Barr Virus Nukleären Antigen-1 gezeigt werden konnte (Levitskaya *et al.*, 1995, Levitskaya *et al.*, 1997).

Auch die Interaktion mit anderen Proteinen kann die Stabilität und die Degradationsrate von Proteinen beeinflussen. Wichtige zelluläre Vorgänge wie der Zellzyklus können durch die Degradation von Proteinen reguliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des *Jun activation domain binding protein* (JAB-1) die Degradation des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p27<sup>Kip1</sup> zur Folge hat und so der durch p27<sup>Kip1</sup> hervorgerufene Zellzyklus-Arrest aufgehoben werden kann (Tomoda *et al.*, 1999, Tomoda *et al.*, 2002). Auch die Stabilität des Tumorsuppressorproteins p53 wird durch JAB-1 negativ reguliert (Bech-Otschir *et al.*, 2001). JAB-1 wurde 1996 erstmals von Claret und Kollegen als

Interaktionspartner von c-jun und daher Regulator der AP-1 vermittelten Transkription beschrieben (Claret *et al.*, 1996). In *Arabidopsis* konnte ein homologes Protein identifiziert werden, welches eine Untereinheit des COP9 Signalosoms darstellt. Das COP9 Signalosom ist ein aus acht Untereinheiten bestehender Komplex, der essentiell für die Entwicklung von Pflanzen und Tieren ist (Chamovitz & Segal, 2001). Hinweise auf eine Interaktion des COP9-Signalosoms mit dem Proteasom legen die Vermutung einer Beteiligung dieses Komplexes an der Proteindegradation nahe (Kwok *et al.*, 1999).

Im Fall von HCMV gibt es ebenfalls ein Beispiel, dass die MHC Klasse I-Präsentation durch andere Proteine beeinflusst werden kann. 1993 wurde beschrieben, dass IE1 *in vitro* selektiv von der MHC Klasse I-Präsentation ausgeschlossen wird (Gilbert *et al.*, 1993). Mit Hilfe einer pp65-Deletionsmutante konnte gezeigt werden, dass eine mit pp65 assoziierte Kinaseaktivität für diese Beobachtung verantwortlich ist (Gilbert *et al.*, 1996).

Darüber hinaus haben Zytokine Einfluss auf die Degradation von Proteinen. Durch IFN- $\gamma$  induzierte proteasomale Untereinheiten sind geeignet, die prozessiven Eigenschaften dieser multikatalytischen Protease zu verändern. Bestimmte Peptide werden nur durch das Immunproteasom generiert (Sijts *et al.*, 2000). Außerdem wird durch IFN- $\gamma$  die Expression von MHC Klasse I-Molekülen und TAP erhöht.

### 1.5.5 Nukleozytoplasmatischer Transport

Proteasomen findet man sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma (Reits *et al.*, 1997). Bisherige Lehrmeinung ist es, dass antigene Peptide in den meisten Fällen durch zytoplasmatische Proteasomen degradiert und in den MHC-Präsentationsweg eingeschleust werden. Ungelöst bleibt dabei aber die Frage, wie antigene Peptide aus ausschließlich nukleär lokalisierten Proteinen entstehen und nachfolgend durch MHC Klasse I präsentiert werden können. Erstaunlicherweise stammen eine ganze Reihe von immundominanten Peptiden aus nukleären Proteinen. Eine Erklärung wäre es, dass auch nukleäre Proteasomen antigene Peptide generieren können, die dann in der Folge in den MHC Klasse I-Präsentationsweg eingeschleust werden (Yewdell & Bennink, 1999). Alternativ könnten Mechanismen existieren, die zu einem geregelten nukleären Export und die nachfolgende zytoplasmatische Degradation von immundominanten nukleären Proteinen führen. Ein Charakteristikum von eukaryontischen Zellen ist die Abgrenzung des Zellkerns durch eine Doppelmembran. Die resultierende Separation von zellulären Prozessen setzt effiziente Transportmechanismen von Proteinen und Nukleinsäuren durch die Kernmembran voraus. Dieser Transport geschieht mit einer Transportkapazität von mehr als einer Millionen Makromoleküle pro Minute bidirektional durch den Kernporenkomplex. Der Kernporenkomplex besitzt einen Diffusionskanal mit einem Durchmesser von 9 nm, durch den Moleküle von bis zu 60 kDa Größe diffundieren können. Substrate des aktiven



Transports können sogar mehrere Millionen Dalton groß sein (Görlich, 1998).

Der gerichtete Transport wird durch die kleine GTPase Ran vermittelt. Voraussetzung ist eine hohe nukleäre und eine niedrige zytosolische RanGTP Konzentration. Der Rezeptor CRM1 (oder Exportin1) bindet an RanGTP und an Proteine, die ein Leucin-reiches nukleäres Exportsignal besitzen. Nach dem Export erfolgt die Spaltung des GTP im RanGTP-CRM1-NES-Protein-Komplex, was zu einer Dissoziation des NES-Proteins führt. Anschließend wird CRM1 im unbeladenen Zustand in den Zellkern zurücktransportiert.

Proteine mit nukleären Lokalisationssignalen werden im Zytosol über den Adapter Importin- $\alpha$  an Importin- $\beta$  gebunden und in den Kern transportiert. Dort dissoziiert der Komplex durch RanGTP Bindung. Importin- $\beta$  gelangt anschließend zurück ins Zytoplasma (Ohno *et al.*, 1998, Nigg, 1997).

### 1.5.6 T-Zell-Repertoire

Neben den Mechanismen, die die Antigenpräsentation regulieren, kann Immundominanz auch durch Faktoren bestimmt werden, die bei der Reifung Antigen-spezifischer T-Lymphozyten wirksam werden. Ähnlich wie bei Immunglobulin-Genen erfolgt auch die Formation der T-Zell-Rezeptor-Gene durch somatische Rekombination (DNA-Rearrangement) verschiedener V-, D- und J-Gensegmente. Hierdurch kann ein potentielles T-Zell-Repertoire bei etwa  $10^{16}$  verschiedenen Molekülen erzeugt werden (Davis & Bjorkman, 1988). Bevor T-Zellen in die Peripherie entlassen werden, müssen sie allerdings im Thymus die positive und negative Selektion durchlaufen. Voraussetzung für die Immunogenität eines Peptid-beladenen MHC Klasse I-Moleküls ist daher das Vorhandensein von reaktiven T-Lymphozyten, die den hierzu komplementären T-Zell-Rezeptor exprimieren und nach entsprechender Selektion in der Peripherie vorhanden sind.

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Immundominanz einzelner Spezifitäten auch dadurch beeinflusst werden, dass hochaffine T-Zellen das Antigen auf Antigen-präsentierenden Zellen reduzieren, um die Aktivierung niedrigaffiner T-Zellen zu inhibieren (Kedl *et al.*, 2001; Lanzavecchia, 2002).

## 1.6 Aufgabenstellung

Zytotoxische T-Lymphozyten sind die entscheidenden immunologischen Effektoren bei der Kontrolle der HCMV-Infektion. Dem Tegumentprotein pp65 kommt dabei neben dem *immediate early* 1-Protein eine herausragende Stellung als Zielantigen der antiviralen CTL-Antwort zu.

In der vorliegenden Arbeit sollten die molekularen Mechanismen, die der Immundominanz des pp65 im Rahmen der CTL-Antwort gegen HCMV zugrunde liegen, näher untersucht werden. Zur Aufklärung dieser Mechanismen sollte die Prozessierung und Präsentation des pp65 mit Hilfe pp65-spezifischer CTLL analysiert werden. Diese CTLL sollten durch Peptidimmunisierung von HLA-A2-transgenen Mäusen mit einem bekannten, HLA-A2-präsentierten Peptid aus pp65 generiert werden. In einem zweiten Ansatz sollte eine mögliche Wechselwirkung des pp65 mit dem zellulären JAB-1 und deren Einfluss auf die Präsentation des immundominanten Tegumentproteins untersucht werden. Ein weiteres Ziel war es, die 1996 aufgestellte Hypothese einer selektiven Unterdrückung der IE1-Präsentation durch pp65 näher zu charakterisieren (Gilbert *et al.*, 1996) und erste Analysen zu den Wechselwirkungen zwischen IE1 und pp65 in Bezug auf die MHC Klasse I-restringierte Immunantwort durchzuführen. Auch für diese Untersuchungen sollten CTLL generiert werden, die IE1-exprimierende humane Zielzellen mit hoher Sensitivität erkennen.

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, sollte auch in diesem Falle die Generierung der CTLL durch Peptidimmunisierung von HLA-A2-transgenen Mäusen erfolgen. Da zu Beginn der Arbeit kein konserviertes HLA-A2-bindendes Peptid aus IE1 bekannt war, sollte ein entsprechendes definiert werden.

Die vorgesehenen Untersuchungen sollten zum Verständnis des Phänomens Immundominanz beitragen und somit zu weiteren Erkenntnissen über die CTL-Antwort im Rahmen der HCMV-Infektion führen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemeine Laborgeräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
$\gamma$ -Counter	Cobra II	Packard Bioscience, Dreieich
Analysenwaage	BP61	Sartorius, Göttingen
Bio Imaging Analyzer	BAS-250	Fujifilm, Düsseldorf
Blotapparatur		Hölzel, Wörth
Brutschrank/CO <sub>2</sub> -Inkubator	Steri-Cult 200 Incubator	Forma Scientific, Egelsbach
Durchflusszytometer	FACSort	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskope	Axiophot	Zeiss, Jena
	DM IRB SL	Leitz, Wetzlar
Folienschweißgerät	Polystar 583	Rische & Herforth, Hamburg
Gelapparaturen	DNA-Gelelektrophorese:	Keutz, Reiskirchen
	Protein-Gelelektrophorese:	Hoefer/Pharmacia Biotech, Freiburg
Heizrührer	RCTbasic	IKA-Labortechnik, Staufen
Heizschüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Laborwaage	LP5200P	Sartorius, Göttingen
Mikroliter Glasspritzen	Hamilton 100 $\mu$ l #710	Hamilton, Bonaduz, CH
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Jena
Netzgeräte	Elektrophoresis Power Supply 600	Pharmacia Biotech, Freiburg
PCR-Cycler	Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
pH-Meter	CG 842	Schott, Mainz
Photometer	GeneQuant	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten, verstellbar	2, 20, 200, 1000 $\mu$ l	Gilson, Langenfeld
Pipettierhilfen	Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Schüttelinkubator	Cellstar	Nunc, Wiesbaden
Schüttler	HS501 digital	IKA-Labortechnik, Staufen
Sonificator	Branson Sonifier 250	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Sterilbank	Herasafe	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge	Sorvall Combi Plus	Sorvall, Hanau
Vakuumpumpe		KNF Neuberger, Freiburg
Vortex	MS1 Minishaker	IKA-Labortechnik, Staufen
Wasserbad mit Thermostat		Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
	Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
	Megafuge 2.0	Heraeus, Hanau
	RC5C Plus mit Rotoren GS3, SLA1500, SS34	Sorvall, Hanau

## 2.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden soweit nicht anders erläutert bei Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bestellt. Zum Ansetzen von Puffern und Lösungen wurde autoklaviertes bidestilliertes Wasser verwendet.

## 2.3 Peptide

Peptide wurden mit einer Reinheit von >75% bei Jerini Biotoools GmbH (Berlin) oder Affina Immuntechnik GmbH (Berlin) bezogen. Alle Peptide trugen am C-Terminus eine freie Carboxy-Gruppe.

Name	Sequenz	Bindung an	Position
P1	TMYGGISLL	HLA-A2	IE1 <sub>297-305</sub>
P2	VLAELVKQI	HLA-A2	IE1 <sub>81-89</sub>
P3	ILDEERDKV	HLA-A2	IE1 <sub>256-264</sub>
P4	LLSEFCRVL	HLA-A2	IE1 <sub>304-312</sub>
P5	SLGDPLFPEL	HLA-A2	IE1 <sub>49-58</sub>
P6	YILGADPLRV	HLA-A2	IE1 <sub>354-363</sub>
P7	LITKPEVISV	HLA-A2	IE1 <sub>329-338</sub>
P8	CMMTMYGGI	HLA-A2	IE1 <sub>294-302</sub>
P9	SLLSEFCRV	HLA-A2	IE1 <sub>303-311</sub>
P10	ILGADPLRV	HLA-A2	IE1 <sub>355-363</sub>
P11	MMGGCLQNAL	HLA-A2	IE1 <sub>121-130</sub>
P12	MMTMYGGISL	HLA-A2	IE1 <sub>295-304</sub>
P13	CMKVFAQYIL	HLA-A2	IE1 <sub>347-356</sub>
pp65	NLVPMVATV	HLA-A2	pp65 <sub>495-503</sub>
PmCMV	LFAGSLSYL	K <sup>d</sup>	M84
HBV Core	TPPAYRPPNAPIL	I-A <sup>b</sup>	Core <sub>128-140</sub>

## 2.4 Inhibitoren

### 2.4.1 Proteasom-Inhibitoren

Alle Proteasom-Inhibitoren wurden bei Calbiochem (Schwalbach) bezogen und in den angegebenen Konzentrationen in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

Name	Eigenschaft	MW	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
<b>Proteasom-Inhibitor I</b>	Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leucinal. Blockiert die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms	618,8	50 mM	1 $\mu$ M
<b>Lactacystin</b>	Irreversibler Inhibitor der Trypsin- und Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms	376,4	10 mM	5-10 $\mu$ M
<b>MG-132</b>	Cbz-Leu-Leu-Leucinal. Reversibler Inhibitor des Proteasoms	475,6	50 mM	10 $\mu$ M

### 2.4.2 Protease-Inhibitor

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Sigma, Deisenhofen) wurde in der angegebenen Konzentration in Isopropanol gelöst.

Name	MW	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
<b>Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)</b>	174,2	100 mM	1 mM

### 2.4.3 Inhibitor des Nukleären Exports

Leptomycin B (LMB) ist eine ungesättigte, verzweigte Fettsäure. Es blockiert den nukleären Export durch Bindung an CRM1. LMB wurde in Methanol gelöst bei Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Name	MW	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
<b>Leptomycin B</b>	540,73	10 $\mu$ M	10 nM

## 2.5 Bakterien und ihre Kultivierung

### 2.5.1 Bakterienstämme

*E. coli* DH5 $\alpha$ F': F'/*endA1 hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *glnV44 thi-1 recA1 gyrA* (Nal)<sup>r</sup> *relA1*  $\Delta$ (*lacIZYA-argF*)U169 *deoR* (  $\phi$  80*dlac* $\Delta$ (*lacZ*)M15).  
Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe

*E. coli* BL21(DE3) F<sup>-</sup> *ompT gal [dcm] [lon] hsdS<sub>B</sub>* (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) mit DE3, einem  $\lambda$ -Prophagen, der das T7-Polymerase Gen trägt.  
Novagen, Bad Soden

### 2.5.2 Medien und Medienzusätze

#### 2.5.2.1 Luria Bertani (LB)-Medium

10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl in 1 l H<sub>2</sub>O, mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt, autoklaviert

#### 2.5.2.2 LB-Agarplatten

LB-Medium + 15 g Agar/l, autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte nach Abkühlen der Lösung auf 50-60°C.

#### 2.5.2.3 Antibiotika

Lagerung bei -20°C

**Ampicillin:** Stock 25 mg/ml in H<sub>2</sub>O; Endkonzentration 100  $\mu$ g/ml

**Kanamycin:** Stock 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O; Endkonzentration 30  $\mu$ g/ml

#### 2.5.2.4 Einfriermedium

LB-Medium mit 30 % Glycerin

### 2.5.3 Flüssigkulturen

Zur Anzucht von Bakterien in Flüssigkulturen wurden 200 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie oder mit einigen Mikrolitern einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht (üN) im Schüttler bei 200 Umdrehungen pro Minute (Upm) bei 37°C angezogen.

### 2.5.4 Kultivierung auf Agarplatten

Zur Anzucht von Bakterien auf einer Agarplatte wurden die Bakterien aus einer Glycerinkultur mit einer sterilen Impföse auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert.

### 2.5.5 Kryokultivierung

Zur Kryokonservierung von Bakterien wurden diese in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bis kurz vor Eintritt in die stationäre Wachstums-Phase angezogen, anschließend mit 30 % Glycerin versetzt und in Kryoröhrchen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Zugabe von Glycerin vermindert die Bildung von Eiskristallen, die die Bakterien schädigen können.

## 2.6 Viren

**Ad169 (ATCC VR-538):** Dieser HCMV-Laborstamm wurde 1956 von Rowe (Rowe *et al.*, 1956) isoliert und diente als Grundlage für die Sequenzierung des HCMV-Genoms (Chee *et al.*, 1990).

**RVAd65:** pp65-Deletionsmutante des HCMV-Stammes Ad169 (Schmolke *et al.*, 1995b).

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA

Transformations-kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Calciumchlorid-Methode nach Sambrook *et al.* (2001) hergestellt und falls nicht sofort benötigt, in 200  $\mu\text{l}$  Aliquots bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von ca. 10 ng Plasmid-DNA oder der Hälfte eines Ligationsansatzes weitere 30 min inkubiert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen erfolgte durch einen Hitzeschritt bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 90 s. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und 30-45 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Danach wurden die Zellen auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### 2.7.2 Reinigung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus 1,5 ml Übernacht-Kulturen mit Hilfe der Methode der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 2001).

Größere DNA-Mengen wurden mit Hilfe von Gibco Concert Säulen aus 200 ml Bakterienkulturen gewonnen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die DNA-Konzentration wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 260 nm ermittelt. Eine  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  von 1 entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA .

### 2.7.3 Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren

Alle gängigen enzymatischen Reaktionen wie die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierungsreaktionen und Ligationen wurden entweder nach Standardprotokollen

(Sambrook *et al.*, 2001) oder nach Angaben des Herstellers der Enzyme (New England Biolabs, Schwalbach; Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe) durchgeführt.

## 2.7.4 Mutagenese

Zur Mutagenese einer putativen Nukleären-Export-Sequenz (NES) in pp65 wurde das QuikSite™ Mutagenesis Kit (Stratagene; Amsterdam, Holland) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde die Mutation durch Primer, die die gewünschte Mutation trugen, mittels PCR eingeführt und anschließend die parentale Plasmid-DNA durch einen *DpnI*-Verdau abgebaut.

### 2.7.4.1 Primer für NES-Mutagenese in pp65RSV

#### NES-1

5'-CTATGTGTACGCGGCGCCGGCCAAGATGGCGAACGCCCCAGCATCAAC-3'

#### NES-2

5'-GTTGATGCTGGGGGCGTTCGCCATCTTGGCCGGCGCCGCTACACATAG-3'

Für die Amplifikation wurde folgendes Programm gewählt:

- |    |          |      |
|----|----------|------|
| 1. | 30 s     | 95°C |
| 2. | 30 s     | 95°C |
| 3. | 1 min    | 55°C |
| 4. | 13,5 min | 68°C |

Schritte 2 bis 4 wurden 18 mal wiederholt.

## 2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese

### 2.7.5.1 Puffer

#### TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)

89 mM Tris-Borat  
2 mM EDTA (pH 8,0)

#### Auftragspuffer für DNA-Gele

50 mg Bromphenolblau  
100 mg Xylencyanol  
1 mM EDTA  
25 g Saccharose  
ad 50 ml mit H<sub>2</sub>O

Zur Analyse oder Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden diese mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde Agarose in TBE-Puffer aufgekocht und nach Zusatz von 0,5 mg/ml Ethidiumbromid in die entsprechende Gelapparatur gegossen; je nach Molekulargewicht der DNA-Fragmente wurden Gele mit einer Agarose-Konzentration von 0,8-2 % (w/v) verwendet. Vor dem Auftrag wurden die DNA-Proben 1:6 mit Auftragspuffer gemischt. Die Elektrophorese wurde – je nach Größe der Gelkammer - bei einer Spannung von 80-140 V durchgeführt.



## 2.8 Proteinchemische Methoden

### 2.8.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) verwendet. Das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich in einem konstanten Verhältnis von 1 Molekül SDS pro 2 Aminosäuren an die Proteine an, die dadurch denaturiert werden. Die durch den Überschuss an SDS eingebrachte starke negative Ladung führt dazu, dass das Ladungs/Größe-Verhältnis aller Proteine gleich wird, da die ursprüngliche Ladung der Proteine vernachlässigbar ist. Im elektrischen Feld lassen sich die Proteine der Größe nach auftrennen, da ihre Beweglichkeit dem Logarithmus der Molekülmasse proportional ist. Das Wanderungsverhalten der Proteine wird außerdem durch den Gehalt an Acrylamid d.h. den Vernetzungsgrad des Gels beeinflusst. Große Proteine werden besser in einem niedrigprozentigen Gel aufgetrennt, kleine Proteine hingegen in einem höherprozentigen.

#### 2.8.1.1 Puffer

##### PAGE-Laufpuffer

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,1 % (w/v) SDS

##### Laemmli-Proteingel-Auftragspuffer

125 mM Tris  
2 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol  
10 % (v/v) Glycerin  
1 mM EDTA  
0,005 % (w/v) Bromphenolblau  
2 % (w/v) SDS

**Tabelle 2:** Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen

für 1 Gel	Trenngel 10 %	Trenngel 12,5%	Trenngel 15%	Sammelgel
<b>Gel 30 (Acrylamid: Bisacrylamid- Verhältnis 37:1)</b>	8,3 ml	10,4 ml	12,5 ml	2,1 ml
<b>H<sub>2</sub>O</b>	10 ml	7,9 ml	5,8 ml	8,65 ml
<b>Tris 1,5 M pH 8,8</b>	6,25 ml	6,25 ml	6,25 ml	-
<b>Tris 1,0 M pH 6,8</b>	-	-	-	1,5 ml
<b>10 % (w/v) SDS</b>	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	125 $\mu$ l
<b>10 % (w/v) APS</b>	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	125 $\mu$ l
<b>TEMED</b>	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	15 $\mu$ l

Je nach Anwendung wurden 10-15 % Acrylamidgele nach Tabelle 2 verwendet. Die Proben wurden 1:2 mit Laemmli-Puffer verdünnt, 5 min bei 95°C aufgeköcht und bei 25 mA 3-4 Stunden oder bei 55 V  $\mu$ N aufgetrennt. Zur Abschätzung der Proteingrößen wurde zusätzlich ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard mit auf das Gel aufgetragen.

Anschließend erfolgte die Anfärbung der aufgetrennten Proteine mit Hilfe der Fairbanks-Methode oder der Transfer auf eine PVDF-Membran für einen Immunoblot.

### 2.8.1.2 Färbung nach Fairbanks

#### Fairbanks-Färbelösung

25 % (v/v) Isopropanol  
10 % (v/v) Essigsäure  
0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue

#### Fairbanks-Entfärber

10 % (v/v) Essigsäure

Zum Färben der Proteine wurden die Gele in der Fairbanks-Färbelösung in einem Mikrowellen-Ofen kurz aufgekocht und nach dem Abkühlen mit Wasser gespült. Danach wurden die Gele im Fairbanks-Entfärber ebenfalls aufgekocht und bis zur kompletten Entfärbung des Hintergrunds auf dem Horizontalschüttler bei RT geschüttelt. Durch Zugabe eines Zellstofftuches konnte der Entfärbeprozess beschleunigt werden. Gegebenenfalls wurde die Entfärbelösung mehrmals gewechselt. Nach der Entfärbung wurden die Gele für 10 min in Wasser inkubiert und dann auf dem Gelrockner auf Whatmanpapier für 2 Stunden bei 60-70°C getrocknet.

## 2.8.2 Western Blot

Um mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine spezifisch nachzuweisen, wurden Western Blots (Immunoblots) durchgeführt. Hierzu wurden die Proteine zunächst durch Elektroblooming auf eine PolySreen®Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (NEN/Perkin Elmer, Zaventem, Belgien) transferiert und dort immobilisiert. PVDF-Membranen sind hydrophob und besitzen eine hohe Bindekapazität für Biomoleküle. Die verwendete Membran hat eine Porengröße von 0,45 µm und ist für Proteine >10 kDa geeignet.

### 2.8.2.1 Puffer

#### Western Blot Transferpuffer

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
20 % (v/v) Methanol

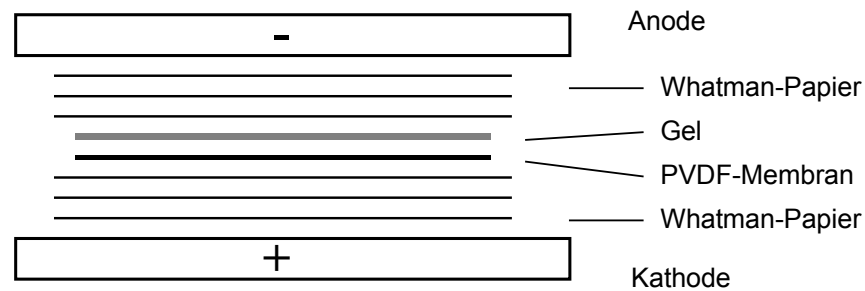
#### PBST

PBS + 0,1% (v/v) Tween-20

### 2.8.2.2 Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Spezies	Quelle	Verdünnung
65-33	pp65	Maus	W. Britt, USA	1:1000
JABmouse	JAB-1	Maus	Santa Cruz, Heidelberg	1:200
JABrabbit	JAB-1	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg	1:200
M2	Flag-Tag	Maus	Sigma, Deisenhofen	1:300

Die PVDF-Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und anschließend erst in Methanol p.a. und danach in Transferpuffer für jeweils einige Minuten äquibriert. Bei der Handhabung wurde besonderen Wert darauf gelegt, dass die Membran vorsichtig und nur mit Handschuhen berührt wurde. Sechs Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes Whatman-Papier wurden ebenfalls in Transferpuffer äquibriert. Anschließend wurde, wie in Abbildung 3 gezeigt, die Blotapparatur zusammgebaut, wobei besonders darauf geachtet wurde, dass sich keine Luftblasen zwischen den Lagen befanden.



**Abbildung 3:** Aufbau einer Western Blot-Apparatur

Bei einer Stromstärke von 400 mA wurde 75 min geblottet. Der vollständige Transfer der Proteine auf die Membran konnte durch die Verwendung eines vorgefärbten Molekulargewichtsstandards (SDS-7B, Sigma, Deisenhofen) kontrolliert werden.

Nach Transfer wurden freie Membranstellen durch Inkubation in 5 % (w/v) Milchpulver in PBST für mindestens 2 Stunden blockiert. Nach Zugabe des Primärantikörpers wurde der Blot für 1 Stunde bei RT oder üN bei 4°C geschwenkt. Der Primärantikörper wurde in PBST mit 5 % (w/v) Milchpulver verdünnt eingesetzt. Anschließend wurde durch dreimaliges Waschen mit PBST für jeweils 15 min überschüssiger Antikörper entfernt.

Die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte für 1 Stunde bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für jeweils 15 min wurde der Blot abschließend mit PBS gewaschen und danach mit Hilfe des Chemilumineszenzreagenz ECL+™ (Pharmacia Biotech, Freiburg) entwickelt.

Die Exposition gegen Biomax Röntgenfilme (Kodak, Sigma, Deisenhofen) erfolgte je nach Stärke des Signals für 10 sec –15 min.

### 2.8.3 Western Blot „Stripping“

Sollte ein Western Blot nach erfolgter Färbung ein zweites Mal mit einem anderen Primärantikörper gefärbt werden, wurden die auf der Membran befindlichen Antikörper durch 5-10 minütiges Schwenken in 0,2 M NaOH bei RT entfernt. Anschließend konnte eine erneute Färbung durchgeführt werden.

## 2.8.4 GST-Fällungsexperimente

Glutathion-S-Transferase (GST)-Fällungsexperimente werden dazu eingesetzt, um Interaktionen von Proteinen *in vitro* nachzuweisen. Ein Protein wird hierzu in Fusion mit GST exprimiert, der mögliche Interaktionspartner durch *in vitro* Transkription und Translation synthetisiert und dabei mit radioaktiven <sup>35</sup>S-Methionin markiert. Nach Inkubation der beiden Proteine kann das GST-Protein mit Hilfe der Glutathion-Sepharose gereinigt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen werden. Putative radioaktiv-markierte Interaktionspartner können nachfolgend durch Autoradiographie nachgewiesen werden.

### 2.8.4.1 Radioaktivität

EASYTAG™ Express Protein Labeling Mix NEG-772 (Perkin Elmer, Zaventem, Belgien) bestehend zu 73 % aus L-[<sup>35</sup>S] Methionin und 22 % L-[<sup>35</sup>S] Cystein

### 2.8.4.2 Kits

TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, Mannheim)

### 2.8.4.3 Sepharose

Glutathion Sepharose® 4B (PharmaciaBiotech, Freiburg)

### 2.8.4.4 Vektoren

pGEX-6P (PharmaciaBiotech, Freiburg)

pcDNA6V5His (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)

### 2.8.4.5 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
pGST (entspricht pGEX-6P-1)	Expressionsplasmid für GST
pGST-JAB	Expressionsplasmid für ein GST-JAB-1-Fusionsprotein
pGST-pp65	Expressionsplasmid für ein GST-pp65-Fusionsprotein
pcDNA-pp65	Plasmid zur <i>in vitro</i> Expression von pp65 unter Kontrolle des T7-Promotors
pcDNA-IE1	Plasmid zur <i>in vitro</i> Expression von IE1 unter Kontrolle des T7-Promotors
pcDNA-JAB	Plasmid zur <i>in vitro</i> Expression von JAB-1 unter Kontrolle des T7-Promotors

### 2.8.4.6 Puffer

#### ELB

50 mM HEPES pH 7,0

250 mM NaCl

0,1% (v/v) Nonidet P-40

0,5 mM EDTA

1 mM PMSF

#### ELB/BSA

ELB + 1 % (w/v) BSA

#### **2.8.4.7 Anzucht der Bakterien**

Zur Expression von GST-Fusionsproteinen wurde der *E.coli*-Stamm BL21 (DE3) verwendet. Dieser Stamm ist Proteasen-reduziert und eignet sich daher besonders gut für die Expression rekombinanter Proteine.

Mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte wurde eine 5 ml-Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 200 Upm üN geschüttelt. Am nächsten Tag wurde 1 ml dieser Kultur in 200 ml frisches LB<sub>amp</sub>-Medium überführt und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 2 im Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG).

Nach weiteren 2 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 6000 Upm und 4°C geerntet. Das Pellet wurde in 20 ml PBS mit 1 mM PMSF und 1 mM DTT resuspendiert. Zur Erhöhung der Löslichkeit wurde 1 % (v/v) Triton X-100 zugegeben.

#### **2.8.4.8 Reinigung der GST-Fusionsproteine**

Die Bakterien wurden durch dreimaliges Sonifizieren aufgeschlossen. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass die Bakteriensuspension immer gekühlt war. Zelldebris wurde durch 10 minütige Zentrifugation bei 9500 Upm und 4°C pelletiert. Zum Überstand wurden 400 µl GlutathionS-Sepharose, die zuvor zweimal mit ELB/BSA gewaschen worden war, zugegeben und anschließend für 90 min im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde bei 2500 Upm für 10 min abzentrifugiert und danach viermal mit ELB-Puffer gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in 400 µl ELB mit 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in 50 µl Aliquots bei -20°C eingefroren.

Zur Quantifizierung und Kontrolle der Reinigung wurden die aufgereinigten GST-Fusionsproteine mittels SDS-PAGE analysiert.

#### **2.8.4.9 *In vitro* Transkription und Translation**

Zur Herstellung der radioaktiv-markierten Proteine wurde der TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems Kit verwendet (Promega, Mannheim). Dazu wurden 1 µg DNA mit 40 µl TNT® Quick Master Mix, 2 µl EASYTAG™ Express Protein Labeling Mix mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt und für 2 Stunden bei 30°C im Wasserbad inkubiert.

#### **2.8.4.10 GST-Fällungstest**

Pro Ansatz wurden 50-100 ng des GST-Fusionsproteins in 200 µl ELB+BSA aufgenommen und mit 7 µl des *in vitro* TNT-Ansatzes üN bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sepharose dreimal mit ELB/BSA und dreimal mit ELB gewaschen. Dazu wurde 3 min bei 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert und danach in 1 ml Puffer resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand völlig entfernt, das Pellet

in 25 µl Laemmli-Puffer für 5 min bei 95°C aufgekocht und auf ein 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das Gel gefärbt und getrocknet. Die Detektion der radioaktiven Banden erfolgte durch Exposition gegen einen Screen (BAS-MP, Fujifilm, Düsseldorf) für 30 min oder durch Autoradiographie üN bei -70°C.

Screens wurden mit Hilfe eines Bio Imaging Analyzers (Fujifilm, Düsseldorf) ausgewertet.

## 2.9 Kultivierung von Säugerzellen

Sämtliche Arbeiten wurden an einer sterilen Werkbank unter Verwendung von sterilen Glas- und Plastikwaren durchgeführt, um Kontaminationen mit Pilzsporen und Bakterien zu verhindern. Alle Zellen wurden bei 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Zur Kultivierung wurden 25, 75 oder 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen von BD Falcon (Heidelberg) verwendet. Sterile Einmalplastikpipetten, Zellkulturschalen und 6-Well-Platten wurden ebenfalls von Falcon bezogen. 24-Well-Platten wurden von Costar Corning (Wiesbaden) bezogen.

Zentrifugationsschritte wurden soweit nicht anders erwähnt 5 Minuten bei 1200 Upm und Raumtemperatur in der Megafuge 2.0 durchgeführt.

Alle Zellkulturen wurden in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des Mykoplasmen Detection Kit von Roche (Mannheim) auf Mykoplasmenkontaminationen hin getestet. Bei positivem Testergebnis wurden die befallenen Zellen mit der Antibiotika-Kombination BM Cyclin (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben behandelt.

### 2.9.1.1 Puffer und Lösungen

Dulbecco's PBS (Phosphate Buffered Saline):

136 mM NaCl, 26 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Trypanblau 0,4 % in 85 % Kochsalzlösung

Trypsin/EDTA 0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA

### 2.9.1.2 Medien

Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden von Gibco BRL (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe), fötales Kälber Serum (FKS) von der Firma Biochrom, Berlin bezogen.

Sämtliche Zellkulturmedien enthalten Phenolrot als pH-Indikatorfarbstoff.

**MEM-5/10** Minimum Essential Medium mit 5/10% hitze-inaktiviertem FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin

**DMEM-10** Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 10% hitze-inaktiviertem FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin

<b>DMEM-10+</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 10% hitze-inaktiviertem FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, 2 mM Na-Pyruvat
<b>RPMI-10</b>	RPMI 1640 Medium mit 10% hitze-inaktiviertem FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin
<b>RPMI-10+</b>	RPMI 1640 Medium mit 10% hitze-inaktiviertem FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin, 5 µM β-Mercaptoethanol
<b>RPMI-10HS</b>	RPMI 1640 Medium mit 10% hitze-inaktiviertem humanem AB-Serum, 2 mM L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, 2 mM Na-Pyruvat
<b>Einfriermedium</b>	90% FKS, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

### 2.9.2 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Ausschlussverfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Die Zellmembran lebender Zellen ist bei kurzzeitiger Inkubation für Trypanblau undurchlässig, wogegen sich das Zytoplasma und der Zellkern toter Zellen stark blau anfärben. Die Zellsuspensionen wurden 1:2 mit Trypanblau verdünnt (bei hohen Zellzahlen erfolgte vorher eine 1:10 Verdünnung mit PBS) und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Milzzellen wurden vor dem Zählen im Verhältnis 1:1:2 mit Trypanblau und 4 % Essigsäure versetzt. Die Essigsäure führt zur Lyse der Erythrozyten, die das Zählergebnis beeinflussen.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{ZxVx10}^4)/\text{Q}$$

Z= Zellzahl, V=Verdünnungsfaktor, 10<sup>4</sup>=Kammerfaktor, Q=Anzahl der Eckquadrate

### 2.9.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Zellen können in flüssigem Stickstoff bei -172°C über mehrere Jahre aufbewahrt werden. Zur Lagerung wurden 5x10<sup>6</sup>-1x10<sup>7</sup> Zellen/ml in FKS mit 10 % DMSO in Kryoampullen aliquotiert und in einem Einfriergefäß über Nacht bei -70°C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Der Zusatz von DMSO zum Einfriermedium soll Zellschädigungen während des Einfrierens durch Scherkräfte der Eiskristalle so gering wie möglich halten. Auch die Verwendung eines Einfriergefäßes, welches ein gleichmäßiges Absinken der Temperatur um 1 K/min gewährleistet, vermindert die Bildung von Eiskristallen. Zur Rekultivierung wurden die Zellen bei 37°C aufgetaut, in angewärmtes Medium überführt und nach Abzentrifugation in frischem Medium ausgesät.

### 2.9.4 Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden je nach Wachstum und Bedarf 1:20 bis 1:100 gesplittet.

#### **2.9.4.1 T2 (174 x CEM.T2) ATCC CRL-1992**

T2 sind TAP-defiziente Hybride aus humanen B- und T-Zell-Lymphomen; HLA-A\*0201 (Salter *et al.*, 1985)

Medium: RPMI-10

#### **2.9.4.2 T2A2K<sup>b</sup>**

T2A2K<sup>b</sup> sind stabile Transfektanten der T2-Zellen, die ein chimäres MHC-Molekül exprimieren. Dieses MHC-Chimär besteht aus den  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ - Domänen des humanen HLA-A2 und aus der  $\alpha_3$ - Domäne des murinen K<sup>b</sup>.

Medium: RPMI-10 + 280  $\mu\text{g/ml}$  Geneticin (G418; Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)

#### **2.9.4.3 JA2**

JA2 sind stabile Transfektanten der humanen T-Zell-Linie Jurkat (ATCC TIB-152; Schneider *et al.*, 1977); sie tragen das HLA-A\*0201 Gen

Medium: RPMI-10 + 280  $\mu\text{g/ml}$  Geneticin (G418)

#### **2.9.4.4 K562-A2**

K562-A2 sind stabile Transfektanten der humanen chronisch myeloische Leukämie-Zell-Linie K562 (ATCC CCL-243; Lozzio & Lozzio, 1975); sie tragen das HLA-A\*0201 Gen (Britten *et al.*, 2002).

Medium: RPMI-10 + 280  $\mu\text{g/ml}$  Geneticin (G418)

### **2.9.5 Adhärente Zellen**

Adhärenz wachsende Zellen wurden gesplittet, sobald ein konfluenter Zellrasen vorlag. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 5 min mit Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C zur Ablösung vom Kulturgefäß inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in Verhältnissen von 1:2-1:5 in neue Kulturflaschen ausgesät.

#### **2.9.5.1 HFF (primäre humane Vorhautfibroblasten)**

Zur Isolierung von HFF wurden die nach operativen Eingriffen zur Verfügung gestellten Vorhäute von Neugeborenen oder Kleinkindern mechanisch zerkleinert. Durch 30 minütiges Rühren bei 37°C mit 0,5 % Trypsin/0,2 % EDTA und Glasperlen wurden die Zellen aus dem Gewebeverband gelöst. Anschließend wurden die Zellen durch steriles Mull filtriert und nach mehrmaligem Waschen in MEM-5 in Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden zwischen Passage 6 und 16 für Experimente verwendet.

Medium: MEM-5, je nach Wachstum auch MEM-10



### 2.9.5.2 MRC-5 (ATCC CCL-171)

MRC-5 sind humane Lungenfibroblasten aus einem männlichen Fötus der 14 Schwangerschaftswoche; HLA-A\*0201 (Jacobs *et al.*, 1970)

Medium: DMEM-10+

### 2.9.5.3 293T (293tsA1609neo)

293T sind humane embryonale Nierenzellen, die das große SV40 T-Antigen exprimieren. Dadurch unterstützen sie die episomale Replikation von Plasmiden, die den *Origin of Replication* (ori) des SV40 tragen (z.B. pcDNA, RSV). HLA-A\*0201 (Graham *et al.*, 1977 ; DuBridge *et al.*, 1987)

Medium: DMEM-10

### 2.9.5.4 HeLa (ATCC CCL-2)

HeLa sind humane Zervixkarzinomzellen, die Sequenzen des humanen Papillomvirus Typ 18 enthalten (Gey *et al.*, 1952).

Medium: MEM-10

## 2.9.6 Transfektion von Säugierzellen

### 2.9.6.1 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
pp65RSV	Expression von pp65 unter Kontrolle des RSV ( <i>Rous Sarcoma Virus</i> )-Promotors
pp65dRSV	Expression der pp65-Mutante d unter Kontrolle des RSV-Promotors
pp65dTARSV	Expression der pp65-Mutante dTA unter Kontrolle des RSV-Promotors
pp65 $\Delta$ NES	Expression von pp65 mit putativer NES-Mutation unter Kontrolle des RSV – Promotors
pp65-GFP	Expression eines pp65-GFP-Fusionsproteins; Ausgangsvektor: pEGFP-C1 (BD Bioscience Clontech, Heidelberg)
JAB-RFP	Expression eines JAB-1-RFP-Fusionsproteins; Ausgangsvektor: pDsRed-N1 (BD Bioscience Clontech, Heidelberg)
HTLV-1 Rex (entspricht FlagNLSRex)	Expression einer veränderten Form des HTLV-1 Rex-Proteins. Die N-terminale RXRE-RNA-Bindedomäne wurde durch die NLS des großen T Antigens von SV40 ersetzt (das Plasmid wurde freundlicherweise von U. Moll, New York, USA zur Verfügung gestellt; Shirangi <i>et al.</i> , 2002).
CANc (entspricht CANc-VSV-G)	Expression des C-terminalen Teils des CAN (das Plasmid wurde freundlicherweise von J. Hauber, Hamburg zur Verfügung gestellt; Rosorius <i>et al.</i> , 1999).

Transfektionen von Säugierzellen mit Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des PolyFect Reagenz (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Hersteller durchgeführt.

PolyFect besitzt eine spherische Struktur mit von einem zentralen Kern ausgehenden

Verzweigungen, die durch geladene Aminosäuren terminiert werden. Durch Mischung von einer mit Serum-freiem Medium verdünnten DNA-Lösung mit PolyFect kommt es zur Ausbildung von Komplexen, die durch die Zellen aufgenommen werden können. Diese Komplexe sind positiv geladen und können daher an negativ-geladene Rezeptoren (z. B. sialylierte Glykoproteine) der Zelle binden. In der Zelle inhibiert PolyFect durch seine Puffereigenschaften lysosomale Nukleasen. Dies führt zur Stabilisierung der PolyFect-DNA-Komplexe und stellt daher den Transport von intakter DNA zum Zellkern sicher.

### 2.9.7 Infektion

Zur Infektion mit HCMV wurden subkonfluent wachsende Fibroblasten in einem geringen Volumen mit Virusüberstand für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ausreichend Medium zugefügt und bis zur Verwendung weiter bei 37°C inkubiert.

In einigen Fällen wurden Fibroblasten 72 Stunden vor Infektion mit rekombinantem humanem IFN- $\gamma$  (R&D Systems, Wiesbaden) mit einer Konzentration von 100 U/ml vorbehandelt.

### 2.9.8 Aufreinigung von Viruspartikeln aus Zellkultur-Überstand

#### 2.9.8.1 Reagenzien

0,04 M Na-Phosphatpuffer	1,1 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O, 5,7 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O auf 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,4
35 % Na-Tartrat	207,5 g Na-Tartrat in 325 ml 0,04 M Na-Phosphatpuffer; autoklaviert
15 % Na-Tartrat/ 30 % Glycerin	88,9 % Na-Tartrat, 150 ml Glycerin, 275 ml 0,04 M Na-Phosphatpuffer; autoklaviert

Unter Verwendung eines positiven Dichte-/negativen Viskositäts-Gradienten Systems wurden die bei der Infektion entstehenden unterschiedlichen HCMV-Partikel (Virionen, *Dense Bodies* und NIEPs) aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt (Talbot & Almeida, 1977; Irmiere & Gibson, 1983). Zunächst wurden Zellen und Zelltrümmer aus dem Überstand infizierter HFF nach dem Erreichen eines zytopathischen Effekts (CPE) von 90-100 % durch Zentrifugation für 10 min bei 300xg abgetrennt. Die Partikel wurden im SW28 Rotor 70 min bei 23000 Upm und 4°C pelletiert und anschließend in 1 ml 0,04 M Na-Phosphatpuffer pro Röhrchen resuspendiert. Auf einen Gradienten, der aus 4 ml 35 % Na-Tartrat und 5 ml 15 % Na-Tartrat aufgebaut wurde, wurden je 2 ml der Virussuspension geschichtet. Die Auftrennung der verschiedenen Partikel erfolgte entsprechend ihrer Dichte durch Ultrazentrifugation für 60 min bei 23000 Upm ohne Bremse. Nach diesem Zentrifugationsschritt war im Durchlicht ein distinktes Bandenmuster zu erkennen: eine breite Bande von DB darüber eine dünne, scharfe Bande von Virionen und darüber nochmals eine

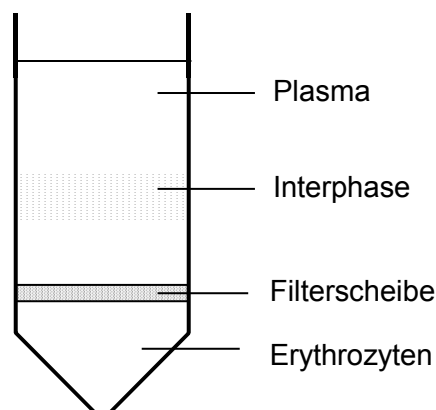
dünne Bande von NIEPs. Diese Banden wurden mit Hilfe von Kanülen abgezogen und für 70 min bei 23000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in PBS gelöst und bei –70°C gelagert.

### 2.9.9 Bestrahlung von DB

Zur Eliminierung der Rest-Infektiösität von DB-Präparationen, die durch Verunreinigungen durch Virionen verursacht wird, wurden diese Präparationen mit UV-Licht bestrahlt. Dazu wurden DB in einem Volumen von etwa 500 µl in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte gegeben und anschließend ohne Deckel mit UV-Licht (Wellenlänge: 254nm) für 10 min bestrahlt. Zur Kontrolle wurde von mit DB beladenen Zellen eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem IE-1-spezifischen Antikörper durchgeführt.

### 2.9.10 Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC)

Zur Reinigung von PBMC wurde entweder heparinisiertes, frisches Vollblut oder *Buffy coats*, ein bei der Blutspende anfallendes Erythrozyten-depletiertes Leukozytenkonzentrat, verwendet. Die *Buffy coats* wurden von der Blutbank Mainz zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 4:** Auftrennung der Blutbestandteile nach Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

Die Auftrennung erfolgte über einen Ficoll-Dichtegradienten. Dazu wurden 15 ml Ficoll (Biochrom, Berlin) in ein Leucosep-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) gegeben und durch kurze Zentrifugation unter die Filterscheibe gebracht. Anschließend wurden 35 ml Blut in das Röhrchen gegeben und bei 2200 Upm ohne Bremse zentrifugiert. Die leukozytenhaltige Interphase (siehe Abbildung 4) wurde vorsichtig abgezogen und mit RPMI-10 mehrmals gewaschen. Danach wurden die Zellen gezählt und zur Anlage humaner T-Zell-Linien verwendet oder in Aliquots von  $5 \times 10^7$  für spätere Versuche eingefroren.

### 2.9.11 Anlage und Kultivierung von humanen T-Zell-Linien

Zur Identifizierung eines neuen HLA-A2-präsentierten Epitops aus dem Immediate Early 1-

Protein wurden T-Zellkulturen von gesunden, seropositiven Blutspendern mit verschiedenen IE1-Peptiden angelegt.

#### **2.9.11.1 Spender**

Spender A: HLA Typ A\*0201, B55, B60, Cw3; Spender B: HLA Typ A\*0201, B51, B62, Cw9, Cw14

#### **2.9.11.2 Anlage**

Zur Anlage von humanen T-Zell-Linien wurden  $5 \times 10^7$  PBMC von gesunden HCMV-Antikörper-seropositiven, HLA-A\*0201 positiven Spendern verwendet und in 10 ml RPMI-10HS unter Zugabe von 15  $\mu\text{g}$  Peptid (Endkonzentration  $1,5 \times 10^{-6}$  M) kultiviert.

#### **2.9.11.3 PHA-Blasten**

Phytohämagglutinin (PHA-P) ist eine Mischung von aus den roten Kidneybohnen *Phaseolus vulgaris* isolierten Glykoproteinen. PHA-P stimuliert das Wachstum von Lymphozyten und ist in der Lage Erythrozyten zu agglutinieren.

Die zur Restimulation der T-Zell-Linien verwendeten PHA-Blasten wurden 3-10 Tage vor Restimulation durch Inkubation von  $5 \times 10^6$ - $10^7$  autologen PBMC mit 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PHA-P (Sigma, Deisenhofen) in RPMI-10 generiert.

#### **2.9.11.4 Restimulation**

Die T-Zell-Linien wurden einmal pro Woche restimuliert, um ihre Antigen-Spezifität zu erhalten. Dazu wurden  $10^6$  autologe PHA-Blasten abzentrifugiert und für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  mit 15  $\mu\text{g}$  Peptid in 1 ml inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 6000 rad in einer Cäsium-Quelle bestrahlt, um ihr weiteres Wachstum zu verhindern. Über Nacht erfolgte eine Kokultivierung der Peptid-beladenen, bestrahlten PHA-Blasten mit den T-Zellen in möglichst geringem Volumen, um die Wahrscheinlichkeit der Interaktion zu erhöhen. Am nächsten Morgen wurde mit frischem RPMI-10HS aufgefüllt und 20 U/ml rekombinantes humanes Interleukin-2 (PAN, Aidenbach) zur T-Zell-Proliferation zugegeben.

Nach 3-4 Restimulationen wurden die Zellen auf ihre Zytotoxizität im Chromfreisetzungstest überprüft. Die Lebensdauer einer auf diese Weise angelegten T-Zellkultur lag bei 6-10 Wochen.

### **2.9.12 Anlage von murinen T-Zell-Linien**

Für Untersuchungen der Prozessierung und Präsentation von pp65 sollte eine CTLL generiert werden. Da humane T-Zell-Linien oft nur kurzlebig sind (6-10 Wochen), wurden diese Zellen in Zusammenarbeit mit AG Theobald, Hämatologie und Onkologie, 3. Medizinische Klinik, Universität Mainz, in transgenen Mäusen generiert. Alle transgenen

Mäuse wurden ausgehend vom C57BL/6-Stamm gezüchtet.

### 2.9.12.1 Tiere

#### cA2K<sup>b</sup>

Diese Mäuse sind homozygot für ein chimäres transgenes MHC Klasse I-Molekül, das aus den  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ - Domänen des humanen HLA-A2 und aus der  $\alpha_3$ - Domäne des murinen K<sup>b</sup> besteht.

#### CD8xA2

Diese transgenen Mäuse sind homozygot für HLA-A\*0201 und heterozygot für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des humanen CD8.

#### C57BL/6

Diese Mäuse besitzen den H-2<sup>b</sup>- Haplotyp

### 2.9.12.2 Immunisierung

Zur Generierung von murinen T-Zell-Linien gegen Peptidpitope wurden transgene Mäuse im Alter von 8-10 Wochen mit dem jeweiligen Peptid immunisiert. Dazu wurden 100  $\mu$ g des Peptids und 120  $\mu$ g T-Helfer-Peptid (HBV Core<sub>128-140</sub>; bindet an I-A<sup>b</sup>) mit 50  $\mu$ l inkompletten Freund'schen Adjuvans (IFA; DIFCO, Detroit) auf Eis emulgiert und den Mäusen subcutan in die Schwanzwurzel injiziert (Theobald *et al.*, 1995). Das IFA überführt das Antigen in partikuläre Form, wodurch die Stabilität des Antigens im Körper erhöht und die Aufnahme durch Antigen-präsentierende Zellen (wie z.B. Makrophagen) gefördert wird.

Zur Herstellung der cA2K<sup>b</sup>pp65 CTL-Linie wurden die Mäuse mit 100  $\mu$ g DB, die mit 100  $\mu$ l IFA emulgiert worden waren, intraperitoneal immunisiert.

### 2.9.12.3 Herstellung von LPS-aktivierten B-Zellblasten

Lipopolysaccharide (LPS) sind ein Hauptbestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien. LPS induzieren die Synthese und die Sekretion wachstumsfördernder Faktoren wie z. B. Interleukine und haben daher starke immunstimulatorische Eigenschaften.

LPS-Blasten wurden als Antigen-präsentierende Zellen zur Anlage von Primärkulturen verwendet. Drei Tage vor Anlage einer Primärkultur wurden aus naiven Mäusen des immunisierten Stammes die Milzen entnommen, zerrieben und durch ein Sieb filtriert. Die auf diese Weise gewonnenen Milzzellen wurden zweimal gewaschen, gezählt und mit einer Zelldichte von 10<sup>6</sup>/ml in RPMI-10+ unter Zugabe von 25  $\mu$ g/ml LPS (aus *Salmonella typhosa*, Sigma, Deisenhofen) und 7 mg/ml Dextransulfat (Pharmacia Biotech, Freiburg) ausgesät.

### 2.9.12.4 Anlage einer Primärkultur

Zehn Tage nach Peptid-Immunisierung bzw. 14 Tage nach Immunisierung mit DB wurden

die Milzen entnommen und homogenisiert. Die Milzzellsuspension wurde zweimal gewaschen und anschließend mit einer Zellzahl von  $7 \times 10^6$ /ml/Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Als Stimulatorzellen wurden mit 3000 rad bestrahlte LPS-Blasten für 35 min mit 5 µg des Peptids und 5 µg humanem  $\beta_2$ -Mikroglobulin (Sigma, Deisenhofen) beladen, danach zweimal gewaschen und mit einer Zellzahl von  $3 \times 10^6$ /ml/Well zu den Milzzellen gegeben (Vitiello *et al.*, 1991; Sherman *et al.*, 1992, Theobald *et al.*, 1995).

Nach 6-7 Tagen wurden diese Kulturen einem Zytotoxizitätstest unterzogen.

#### **2.9.12.5 Restimulation**

Peptid-spezifische CTLL wurden einmal pro Woche restimuliert. Dazu wurden mit 20000 rad bestrahlte JA2-Zellen für 35 min mit 5 µg des Peptids und 5 µg humanem  $\beta_2$ -Mikroglobulin beladen und anschließend zweimal gewaschen. Die Effektorzellen wurden zusammen mit  $5 \times 10^5$  Peptid-beladenen JA2-Zellen und  $6 \times 10^6$  mit 3000 rad bestrahlten C57BL/6-Milzzellen in einem Gesamtvolumen von 2 ml/Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Zusätzlich wurde den Ansätzen 5 % (v/v) Überstand aus dem Kulturmedium Concanavalin A (aus *Canavalia ensiformis*, Gibco BRL, Karlsruhe)-aktivierter Milzzellen von Lewis-Ratten zugesetzt (Irwin *et al.*, 1989).

#### **2.9.13 Durchflusszytometrie/Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen.

### 2.9.13.1 Puffer

#### FACS-Puffer

PBS  
+ 0,4 % (w/v) BSA  
+ 0,03 % (w/v) NaN<sub>3</sub>  
10 mM EDTA  
20 mM HEPES  
sterilfiltriert

### 2.9.13.2 Antikörper

αHLA-A2 (Klon BB7.2), FITC gekoppelt (Becton Dickinson, Heidelberg)

αRattelnG<sub>2b</sub>, FITC gekoppelt (Becton Dickinson, Heidelberg)

αHLA-ABC (Klon W6/32) (Dako, Hamburg)

αMaus, FITC gekoppelt (Dako, Hamburg)

Für eine FACS-Analyse wurden  $1 \cdot 5 \times 10^5$  Zellen in FACS-Puffer gewaschen und dann in 30 µl FACS-Puffer mit 2 µl Antikörper für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Antikörper durch Waschen entfernt. In den Fällen, in denen der Primäantikörper nicht direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, wurde eine weitere 30 minütige Inkubation mit einem gegen den Fc-Teil des Primäantikörpers gerichteten, Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundäantikörper angeschlossen. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CellQuest Software.

### 2.9.14 HLA-A2 Stabilisierungsassay

MHC-Moleküle sind auf der Oberfläche von Zellen nur dann stabil, wenn sowohl β<sub>2</sub>-Mikroglobulin als auch Peptid gebunden sind. Andernfalls werden sie schnell internalisiert und abgebaut.

Zur Überprüfung der Fähigkeit von Peptiden, HLA-A2 auf der Oberfläche von Zellen zu stabilisieren, wurden TAP-defiziente, HLA-A2-positive T2-Zellen mit Peptid beladen und anschließend die HLA-A2-Oberflächenexpression mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert.

Dazu wurden  $2,5 \times 10^5$  T2-Zellen mit 100 µM Peptid in 250 µl RPMI für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des HLA-ABC spezifischen Antikörper W6/32 im FACS.

## 2.10 Immunologische Methoden

### 2.10.1 Chromfreisetzungstest

Die lytische Aktivität von zytotoxischen T-Zellen kann mit Hilfe des Chromfreisetzungstest (CFT) gemessen werden. Zielzellen werden mit radioaktivem Chrom markiert und mit Effektorzellen kokultiviert. Die in den Überstand freigesetzte Chromaktivität ist proportional zur Anzahl der lysierten Zellen und somit ein Maß für die Aktivität der T-Zellen.

#### 2.10.1.1 Radioaktivität

Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (Perkin Elmer, Zaventem, Belgien)

10<sup>6</sup> Zielzellen wurden abzentrifugiert und nach vollständigem Entfernen des Überstands in 20 µl FKS resuspendiert. Im Falle einer Peptidbeladung wurden außerdem 2 µl einer entsprechenden Peptidlösung zugegeben. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µCi <sup>51</sup>Cr für 60-90 min bei 37°C markiert. Durch dreimaliges Waschen wurde überschüssige Radioaktivität entfernt. Danach wurden die Zellen in 10 ml RPMI-10+ aufgenommen und mit 10<sup>4</sup> Zellen in 100 µl Medium pro *Well* ausgesät. Die Effektorzellen wurden gezählt, gewaschen und je nach Effektor/Zielzellverhältnis (E/Z) mit entsprechender Zellzahl eingestellt. Pro *Well* wurden 100 µl einer seriellen 1:3 Verdünnungsreihe in Duplikaten auspipettiert. Anschließend wurde der CFT für 4 Stunden (bei Peptid-beladenen Zielzellen) bzw. 5,5 Stunden (bei transfizierten/infizierten Zielzellen) bei 37°C inkubiert. Nach Abzentrifugation bei 1300 Upm und 4°C ohne Bremse wurden aus jedem *Well* 100 µl Überstand entnommen und in einem γ-Counter gemessen.

Als Kontrollen wurden zusätzlich je 4 Proben zur Bestimmung der Spontan- und der Maximallyse mitgeführt. Dazu wurde für die Maximallyse die <sup>51</sup>Cr-Aktivität von 100 µl Zellsuspension direkt und für die Spontanlyse der Überstand von Zielzellen ohne Effektorzellen gemessen.

#### Durchführung von CFT mit humanen T-Zellen

Da für die Durchführung von CFT mit humanen CTL nur wenige Effektorzellen zur Verfügung standen, wurden hier nur 10<sup>3</sup> Zielzellen pro *Well* in Triplets verwendet. Außerdem wurde das Peptid erst unmittelbar vor dem Aussäen der Zielzellen zugegeben und verblieb während des Tests im Medium. Zur Herstellung eines besseren Kontakts zwischen Effektor- und Zielzellen wurde vor der Inkubation bei 37°C ein 4 minütiger Zentrifugationsschritt bei 700 Upm durchgeführt.



Die spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{experimentelle } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}}{\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}} \times 100 = \% \text{ spezifische Lyse}$$

Die maximale  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung entsprach der gesamten  $^{51}\text{Cr}$ -Inkorporation durch die Zielzellen, die spontane  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung entsprach der Zielzell-Lyse in Abwesenheit von Effektorzellen und betrug in der Regel weniger als 20 % der maximalen  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung.

### 2.10.2 ELISpot (Enzyme linked immuno spot assay)

Der ELISpot wird dazu verwendet, Zytokin-sezernierende Zellen zu quantifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich IFN- $\gamma$ -ELISpot-Analysen durchgeführt. Bei diesem Versuch macht man es sich zu Nutze, dass CTL auf spezifischen Stimulus hin IFN- $\gamma$  sezernieren können. Eine 96-Well-Platte mit Nylonmembranboden wurde mit einem spezifischen IFN- $\gamma$ -Antikörper beschichtet. Anschließend wurden Effektor- und Zielzellen in dieser Platte kokultiviert und das sezernierte Zytokin durch einen weiteren Antikörper nachgewiesen. Eine nachfolgende Enzymreaktion führte zur Braunfärbung der Membran. Die Anzahl der Spots entsprach der Anzahl der Zytokin-sezernierenden Zellen (Taguchi *et al.*, 1990, Miyahira *et al.*, 1995).

#### 2.10.2.1 Puffer

##### Waschpuffer

PBS + 0,25 % (v/v) Tween-20

##### Puffer für Primärantikörper

Stammlösung A: 1,59 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  auf 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$

Stammlösung B: 2,93 g  $\text{NaHCO}_3$  auf 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$

Am Versuchstag wurde je 1 ml beider Stammlösungen mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 10 ml aufgefüllt und der pH-Wert auf 9,6 eingestellt

##### Puffer für Sekundärantikörper

PBS + 1 % (v/v) BSA-Lösung (23,3%; Ortho Diagnostic Systems, Neckargemünd)

##### 50 mM Na-Acetatpuffer, pH 5,0

74 ml 0,2 M Essigsäure (11,55 ml Eisessig/l) + 176 ml 0,2 M NaAcetat (27,2 g Na-Acetat x 3  $\text{H}_2\text{O}$ /l) auf 1 l  $\text{H}_2\text{O}$

**2.10.2.2 Antikörper**

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Quelle</b>	<b>Endkonzentration</b>
<b>Primärantikörper</b>	Ratte $\alpha$ Maus-IFN- $\gamma$ Klone RMMG-1	Biosource Europe, Solingen	10 $\mu$ g/ml
<b>Sekundärantikörper</b>	Biotin-gekoppelter Ratte $\alpha$ Maus-IFN- $\gamma$ Klone XMG 1.2	Pharmingen, Heidelberg	1 $\mu$ g/ml

Zum Absättigen der Membran der 96-Well-Nylonmembran-Platten (Nunc, Wiesbaden) wurden 50  $\mu$ l einer Verdünnung des Primärantikörpers pipettiert, die zuvor mit frisch angesetztem Karbonatpuffer auf eine Endkonzentration von 10  $\mu$ g/ml eingestellt worden war, und üN bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte viermal jeweils 15 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden freie Membranstellen durch Inkubation mit 200  $\mu$ l RPMI-10 pro Well für mindestens eine Stunde blockiert.

Die APZ wurden gezählt, gewaschen und auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^6$ /ml eingestellt. Die Effektorzellen wurden ebenfalls gezählt und gewaschen; in der Regel wurden 200 und 500 Zellen pro Well verwendet (d.h.  $4 \times 10^3$  bzw.  $1 \times 10^4$  Zellen/ml).

Nach der Blockierung wurde die Platte ausgeschlagen und 50  $\mu$ l RPMI-10 pro Well vorgelegt. Danach wurde jeweils 50  $\mu$ l der APZ und der Effektorzellen in Triplets zupipettiert und für 18-22 Stunden im Brutschrank bei 37°C kokultiviert. Im Falle einer Peptidbeladung wurde das Peptid kurz vor dem Aussäen zu den APZ zugegeben und verblieb während der Inkubationszeit im Medium.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen durch zehnmaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Anschließend wurde der Sekundärantikörper mit PBS + BSA auf 1  $\mu$ g/ml verdünnt, mit 50  $\mu$ l pro Well auspipettiert und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach fünf Waschschritten wurden 50  $\mu$ l eines Meerrettichperoxidase-Streptavidin-Konjugats, das zuvor 1:250 in Waschpuffer mit 5 % (v/v) FKS verdünnt worden war, in jedes Well gegeben und für weitere 2 Stunden belassen. Danach wurde die Platte erneut fünfmal gewaschen. Die Färbung der Spots erfolgte durch Zugabe des Meerrettichperoxidase-Substrats 3-Amino-9-Ethyl-Carbozol (AEC, Sigma, Deisenhofen). Dazu wurden 20 mg AEC in 2,5 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst, mit 47,5 ml 50 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,0 gemischt, filtriert und mit 25  $\mu$ l 30 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt. In jedes Well wurden 50  $\mu$ l pipettiert. Die Farbreaktion wurde nach ca. 10 min durch Waschen mit H<sub>2</sub>O gestoppt. Schließlich wurde die Membran von der Platte abgezogen und getrocknet. Die Auswertung erfolgte bei 10 facher Vergrößerung im Mikroskop.

### 2.10.2.3 ELISpot mit humanen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

Zur Bestimmung der Vorläuferfrequenzen von P6-oder pp65<sub>495-503</sub>-spezifischen T-Zellen im Blut gesunder, HCMV-seropositiver Spender wurden aus frisch isolierten oder nach Kryokonservierung rekultivierten PBMC aus Buffy Coats CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit Hilfe des CD8-MACS-Separation-Systems nach Herstellerangaben separiert (Miltenyi, Bergisch Gladbach). Die Effektorzellen wurden in Tripletts mit 75000 APZ koinkubiert. Für *ex vivo* Analysen wurden HLA-A2-transgene K562-A2-Zellen als APZ verwendet, um die Alloreaktivität zu reduzieren (Britten *et al.*, 2002). Die für ELISpots mit humanen T-Zellen verwendeten Multiscreen HA Platten wurden von Millipore GmbH (Schwalbach), die verwendeten  $\alpha$ -human IFN- $\gamma$ -Antikörper 1-D1K und 7-B6-1 von Mabtech AB (Hamburg) bezogen. Entwicklung der Spots erfolgte mit Hilfe des Vectastain Elite Peroxidase Kits (Vector Labs, Alexis, Grünberg). Die Auswertung wurde unter Verwendung der *computer-assisted video image analysis* (CVIA, Zeiss-Kontron, Jena) durchgeführt.

### 2.10.3 Immunfluoreszenz

Zum mikroskopischen Nachweis von Proteinen in Zellen wurden diese mit spezifischen Antikörpern angefärbt.

Zu diesem Zweck wurden adhärenente Zellen auf mit Aceton gereinigten Deckgläschen kultiviert, Suspensionszellen durch Zentrifugation auf Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die Zellen 5 min in 90 % Aceton fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37°C. Überschüssiger Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen entfernt. Nachfolgend wurde das Präparat mit einem gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichteten, Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde 1:50 in PBS verdünnt, zur Gegenfärbung wurde zusätzlich Evans Blau in einer 1:50-Verdünnung zugesetzt und für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde das Präparat mehrmals gewaschen und mit Eindeckmittel auf Objektträger überführt.

### 2.10.4 Immunfluoreszenzfärbung für die Laser-Scan-Mikroskopie

#### 2.10.4.1 Fixierung

4 % (w/v) Paraformaldehyd bei 80 °C in PBS gelöst

#### 2.10.4.2 Blockierung

3 % (w/v) BSA in PBS-Triton X-100

#### **2.10.4.3 Puffer**

PBS + 0,1 % (v/v) Triton X-100

#### **2.10.4.4 Primärantikörper**

Maus  $\alpha$ pp65 65-33 (W. Britt, Birmingham, Alabama, USA)

Maus  $\alpha$ SCP (W. Britt, Birmingham, Alabama, USA)

Kaninchen  $\alpha$ JAB-1 (Santa Cruz, Heidelberg)

#### **2.10.4.5 Sekundärantikörper**

Ziege  $\alpha$  Maus Alexa Fluor 488 F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Molecular Probes, Mo Bi Tec, Göttingen)

Ziege  $\alpha$  Kaninchen Cy<sup>TM</sup>3 F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg)

Zur Herstellung von Präparaten für die Laser-Scan-Mikroskopie wurden die Zellen in 4-Kammerdeckgläsern (NUNC, Wiesbaden) ausgesät. Die Kammerdeckgläser wurden zuvor für 30 min mit einer Poly-D-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml; Sigma, Deisenhofen) behandelt. Vor der Färbung mit spezifischen Antikörpern erfolgte eine Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd in PBS für 5 min. Anschließend wurde durch eine einstündige Inkubation mit 3 % BSA in PBS-Triton blockiert. Der Primärantikörper wurde in Blocklösung verdünnt und für eine Stunde bei RT auf dem Präparat belassen. Nach zweimaligem Waschen wurde mit einer in Blocklösung hergestellten Sekundärantikörper-Verdünnung (1:200) für eine Stunde bei RT inkubiert. Eine DNA-Anfärbung erfolgte durch Zusatz von 1:1000 Höchst-Färbelösung (Sigma, Deisenhofen) für 5 min. Nach abschließendem Waschen wurden die Präparate zum Schutz vor Austrocknen mit Eindeckmittel (Meridian Diagnostics Inc., Ohio, USA) überschichtet. Die Analyse der Präparate wurde von Dr. D. Strand, I. Medizinische Klinik, Universität Mainz am Laser Scan Mikroskop 510 (Zeiss, Jena) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen zur Prozessierung und Präsentation von pp65 mit Hilfe von murinen zytotoxischen T-Lymphozyten-Linien

Der Verlauf einer HCMV-Infektion wird wesentlich durch die Immunkompetenz des Wirtes bestimmt. Zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) kommt eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung der viralen Infektion zu (Reusser *et al.*, 1991; Walter *et al.*, 1995). Obwohl HCMV für mehr als 200 Proteine kodiert, fokussiert sich die CTL-Antwort auf nur wenige Proteine. Als dominantes CTL-Antigen wurde neben IE1, gB und pp150 in erster Linie das Tegumentprotein pp65 beschrieben (McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1996; Boppana & Britt, 1996). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Frage, welche Faktoren für die Immundominanz des pp65 verantwortlich sind.

Die Analyse der Antigenprozessierung und Präsentation von pp65 sollte mit Hilfe pp65-spezifischer CTL als Testsystem durchgeführt werden. Diese CTL sollten über längeren Zeitraum kultivierbar sein und Zielzellen mit gleichbleibender, reproduzierbarer Sensitivität erkennen. Humane T-Zellen aus peripherem Blut haben in Kultur oft nur eine begrenzte Lebensdauer von wenigen Wochen. Zudem ist die Qualität dieser T-Zellen von der Konstitution des Spenders zum Zeitpunkt der Blutspende abhängig und kann daher stark schwanken. Aus diesem Grund wurden durch Peptidimmunisierung in HLA (*human leucocyte antigen*)-transgenen Mäusen pp65-spezifische T-Zell-Linien generiert, die über mehrere Jahre in Zellkultur stabil sind.

Für die Analysen zur Antigenprozessierung von pp65 wurde das HLA-Allomorph A2 als Modellsystem gewählt. HLA-A2 ist mit einer Frequenz von 30 % eines der häufigsten Allomorphe in der kaukasischen Bevölkerung (Schipper *et al.*, 1997). Ein dominantes, im Kontext von HLA-A2 präsentiertes Peptid aus pp65 war zu Beginn der Arbeiten bekannt (AS 495-503; Wills *et al.*, 1996, Diamond *et al.*, 1997). Pp65<sub>495-503</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen können bei mehr als 70 % der HLA-A2-positiven, HCMV-seropositiven Spender im peripheren Blut nachgewiesen werden (Kern *et al.*, 2000, Khan *et al.*, 2002).

##### 3.1.1 Messung von T-Zell-Aktivität

Es gibt mehrere Verfahren, um die durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ) induzierte Aktivität von CTL zu messen. Erkennt die T-Zelle das angebotene Antigen als ihre spezifische Zielstruktur, wird die Proliferation der Zelle, die Sekretion von Zytokinen und in der Folge die Lyse der APZ induziert.

Für die Untersuchung dieser Funktionen stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Die durch Antigen-Stimulus induzierte Proliferation von CTL kann über den Einbau von

radioaktivem  $^3\text{H}$ -Tritium quantifiziert werden. Bei dieser Methode ist die eingebaute Radioaktivität zur Proliferationsrate der T-Zellen proportional.

Eine weitere Reaktion von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ist die Sekretion bestimmter Zytokine, wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$ . Während im ELISA lediglich die Menge an sezernierten Zytokinen gemessen werden kann, eignet sich der ELISpot zur Bestimmung der Anzahl an T-Zellen innerhalb einer Population, die auf Stimulierung mit Antigen mit Sekretion von Zytokinen reagiert. Dazu werden APZ und T-Zellen in einer Platte mit Nylonmembranboden kokultiviert. Die Zytokine, die während der Kokultivierung sezerniert werden, können durch spezifische Antikörper angefärbt werden und sind auf der Membran als Punkt erkennbar. Dabei entspricht die Anzahl der Punkte der Anzahl der Zytokin-sezernierenden T-Zellen. Jedoch geht nicht in jedem Falle die Sekretion von Zytokinen mit einer lytischen Aktivität der CTL einher. Die Lyse von Virus-infizierten Zellen oder Tumorzellen ist jedoch die wichtigste Funktion von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Die Zelllyse wird durch die Ausschüttung des Poren-bildenden Perforins und Granzymen oder die Expression des Apoptose-induzierenden FAS-Liganden hervorgerufen. Diese Aktivität kann im Chromfreisetzungstest (CFT) gemessen werden. Dazu werden APZ mit radioaktivem Chrom markiert und mit T-Zellen kokultiviert. Durch Lyse der APZ kommt es zu einer Freisetzung des radioaktiven Chroms. Dabei ist die Menge des freigesetzten Chroms proportional zur Anzahl lysierter Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich CFT und ELISpot-Tests zur Messung der T-Zell-Aktivität eingesetzt.

### **3.1.1.1 Generierung von Zielzellen**

Für beide Methoden können je nach Fragestellung verschiedene Zielzellen verwendet werden, die klar unterschieden werden müssen.

#### **Exogene Peptidbeladung**

Zielzellen können exogen durch synthetisches Peptid beladen werden. Die Zugabe erfolgt in hohem Überschuss, so dass es zu einer Konkurrenz zwischen dem zugegebenen Peptid und den zelleigenen Peptiden kommt, die nach endogener Prozessierung von zellulären Proteinen an MHC-Moleküle der Zielzellen gebunden auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Abbildung 5 A). Die Zugabe von synthetischen Peptiden setzt keine endogene Prozessierung des Zielproteins oder Modifikation des Peptids durch Peptidasen voraus. In der Regel werden für die Peptidbeladung T2-Zellen verwendet, da diese Zellen aufgrund ihrer TAP-Defizienz nur wenige zelleigene Peptide auf ihrer Oberfläche präsentieren können und dadurch geringere Konzentrationen des synthetischen Peptids zur Konkurrenz benötigt werden.

## **Endogene Prozessierung**

Für Untersuchungen zur Prozessierung ist es notwendig, das vollständige Protein in die Zelle zu bringen. Im Gegensatz zur exogenen Beladung mit Peptid ist hier eine funktionierende Prozessierungsmaschinerie Voraussetzung. Das antigene Peptid muss aus dem Protein durch Degradation freigesetzt, anschließend durch TAP in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert und dort auf naszierende MHC Klasse I-Moleküle geladen werden. Im ER wird das Peptid von Aminopeptidasen meist auf eine Länge von neun Aminosäuren verkürzt. Vom ER aus gelangt der Komplex aus MHC-Molekül,  $\beta_2$ -Mikroglobulin und Peptid durch den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche.

Pp65 kann auf unterschiedliche Weise in Zielzellen eingebracht werden, die unterschieden werden müssen.

### Endogene Prozessierung nach Infektion

Pp65 ist Bestandteil des Teguments von HCMV-Virionen und Hauptbestandteil der *Dense Bodies* (DB). Nach Inkubation von Zellen mit Virionen oder DB kommt es durch Aufnahme der Partikel durch Membranfusion zur Translokation von pp65 in die Zelle. Das Protein kann in der Folge direkt in den MHC Klasse I-Prozessierungsweg eingeschleust werden (Abbildung 5 B). Dieser Vorgang ist unabhängig von der Neusynthese des Proteins.

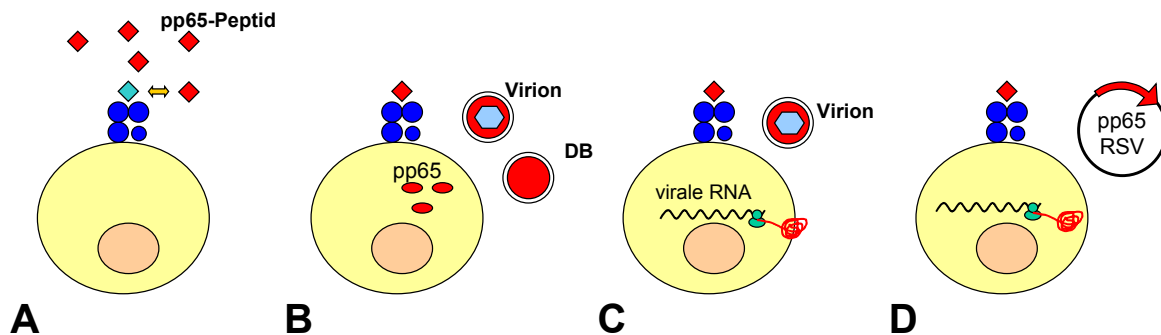
In der späten Phase der Infektion (d.h. ab Tag 3 nach Infektion) kommt es in infizierten Zellen zur Neusynthese des Tegumentproteins. Auch dieses im Rahmen der Virusinfektion synthetisierte pp65 ist eine mögliche Quelle für die Entstehung antigener Peptide (Abbildung 5 C). Unklar ist, ob sich die Prozessierungswege des durch Viruspartikel eingebrachten und des neusynthetisierten pp65 unterscheiden. Aus diesem Grund musste zwischen beiden Fällen differenziert werden.

Zur Infektion mit HCMV oder Beladung mit DB wurden in dieser Arbeit sowohl humane embryonale Lungenfibroblasten (MRC-5) als auch humane Vorhautfibroblasten (HFF) verwendet.

### Endogene Prozessierung nach Transfektion

Neusynthese von Protein wird auch durch transiente Expression nach Transfektion von Zielzellen mit Plasmiden erreicht. Dabei wird ein Plasmid in die Zelle eingebracht, das für das zu untersuchende Zielprotein kodiert (Abbildung 5 D). Die Synthese von pp65 erfolgt hier unabhängig von anderen viralen Proteinen und erreicht etwa 48-72 Stunden nach Transfektion ihr Maximum. Die Expression des Proteins ist abhängig vom Promotor des verwendeten Plasmids. In dieser Arbeit wurden Plasmide verwendet, die die Expression des pp65-Gens unter Kontrolle des RSV (*Rous-Sarcoma-Virus*)-Promotors oder des *Major Immediate Early*-Promotors von HCMV ermöglichten. Alle Plasmide trugen zusätzlich den

Ursprung der DNA-Replikation von Simian-Virus 40 (SV40ori). Zur Transfektion wurde die humane Nierenzelllinie 293T benutzt, die das große T-Antigen des SV40 exprimiert und so eine Replikation SV40 ori tragender Plasmide ermöglicht.



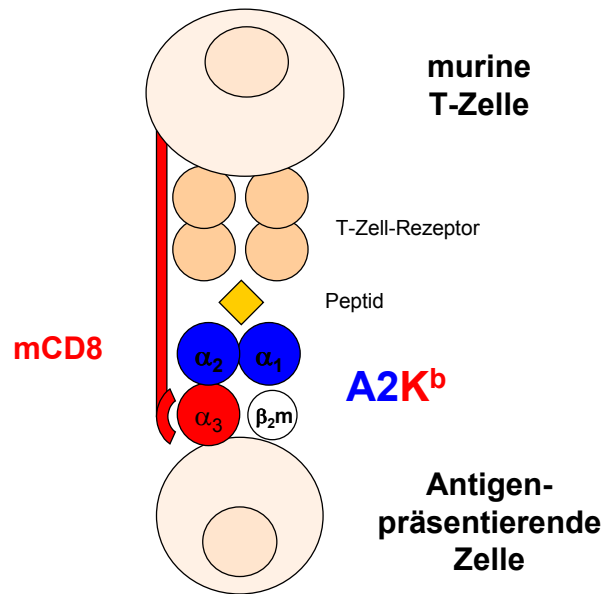
**Abbildung 5:** Schematische Darstellung verschiedener Zielzellarten für ELISpot und CFT **A:** Exogene Beladung mit synthetischem Peptid führt zu einer Konkurrenz mit den auf MHC Klasse I präsentierten zellulären Peptiden. In diesem Fall ist keine endogene Prozessierung von pp65 notwendig. **B-D:** Präsentation von pp65<sub>495-503</sub> nach endogener Prozessierung **B:** pp65 wird durch Virionen oder DB in die Zelle eingebracht **C:** Expression von pp65 im Rahmen der HCMV-Infektion **D:** Expression von pp65 nach Transfektion mit einem pp65-Expressionsplasmid.

### 3.1.2 Herstellung einer pp65-spezifischen CTL-Linie aus der $cA2K^b$ -transgenen Maus

Zur Herstellung einer murinen CTL-Linie (CTL), die gegen das HLA-A2-präsentierte Peptid pp65<sub>495-503</sub> gerichtet sein sollte, wurden  $cA2K^b$ -Mäuse mit diesem Peptid oder mit DB immunisiert. Diese Mäuse tragen ein transgenes MHC-Molekül, das aus der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne des humanen HLA-A2-Moleküls und der  $\alpha_3$ -Domäne des murinen  $K^b$  besteht (Abbildung 6). Die  $\alpha_3$ -Domäne interagiert mit dem CD8-Molekül der T-Zellen, wodurch die Bindung der T-Zelle an die APZ verstärkt wird.

Zehn Tage nach Immunisierung mit Peptid bzw. 14 Tage nach Immunisierung mit DB wurden die Milzen der Mäuse entnommen, homogenisiert und mit Peptid-beladenen Stimulatorzellen kokultiviert. Auf diese Weise konnten durch Immunisierung sowohl mit DB als auch mit Peptid CTL gewonnen werden, die gegen das Epitop pp65<sub>495-503</sub> gerichtet waren. Zur Etablierung einer pp65<sub>495-503</sub>-spezifischen CTL wurden die aus der Immunisierung mit DB hervorgegangenen CTL zur weiteren wöchentlichen Restimulation eingesetzt, da diese CTL im Vergleich zu den durch Peptidimmunisierung generierten CTL eine deutlich höhere lytische Aktivität pp65<sub>495-503</sub>-beladener Zielzellen zeigten. Diese CTLL wird im Folgenden als  $cA2K^b$ pp65 bezeichnet.





**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Wechselwirkung einer murinen CD8<sup>+</sup>-T-Zelle mit einer APZ, die das chimäre MHC-Molekül A2K<sup>b</sup> trägt. Dieses MHC-Molekül besteht aus der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne des humanen HLA-A2-Moleküls und der  $\alpha_3$ -Domäne des murinen K<sup>b</sup>.  $\beta_2m$ :  $\beta_2$ -Mikroglobulin, mCD8: murines CD8-Molekül.

### 3.1.2.1 Charakterisierung der CTLL $\alpha_2K^b$ pp65

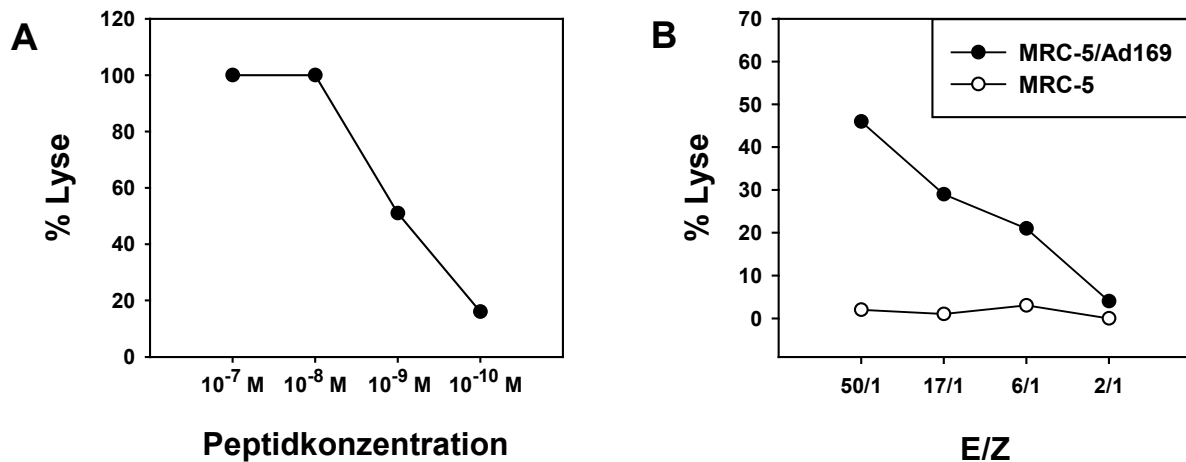
Zur Charakterisierung der CTLL  $\alpha_2K^b$ pp65 wurden Spezifität und Qualität der T-Zellen in einem CFT überprüft. Dazu wurden TAP-defiziente T2-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Peptid pp65<sub>495-503</sub> beladen und als Zielzellen eingesetzt (Abbildung 7 A). Bei einem Effektor- zu Zielzellverhältnis (E/Z) von 30 zu 1 wurden Zellen, die mit  $10^{-7}$  M und  $10^{-8}$  M Peptid beladen worden waren, zu 100 % lysiert. Bei gleichem E/Z wurden auch mit  $10^{-10}$  M Peptid beladene Zellen noch zu 20 % lysiert, während T2-Zellen ohne Peptid nicht lysiert wurden. Die halbmaximale Lyse lag bei einer Peptidkonzentration von ca.  $10^{-9}$  M.

Um zu überprüfen, ob die CTLL  $\alpha_2K^b$ pp65 auch in der Lage war, HCMV-infizierte Zellen und damit endogen prozessiertes pp65<sub>495-503</sub> zu erkennen, wurden die humanen HLA-A2-positiven Fibroblasten MRC-5 mit dem Laborstamm Ad169 infiziert und als Zielzellen verwendet. Dazu wurden die Fibroblasten drei Tage vor Infektion mit IFN- $\gamma$  vorbehandelt, um die MHC Klasse I-Oberflächenexpression zu verstärken. 16 Stunden vor Beginn des CFT wurden die Zellen mit einer moi (*multiplicity of infection*) von 5-10 infiziert.

Bei einem E/Z von 50 zu 1 wurden 46 % der Zielzellen lysiert (Abbildung 7 B); die Fähigkeit, die infizierten Zellen zu lysieren, fiel aber mit sinkendem E/Z stark ab. Bei einem E/Z von 2 zu 1 war nur noch eine sehr geringe lytische Aktivität messbar. Nicht-infizierte Fibroblasten wurden nicht erkannt.

Die Versuche zeigten, dass die durch Immunisierung mit DB generierte CTLL aus der  $\alpha_2K^b$ -Maus spezifisch pp65<sub>495-503</sub>-präsentierende Zellen lysierte. Es wurden sowohl exogen mit

Peptid beladene als auch infizierte Zellen erkannt. Die  $\alpha$ 2K<sup>b</sup>pp65 zeigten ausreichende Sensitivität, Zielzellen zu erkennen, die das HLA-A2-bindende Peptid pp65<sub>495-503</sub> nach endogener Prozessierung von pp65 präsentierten.



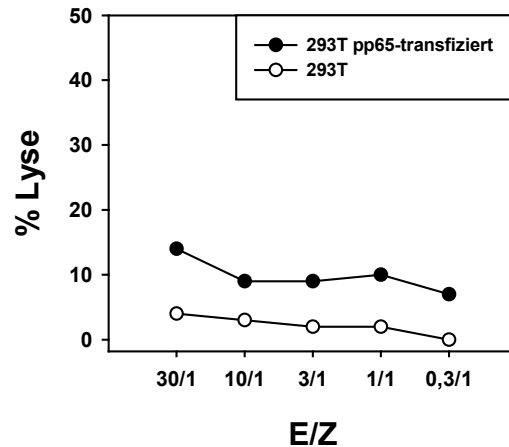
**Abbildung 7:** Charakterisierung der CTLL  $\alpha$ 2K<sup>b</sup>pp65. **A:** TAP-defiziente T2-Zellen wurden, mit verschiedenen Peptidkonzentrationen beladen, als Zielzellen in einem 4 Stunden CFT eingesetzt.  $\alpha$ 2K<sup>b</sup> wurden als Effektoren mit einem E/Z von 30/1 verwendet. **B:** MRC-5 wurden nach einer 72stündigen IFN- $\gamma$ - Vorbehandlung mit Ad169 mit einer moi von 5-10 infiziert und als Zielzellen in einem 5,5 Stunden CFT verwendet. Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte MRC-5.

### 3.1.2.2 Erkennung von transfizierten Zellen

Die Präsentation von pp65-Peptiden auf HCMV-infizierten Zellen erfolgt auch unter Blockierung der viralen Genexpression durch die Behandlung der Kultur mit Hemmstoffen (Riddell *et al.*, 1991a; McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994). Da in der frühen Phase der Infektion noch kein pp65 exprimiert wird, ist anzunehmen, dass die Erkennung infizierter Zellen 16 Stunden nach Infektion (*post infection*, p.i.) ebenfalls auf durch Viruspartikel eingebrachtes pp65 zurückzuführen ist. Um zu klären, ob auch neusynthetisiertes pp65 prozessiert und präsentiert wird und so zu einer Erkennung durch  $\alpha$ 2K<sup>b</sup>pp65 führt, wurden die humanen Nierenzellen 293T mit dem pp65-Expressionsplasmid pp65RSV transfiziert und zwei Tage nach Transfektion im CFT eingesetzt.

Aus Abbildung 8 wird deutlich, dass die Erkennung der pp65-exprimierenden Zellen bei allen E/Z nur bei ungefähr 10 % lag. Die parallel dazu durchgeführte Immunfluoreszenzfärbung der Zellen zeigte jedoch eine starke Expression von pp65 in mehr als 90 % der Zellen.

Für die trotz der deutlichen Expression des pp65 schwache Erkennung der transfizierten Zielzellen sind zwei Erklärungen denkbar. Es ist möglich, dass endogen synthetisiertes pp65 in 293T Zellen schlecht prozessiert und präsentiert wird. Eine andere Erklärung wäre die fehlende Wechselwirkung des murinen CD8-Moleküls mit der  $\alpha$ <sub>3</sub>-Domäne des HLA-A2-Moleküls als Ursache für die unzureichende Erkennung von transfizierten Zellen durch  $\alpha$ 2K<sup>b</sup>pp65.

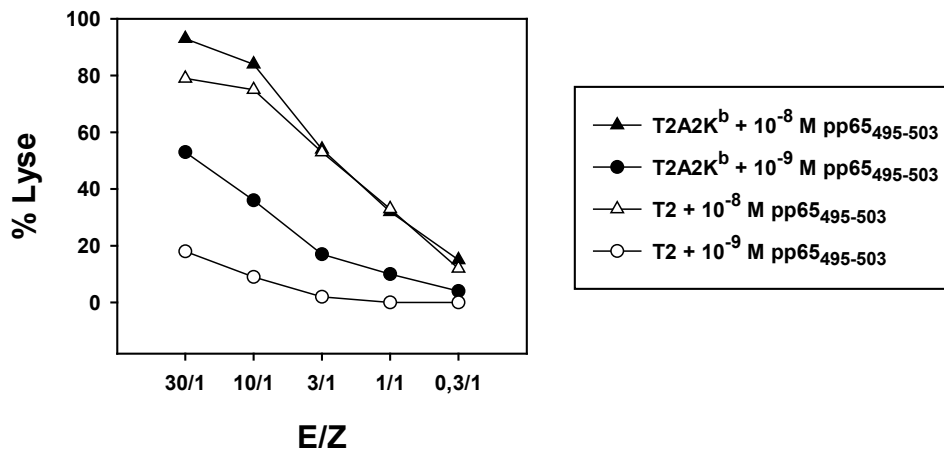


**Abbildung 8:** Lyse von pp65-exprimierenden 293T-Zellen. 293T-Zellen wurden 2 Tage vor Verwendung im CFT mit dem pp65-Expressionplasmid pp65RSV transfiziert und in den angegebenen E/Z mit der CTLL  $\alpha$ 2K<sup>b</sup>pp65 für 5,5 Stunden kokubiert. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte 293T-Zellen.

### 3.1.2.3 Vergleich der Erkennung von Peptid-beladenen T2- und T2A2K<sup>b</sup>-Zellen

Zur Klärung der Frage, ob die geringe Lyse von pp65RSV-transfizierten Zellen durch die fehlende Interaktion des murinen CD8-Moleküls mit HLA-A2 begründet werden kann, wurden T2 und die A2K<sup>b</sup>-Transfektante dieser Zelllinie (T2A2K<sup>b</sup>) mit zwei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen beladen und als Zielzellen im CFT verwendet. T2-Zellen tragen das HLA-A2 Molekül, während T2A2K<sup>b</sup> zusätzlich eine Chimäre aus murinem MHC und humanen HLA-A2 exprimieren (Abbildung 6).

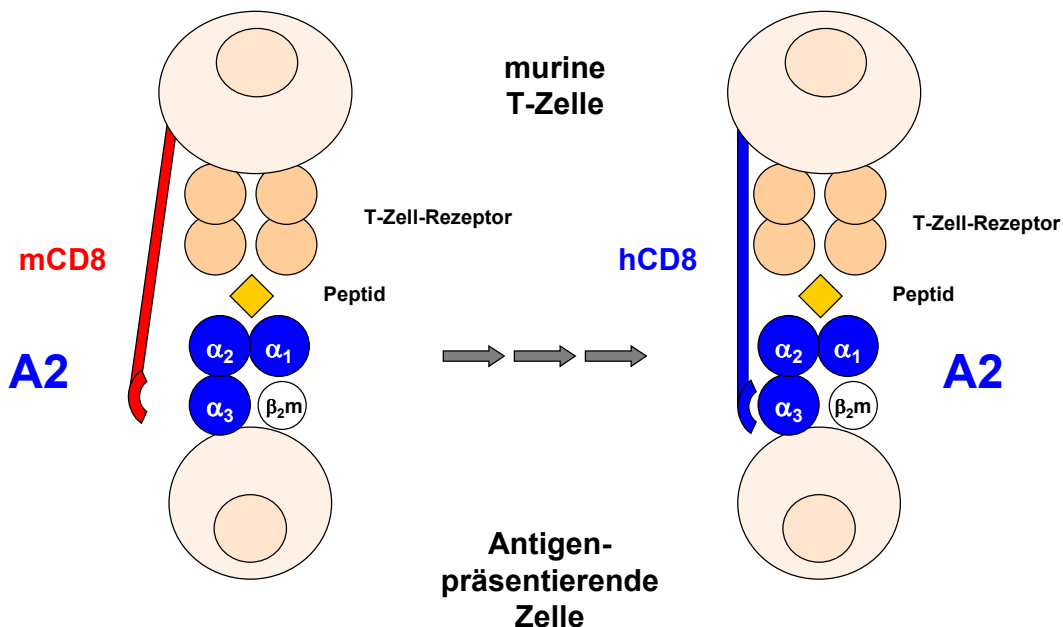
Aus Abbildung 9 wird deutlich, dass bei hohen Peptidkonzentrationen das präsentierende MHC-Molekül keine entscheidende Rolle spielte. Sowohl T2- als auch T2A2K<sup>b</sup>-Zellen, die mit  $10^{-8}$ M pp65<sub>495-503</sub> beladen worden waren, wurden bei einem E/Z von 30 zu 1 mit 80 bzw. 90 % erkannt. Mit  $10^{-9}$  M Peptid beladene T2A2K<sup>b</sup>-Zellen wurden bei gleichem E/Z zu 50 % lysiert, da in diesem Fall eine Interaktion des murinen CD8-Moleküls mit der  $\alpha_3$ -Domäne des präsentierenden MHC-Chimärs die Bindung der T-Zelle an die APZ unterstützte. Im Gegensatz dazu führte bei T2-Zellen, die ebenfalls mit  $10^{-9}$  M Peptid beladen waren, die fehlende Wechselwirkung des murinen CD8-Moleküls mit dem humanen MHC-Molekül ganz offensichtlich zu einer Reduktion der Lyse auf 20 %. Dieser Versuch demonstrierte, dass die Wechselwirkung des CD8-Moleküls der T-Zelle mit der  $\alpha_3$ -Domäne des präsentierenden MHC-Moleküls eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Zielzellen spielt. Eine fehlende Interaktion kann allerdings durch höhere Peptidkonzentrationen kompensiert werden. Dies ist auch eine Erklärung dafür, dass pp65-transfizierte Zellen, die durch endogene Prozessierung des Proteins vermutlich nur eine begrenzte Menge an Peptid zur Präsentation generieren, nur schlecht erkannt wurden.



**Abbildung 9:** Abhängigkeit der Lyse vom Peptid-präsentierenden MHC-Molekül. In einem 4stündigen CFT wurden T2 und A2K<sup>b</sup>-transgene T2A2K<sup>b</sup> mit 10<sup>-8</sup> und 10<sup>-9</sup> M pp65<sub>495-503</sub> beladen und als Zielzellen eingesetzt. Als Effektoren wurden cA2K<sup>b</sup>pp65 mit den angegebenen Effektor- zu Zielzellverhältnissen verwendet.

### 3.1.3 Herstellung einer CTLL aus der CD8xA2-transgenen Maus

Da die aus der cA2K<sup>b</sup>-transgenen Maus generierten pp65-spezifischen T-Zellen aufgrund der fehlenden Interaktion zwischen murinem CD8-Molekül und  $\alpha_3$ -Domäne des HLA-A2 transfizierte humane Zielzellen nur bedingt erkannten (siehe 3.1.2.2 und 3.1.2.3), sollte durch Immunisierung von für HLA-A2 und das humane CD8 doppelt-transgenen Mäusen sensitivere CTLL gewonnen werden (Abbildung 10).

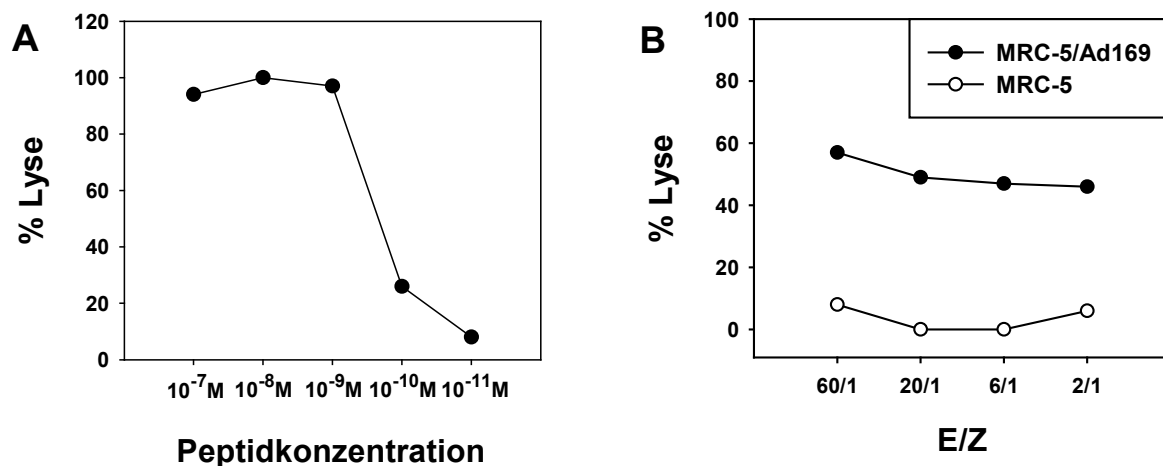


**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der Wechselwirkung von verschiedenen murinen CTL mit HLA-A2-positiven APZ. Bei cA2K<sup>b</sup> CTL kann das murine CD8-Molekül nicht an die  $\alpha_3$ -Domäne des humanen HLA-A2 binden (links). Das humane CD8-Molekül der transgenen CD8xA2 CTL verstärkt die Bindung der T-Zellen an die APZ (rechts). mCD8: murines CD8-Molekül, hCD8: humanes CD8-Molekül,  $\beta_2m$ :  $\beta_2$ -Mikroglobulin.

Dazu wurden CD8xA2-Mäuse mit pp65<sub>495-503</sub> immunisiert. Zehn Tage später wurden die Milzen entnommen, homogenisiert und mit Peptid-beladenen Stimulatorzellen kokultiviert. Durch wöchentliche Restimulation mit Peptid-beladenen Stimulatorzellen konnte eine pp65<sub>495-503</sub>-spezifische CTLL etabliert werden (im Folgenden als CD8xA2pp65 bezeichnet).

### 3.1.3.1 Charakterisierung der CTLL CD8xA2pp65

Zur Charakterisierung wurden die aus der CD8xA2-transgenen Maus generierten pp65<sub>495-503</sub>-spezifischen CTLL in CFT getestet. Mit Hilfe von T2-Zellen, welche exogen mit verschiedenen Peptidkonzentrationen beladen wurden, konnte die Spezifität und Qualität der CD8xA2pp65 überprüft werden. CD8xA2pp65 CTLL lysierten mit Peptid beladene Zellen mit hoher Sensitivität (Abbildung 11 A). Auch bei einer Peptidkonzentration von 10<sup>-9</sup> M wurden noch nahezu 100 % der Zielzellen lysiert; Zellen, die mit 10<sup>-10</sup> M pp65<sub>495-503</sub> beladen worden waren, wurden zu etwa 25 % lysiert. T2-Zellen ohne Peptid wurden nicht erkannt.



**Abbildung 11:** Charakterisierung der CTLL CD8xA2pp65. **A:** T2-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an pp65<sub>495-503</sub> beladen und als Zielzellen in einem 4 Stunden CFT eingesetzt. Die Effektoren CD8xA2pp65 wurden mit einem E/Z von 30/1 verwendet. **B:** In einem 5,5 Stunden CFT wurden die Lyse von Ad169-infizierten MRC-5 durch CD8xA2pp65 bestimmt. Dazu wurden MRC-5 nach einer 72stündigen IFN- $\gamma$ -Vorbehandlung mit Ad169 mit einer moi von 5-10 für 16 Stunden infiziert und anschließend als Zielzellen eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte MRC-5.

Ein Vergleich der Halbmaximallysen zwischen CD8xA2pp65 und  $\alpha$ 2K<sup>b</sup>pp65 verdeutlicht die unterschiedliche Qualität der beiden CTLL. Unter Halbmaximallyse versteht man die Peptidkonzentration, die benötigt wird, um die Hälfte der maximal lysierbaren Zellen zu lysieren. Sie lag bei CD8xA2pp65 bei 5x10<sup>-10</sup> M, während sie bei  $\alpha$ 2K<sup>b</sup>pp65 (Abbildung 7 A) bei 10<sup>-9</sup> M lag.

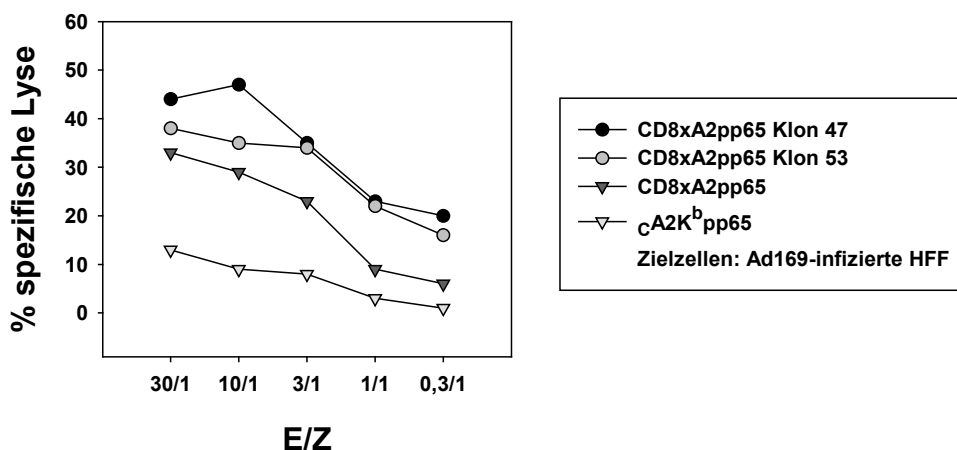
Zudem wurde die CTLL CD8xA2pp65 auf die Fähigkeit hin untersucht, HCMV-infizierte Zellen zu erkennen. Hierzu wurden mit IFN- $\gamma$  vorbehandelte MRC-5 mit dem Laborstamm Ad169 infiziert und nach 16 Stunden als Zielzellen im CFT eingesetzt. Auch hier bestätigte sich die hohe Sensitivität dieser CTLL, da auch bei sehr niedrigem Effektor- zu

Zielzellverhältnis von 2 zu 1 noch nahezu 50 % der Zellen lysiert wurden. Im Vergleich dazu nahm bei der CTLL  $\text{cA2K}^b\text{pp65}$  die Lyse mit sinkendem E/Z stark ab (Abbildung 7 B).

Weitere Versuche zeigten allerdings, dass CD8xA2pp65 auch die HLA-A2-positive Glioblastomzelllinie U373 bereits ohne spezifisches Antigen erkannten. Dieser Effekt wurde durch IFN- $\gamma$ -Vorbehandlung noch verstärkt (Daten nicht gezeigt). Daher war es erforderlich, die Spezifität der CTLL zu erhöhen. Dies sollte durch Klonierung der T-Zell-Population erreicht werden. Dazu wurden die CTL in 96 *Well*-Platten mit Zellzahlen zwischen 0,1 und 30 Zellen pro *Well* ausgesät und mehrmals restimuliert. Auf diese Weise konnten zwei Klone generiert werden, die sowohl Peptid-beladene als auch infizierte Zellen mit hoher Sensitivität und Spezifität erkannten. Diese Klone werden im Folgenden als CD8xA2pp65 Klon 47 und CD8xA2pp65 Klon 53 bezeichnet.

### 3.1.3.2 Erkennung infizierter und transfizierter Zellen durch CTL-Klone

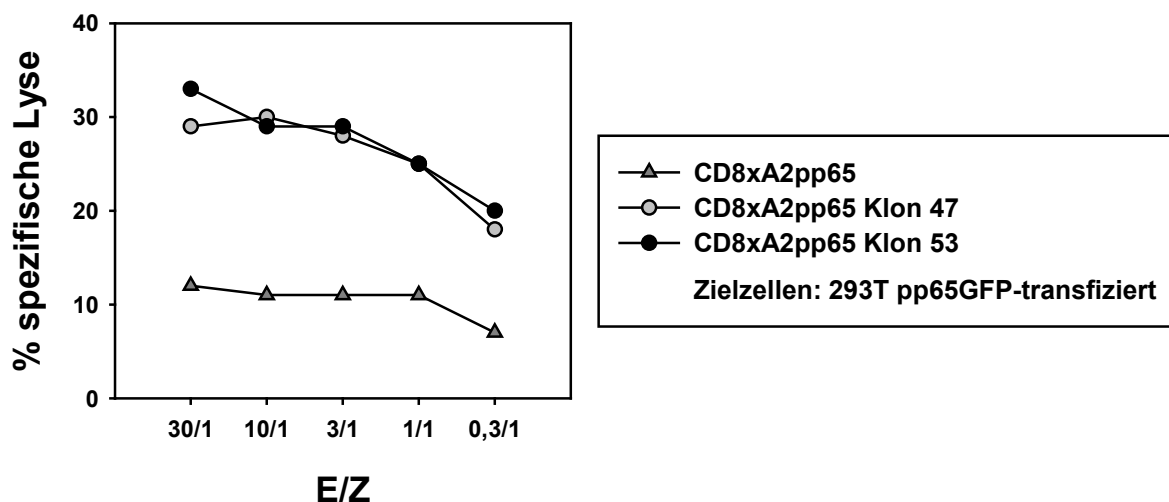
Ziel der Klonierung der CTLL CD8xA2pp65 war die Verbesserung von Sensitivität und Spezifität der Antigenerkennung. Zur Klärung der Frage, ob die Klonierung tatsächlich zu einer Sensitivitätssteigerung geführt hatte, sollte die Fähigkeit der Klone 47 und 53 getestet werden, HCMV-infizierte Fibroblasten zu lysieren. Zu diesem Zweck wurden HFF ohne Vorbehandlung mit IFN- $\gamma$  mit Ad169 mit einer moi von 5-10 infiziert. 16 Stunden nach Infektion wurde ein CFT durchgeführt. Neben den CD8xA2pp65 Klonen 47 und 53 wurden zum Vergleich die CTLL CD8xA2pp65 und  $\text{cA2K}^b\text{pp65}$  als Effektoren in verschiedenen E/Z eingesetzt.



**Abbildung 12:** Lyse HCMV-infizierter HFF durch CTL-Klone im Vergleich zu CTLL. Spezifische Lyse von Ad169-infizierten HFF nach 16-stündiger Infektion gemessen in einem CFT bei verschiedenen E/Z. Als Effektoren wurden neben den beiden CD8xA2pp65 Klonen 47 und 53 die CTLL CD8xA2pp65 und  $\text{cA2K}^b\text{pp65}$  verwendet. Die spezifische Lyse wurde durch Abzug der Lyse nicht-infizierter Zellen errechnet.

In Abbildung 12 ist die spezifische Lyse infizierter HFF der beiden CTL-Klone im Vergleich zu den beiden CTLL bei verschiedenen E/Z dargestellt. Die spezifische Lyse errechnete sich aus der Lyse infizierter HFF abzüglich der Lyse nicht-infizierter Zellen. Bei einem E/Z von 3 zu 1 wurde besonders deutlich, dass die beiden Klone gegenüber den beiden CTLL eine gesteigerte Sensitivität aufwiesen. Während die Klone bei diesem E/Z in der Lage waren, etwa 35 % der infizierten Zellen zu lysieren, wurden durch die CTLL CD8xA2pp65 nur etwa 25 % der Zielzellen lysiert. Durch die CTLL  $\alpha$ A2K<sup>b</sup>pp65 konnten sogar bei einem E/Z von 3 zu 1 nur 10 % der infizierten HFF lysiert werden.

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob durch die Klonierung der CTLL CD8xA2pp65 auch die Zielzell-Erkennung nach transienter Expression von pp65 verbessert werden konnte. Hierzu wurden 293T-Zellen mit dem Plasmid pp65GFP transfiziert, welches für ein Fusionsprotein, bestehend aus pp65 und dem *green fluorescent protein* (GFP) der Qualle *Aequorea victoria* exprimiert. Diese Fusion ermöglichte die Kontrolle der Transfektionseffizienz über die Autofluoreszenz des GFP auch ohne Fixierung und Färbung der Zellen. In einem vorangegangenen Versuch konnte gezeigt werden, dass sich die Erkennung pp65RSV-transfizierter und pp65GFP-transfizierter Zellen bei gleicher Expressionsstärke nicht unterscheidet. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die Expression des GFP die Präsentation von pp65 beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Zwei Tage nach Transfektion wurde die Effizienz der Erkennung im CFT gemessen. Die Transfektionseffizienz lag bei über 90%. Während pp65-exprimierende Zellen von der Population nur zu etwa 15 % lysiert wurden, konnte durch die Klone 47 und 53 zwischen 30 und 40 % Lyse erreicht werden (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Lyse transfizierter Zellen durch die CTLL CD8xA2pp65 und deren Klone 47 und 53. 293T-Zellen wurden mit pp65GFP transfiziert und nach 48 Stunden in einem 5,5 Stunden CFT als Zielzellen eingesetzt. Die CTLL CD8xA2pp65 und die beiden Klone CD8xA2pp65 Klon 47 und Klon 53 wurden mit verschiedenen E/Z eingesetzt.

Zusammengefasst konnte durch diese Versuche bestätigt werden, dass durch die Klonierung der CTLL eine deutliche Steigerung der Antigenerkennung erzielt wurde. Die beiden CD8xA2pp65 Klone 47 und 53 waren geeignet, sowohl infizierte als auch transfizierte Zellen mit hoher Sensitivität zu erkennen und zu lysieren.

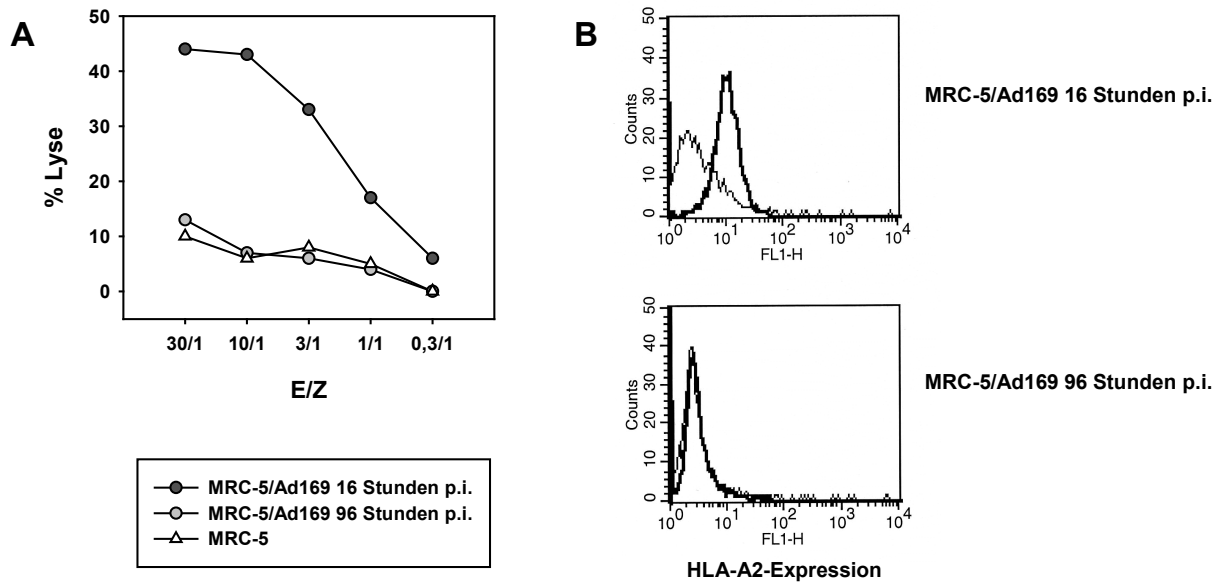
### 3.1.3.3 Abhängigkeit der Lyse infizierter Zellen von $\text{moi}$ und Infektionsdauer

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bereits bekannt, dass pp65-spezifische CTL infizierte Zellen auch 66 Stunden nach Infektion lysieren können (McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994). Allerdings wurden diese Versuche mit infizierten Fibroblasten durchgeführt, die vor der Infektion mit  $\text{IFN-}\gamma$  vorbehandelt worden waren. Durch  $\text{IFN-}\gamma$  kann der HCMV-vermittelten Immunevasion entgegengewirkt werden. Gleichzeitig werden eine Reihe andere zelluläre Funktionen beeinflusst. So werden z.B. durch  $\text{IFN-}\gamma$  Untereinheiten des Immunproteasoms induziert, die das Degradationsprofil des Proteasoms verändern.

Durch das folgende Experiment sollte der Frage nachgegangen werden, bis zu welchem Zeitpunkt nach Infektion HCMV-infizierte Fibroblasten als Zielzellen erkannt werden und ob diese Erkennung auch ohne  $\text{IFN-}\gamma$ -Vorbehandlung d.h. unabhängig von der HCMV-vermittelten Reduktion der MHC Klasse I-Oberflächenexpression erfolgt. Es sollte weiterhin untersucht werden, ob auch das im Rahmen der späten Infektion neusynthetisierte pp65 zur Erkennung der Zielzellen beiträgt. Fibroblasten wurden mit dem Laborstamm Ad169 infiziert und nach 16 und 96 Stunden im CFT als Zielzellen eingesetzt. CD8xA2pp65 Klon 47 wurden als Effektorzellen verwendet. Parallel dazu wurde die HLA-A2-Oberflächenexpression der infizierten Zielzellen im FACS analysiert.

Infizierte Zellen wurden 16 Stunden p.i. bei einem E/Z von 30/1 zu über 40 % lysiert (Abbildung 14 A). Diese Zellen zeigten eine schwache HLA-A2-Oberflächenexpression, die aber auch bei nicht-infizierten Fibroblasten in gleicher Weise schwach war (Abbildung 14 B oben). Dieses Ergebnis deckt sich mit den bereits veröffentlichten Ergebnissen, durch die nachgewiesen werden konnte, dass eine HCMV-Infektion zu diesem frühen Zeitpunkt noch keine Reduzierung der MHC Klasse I-Oberflächenexpression zur Folge hat (Yamashita *et al.*, 1993). Die Lyse von Fibroblasten, die 96 Stunden vor CFT infiziert worden waren, lag bei nur etwa 10 % und war identisch mit der Lyse von nicht-infizierten Zellen. Die Erklärung für diese fehlende Erkennung lieferte die FACS-Analyse der HLA-A2-Oberflächenexpression dieser spät-infizierten Zellen. Als Folge der HCMV-Infektion wurde die Expression von HLA-A2 so stark reduziert, dass keine HLA-A2 Moleküle auf der Oberfläche zu detektieren waren (Abbildung 14 B unten).



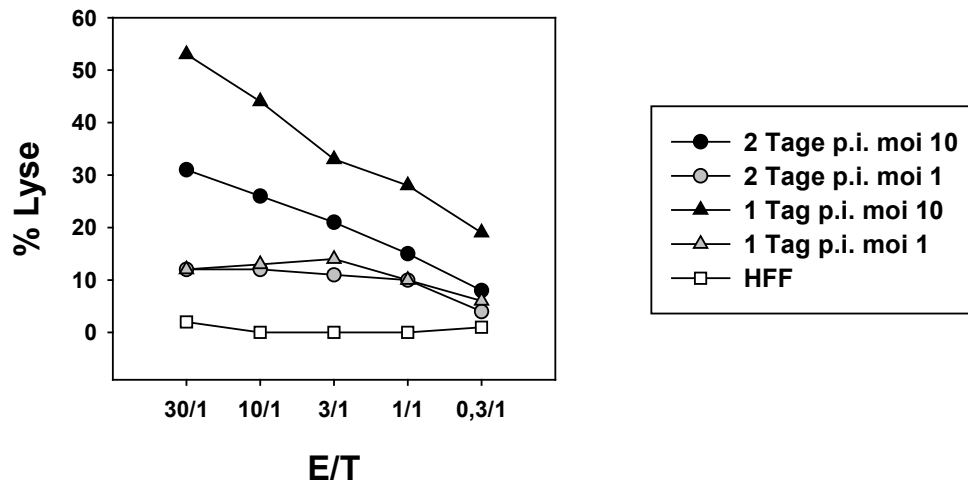


**Abbildung 14:** Lyse HCMV-infizierter Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion. **A:** Humane embryonale Lungenfibroblasten wurden ohne IFN- $\gamma$ -Vorbehandlung mit Ad169 mit einer moi von 10 infiziert und 16 bzw. 96 Stunden p.i. in einem 5,5 Stunden CFT mit CD8xA2pp65 Klon 47 kokultiviert. Nicht-infizierte MRC-5 dienten als Negativkontrolle. **B:** Die HLA-A2-Oberflächenexpression der im CFT verwendeten infizierten MRC-5 wurde parallel dazu mit Hilfe eines HLA-A2-spezifischen, FITC-gekoppelten Antikörper im FACS detektiert (dicke Linie). Die Isotypkontrolle ist durch eine dünne Linie dargestellt.

HCMV führt schon 48 Stunden nach Infektion von Fibroblasten zu einer Reduktion der MHC Klasse I-Oberflächenexpression auf etwa 50 % im Vergleich zu nicht-infizierten Fibroblasten (Yamashita *et al.*, 1993). Da Fibroblasten 96 Stunden p.i. aufgrund des kompletten Verlusts der HLA-A2-Oberflächenexpression durch CD8xA2pp65 Klon 47 nicht mehr erkannt wurden (Abbildung 14 A), sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine noch nicht vollständig ausgeprägte Reduzierung der MHC Klasse I-Oberflächenexpression auf die Erkennung durch die pp65<sub>495-503</sub>-spezifischen CTL hat. Außerdem war zu Beginn dieser Arbeit nicht geklärt, welchen Einfluss die moi auf die Erkennung von infizierten Fibroblasten durch CTL hat. Um diesen beiden Fragen nachzugehen, wurden humane Vorhautfibroblasten mit einer moi von 1 bzw. 10 mit Ad169 infiziert und einen bzw. zwei Tage nach Infektion im CFT eingesetzt.

Mit einer moi von 10 infizierte Fibroblasten wurden bei einem E/Z von 30/1 einen Tag nach Infektion mit einer Lyse von über 50 % erkannt (Abbildung 15). An Tag 2 p.i. sank die Erkennung bei gleichem E/Z auf 30 % ab. Diese Reduktion ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die in der FACS-Analyse sichtbare geringere Oberflächenexpression von HLA-A2 zurückzuführen (Daten nicht gezeigt). Fibroblasten, die mit einer moi von 1 infiziert worden waren, wurden sowohl an Tag 1 als auch an Tag 2 p.i. mit nur 10 % erkannt. Nicht-infizierte Zellen wurden nicht lysiert.

Dieser Versuch zeigte die starke Abhängigkeit der Erkennung infizierter Zellen von der eingesetzten moi. Da einen Tag nach Infektion noch keine signifikante pp65 Neusynthese erfolgt, ist anzunehmen, dass die Erkennung der Zielzellen mit der Menge des durch Viruspartikel eingebrachten pp65 korreliert.

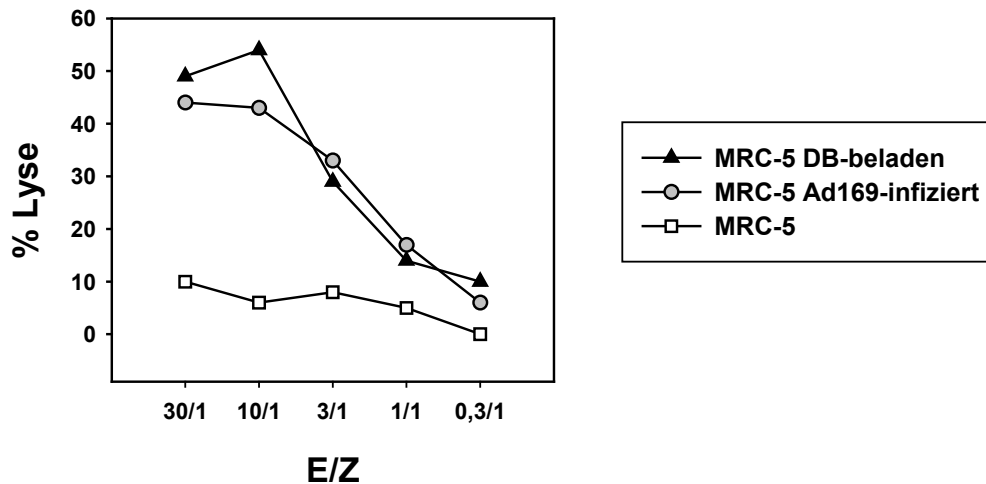


**Abbildung 15:** Lyse infizierter HFF in Abhängigkeit von moi und Infektionsdauer. Humane Vorhautfibroblasten (HFF) wurden mit einer moi von 1 und 10 mit Ad169 infiziert und 1 und 2 Tage p.i. als Zielzellen in einem 5,5 Stunden CFT eingesetzt. Es erfolgte keine Vorbehandlung der Zellen mit IFN- $\gamma$ . Als Effektoren wurde CD8xA2pp65 Klon 47-CTL in den angezeigten E/Z verwendet.

### 3.1.3.4 Erkennung exogen durch DB beladener Zellen

In der klassischen Beschreibung der Antigen-Präsentationswege wurde angenommen, dass exogene Proteine dem Immunsystem nur über den MHC Klasse II-Weg präsentiert werden können (Monaco *et al.*, 1992). Eine Reihe von Studien konnte allerdings belegen, dass Proteine, die nicht endogen synthetisiert sondern z.B. durch Viruspartikel in die Zelle eingebracht wurden, auch über den MHC Klasse I-Weg präsentiert und durch CTL erkannt werden können (Yewdell *et al.*, 1988, Moore *et al.*, 1988, Reimann & Schirmbeck, 1999). Dieser alternative Weg der Beladung des MHC Klasse I-Präsentationsweges konnte auch für pp65-spezifische CTL gezeigt werden. Die Zugabe von Actinomycin D, einem Inhibitor der RNA-Synthese, zu infizierten Zellen demonstrierte, dass eine Erkennung dieser Zellen nicht von viraler Genexpression abhängig ist (Riddell *et al.*, 1991a; McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994). Eine weitere Möglichkeit, die Erkennung von exogen durch Viruspartikel eingebrachtem pp65 ohne Zugabe von Hemmstoffen zu untersuchen, stellt die Verwendung von DB als Transportpartikel für pp65 dar (Pepperl *et al.*, 2000). DB sind virusähnliche Partikel, die im Zuge der Virusreplikation freigesetzt werden und weder DNA noch Kapsid enthalten. Sie bestehen überwiegend aus dem Tegumentprotein pp65.

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob eine Beladung von Fibroblasten mit DB geeignet ist, eine Lyse dieser Zellen durch pp65<sub>495-503</sub>-spezifische CTL zu bewirken.



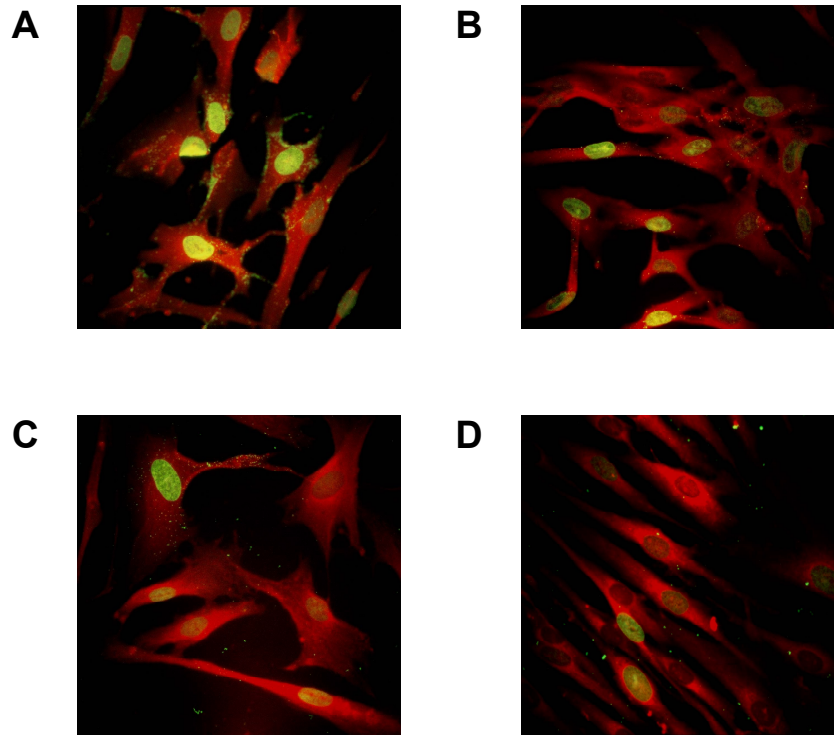
**Abbildung 16:** Lyse von DB-beladenen Zellen. Die durch CD8xA2pp65 Klon 47 vermittelte Lyse von DB-beladenen Fibroblasten wurde in einem 5,5 Stunden CFT gemessen. Hierzu wurden MRC-5 mit DB beladen und nach 16 Stunden im Test eingesetzt. Zum Vergleich wurden MRC-5, die mit einer moi von 5-10 mit Ad169 infiziert worden waren, ebenfalls nach 16 Stunden getestet. Nicht-infizierte MRC-5 dienten als Negativkontrolle.

Dazu wurden  $10^6$  Fibroblasten ohne  $\text{IFN-}\gamma$ -Vorbehandlung mit  $50 \mu\text{g}$  DB für 16 Stunden inkubiert und anschließend im CFT als Zielzellen eingesetzt. Bei einem E/Z von 30 zu 1 wurden nahezu 50 % der Zielzellen lysiert (Abbildung 16). Damit war die Lyse der DB-beladenen Zellen sogar geringfügig höher als die von Ad169-infizierten Fibroblasten. Die Lyse von nicht-infizierten Zellen lag je nach E/Z zwischen 5 und 10 %. Dieses Ergebnis demonstriert, dass auch durch DB eingebrachtes pp65 degradiert und präsentiert wird und dieser Vorgang unabhängig von viraler Replikation oder Expression früher viraler Gene erfolgt.

### 3.1.4 Stabilität von pp65 in DB-beladenen Fibroblasten

Eine hohe Degradationsrate von Proteinen und die daraus resultierende Menge an prozessierten Peptiden kann eine mögliche Ursache von Immundominanz darstellen (Yewdell & Bennink, 1999). Pp65 scheint allerdings in Zellen sehr stabil zu sein. Immunpräzipitations-Untersuchungen nach transientser Expression des Proteins erbrachten Hinweise auf eine hohe Stabilität des pp65 (Beninga & Plachter, unveröffentlichte Daten).

Es sollte untersucht werden, ob das Protein auch bei exogener Beladung von Fibroblasten durch DB eine hohe Stabilität aufweist. Dazu wurden  $5 \times 10^5$  HFF mit  $10 \mu\text{g}$  DB beladen. Die Partikel waren zuvor mit UV-Licht bestrahlt worden, um eine auf Verunreinigungen durch Virionen zurückzuführende Infektion der Zellen zu verhindern. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach DB-Beladung wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit einem pp65-spezifischen Primärantikörper durchgeführt. Virusinfektion wurde durch den fehlenden Nachweis des nicht-strukturellen IE1-Proteins ausgeschlossen.



**Abbildung 17:** Untersuchung der Stabilität von pp65 in DB-beladenen Zellen.  $5 \times 10^5$  HFF wurden mit  $10 \mu\text{g}$  DB beladen. Detektion des pp65 mittels Immunfluoreszenzfärbung durch einen pp65-spezifischen Antikörper erfolgte 6 (A), 48 (B), 96 (C) und 144 (D) Stunden nach Beladung.

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich, war das durch DB in die Zelle eingebrachte pp65 zu allen untersuchten Zeitpunkten in den Zellen nachweisbar. So war pp65 nach 6, 48, 96 und sogar 144 Stunden im Zellkern zu finden. Die Kontrollfärbung auf das im Rahmen einer Infektion synthetisierte IE1 zeigte nur sehr wenige infizierte Zellen, so dass ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei dem detektierten pp65 um neusynthetisiertes Protein handelte. Obwohl die Anzahl der pp65-positiven Zellen im zeitlichen Verlauf langsam abnahm, bestätigte dieser Versuch, dass pp65 ein Protein mit hoher metabolischer Stabilität ist. Die Hypothese, dass die Immundominanz des Proteins auf eine erhöhte metabolische Umsatzrate zurückzuführen sei, wurde damit falsifiziert.

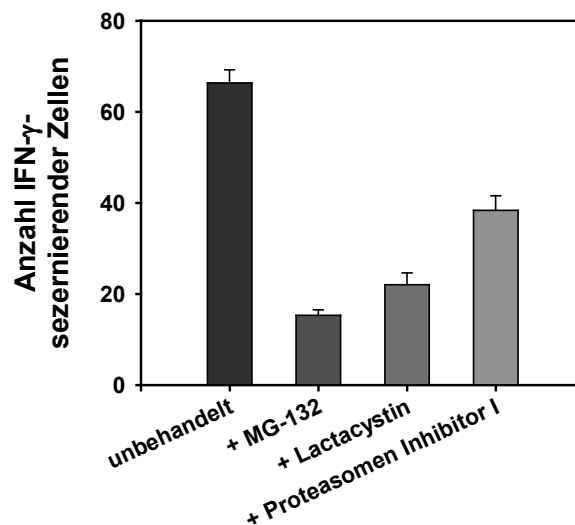
### 3.1.5 Einfluss von Proteasomen-Inhibitoren auf die Erkennung transfizierter Zellen

Der Abbau von endogenen Proteinen erfolgt in den meisten Fällen durch das Proteasom, einen multikatalytischen Proteinkomplex. Das aus mehreren Untereinheiten bestehende Proteasom besitzt drei proteolytische Aktivitäten. Allerdings können einige Proteine auch über andere Wege abgebaut werden. Zu diesen Proteasomen-unabhängigen Abbauwegen gehören zytoplasmatische und endosomale/lysosomale Proteasen wie Calpain und Cathepsin. Mit Hilfe von Hemmstoffen des Proteasoms bzw. der genannten Proteasen wird eine Analyse der Abbauwege von Proteinen möglich. Viele Proteasomen-Inhibitoren sind

Peptide, die an der Hydrolysestelle eine reaktive Gruppe tragen. Diese Gruppe ist in der Lage, das angreifende Nukleophil reversibel oder irreversibel zu modifizieren, so dass eine Prozessierung verhindert wird (Bogyo *et al.*, 1997).

Zur Klärung der Frage, ob pp65 durch das Proteasom degradiert wird, wurden mit pp65RSV transfizierte 293T-Zellen zwei Tage nach Transfektion mit verschiedenen Proteasomen-Inhibitoren inkubiert und als Zielzellen in einem ELISpot eingesetzt. Die drei verwendeten Proteasomen-Inhibitoren zeichnen sich durch unterschiedliche Wirkmechanismen aus. Der Proteasomen-Inhibitor I (Z-Ile-Glu(OtBu)-Ala-Leucinal) hemmt die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des 20 S Proteasoms. MG-132 hemmt reversibel das Proteasom ohne seine ATPase- oder Isopeptidase-Aktivität zu blockieren, während Lactacystin ein irreversibler Inhibitor der Trypsin- und Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität ist. Durch kovalente Bindung von Lactacystin an das aminoternale Threonin der Untereinheit X der katalytischen  $\beta$ -Unterheit kommt es zur Blockierung der Proteasomen Aktivität.

Die Proteasomen-Inhibitoren wurden 30 min vor Kokultivierung mit den CTL zu den Zielzellen gegeben und für die Dauer des Tests im Medium belassen. CD8xA2pp65 wurden als Effektoren verwendet.



**Abbildung 18:** Beeinflussung der Erkennung pp65-transfizierter Zellen durch Inhibition des Proteasoms. 293T wurden mit pp65RSV transfiziert und zwei Tage nach Transfektion sowohl unbehandelt als auch mit MG-132, Lactacystin und Proteasom-Inhibitor I behandelt in einem 20 Stunden ELISpot eingesetzt. Die Proteasomen-Inhibitoren wurden 30 min vor Kokultivierung mit CD8xA2pp65 zu den Zielzellen gegeben und verblieben während des Tests im Medium. Pro Well wurden 100 Effektorzellen verwendet.

Während pp65RSV-transfizierte 293T-Zellen ohne Zusatz von Proteasomen-Inhibitoren 65 der 100 eingesetzten Effektorzellen zu der Produktion von IFN- $\gamma$  anregen, konnte diese Erkennung durch Zusatz von Proteasomen-Inhibitoren deutlich gesenkt werden (Abbildung 18). Durch Verwendung des Proteasomen-Inhibitors I wurde die Erkennung um etwa 50 %

reduziert. Lactacystin führte zu einer Reduktion auf 30% und durch Zusatz von MG-132 verminderte sich die Zahl der mit IFN- $\gamma$ -Sekretion reagierenden CTL auf 25 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Zusammengefasst lässt sich aus diesem Versuch ableiten, dass die Zugabe aller drei Proteasomen-Inhibitoren zu einer deutlich reduzierten Erkennung der pp65-exprimierenden Zellen führte. Dies war unabhängig vom jeweiligen Wirkmechanismus des verwendeten Hemmstoffes. Durch diesen Versuch konnte verifiziert werden, dass die Degradation von endogen-synthetisiertem pp65 durch das Proteasom erfolgt.

### **3.1.6 Einfluss der subzellulären Lokalisation auf die Präsentation von pp65**

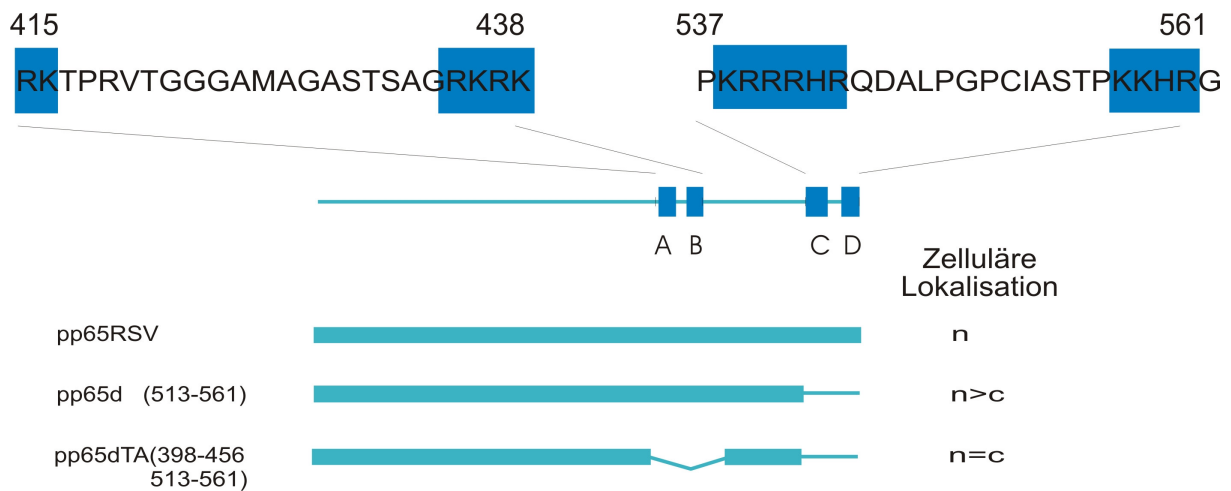
Bisher ist noch nicht bekannt, welchen Einfluss die subzelluläre Lokalisation auf die Prozessierung und Präsentation von Proteinen hat. Obwohl einige immundominante Antigene nukleär lokalisiert sind (z.B. EBNA-1 von EBV, Nukleoprotein von Influenza A), konnte noch nicht geklärt werden, in welchem Kompartiment deren Degradation stattfindet und ob dies die Immundominanz beeinflusst. Prinzipiell wäre eine Degradation sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern möglich, da in beiden Kompartimenten Proteasomen nachgewiesen werden konnten (Reits *et al.*, 1997).

Auch bei pp65 ist bisher nicht geklärt, in welchem Kompartiment die Degradation stattfindet. Es wäre denkbar, dass pp65 entweder im Zellkern oder nach Transport aus dem Zellkern im Zytoplasma degradiert wird.

Pp65 gelangt aufgrund seiner starken nukleären Lokalisationssequenzen (NLS) schon kurze Zeit nach Infektion in den Zellkern (Schmolke *et al.*, 1995a). Auch nach Transfektion exprimiertes pp65 ist nukleär lokalisiert. Durch Deletion dieser NLS kommt es zu einer veränderten Verteilung von pp65 in der Zelle.

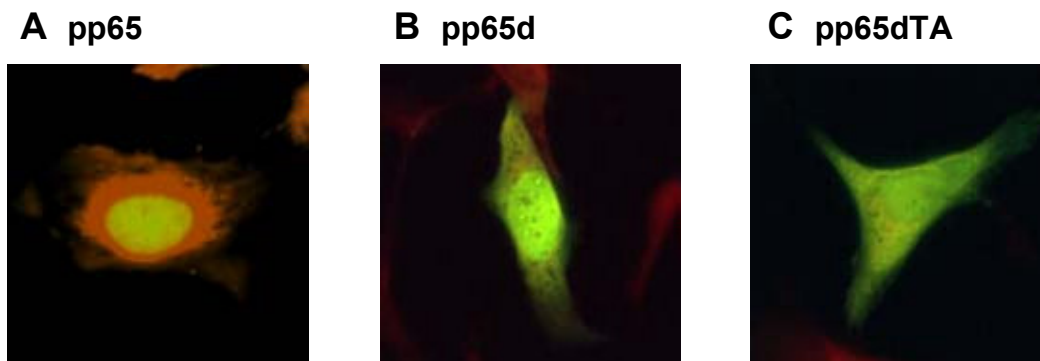
Aus der Arbeit von Schmolke *et al.* standen pp65-Expressionskonstrukte mit verschiedenen NLS-Deletionen zur Verfügung (Abbildung 19), mit deren Hilfe untersucht werden sollte, ob eine veränderte Lokalisation des pp65 in der Zelle die Erkennung durch CTL beeinflusst.

Zur Überprüfung der subzellulären Verteilung der NLS-Deletionsmutanten des pp65 wurden drei verschiedene Expressionsplasmide (pp65, pp65d, pp65dTA) in HeLa-Zellen transfiziert und pp65 nach zwei Tagen mittels Immunfluoreszenz mit einem pp65-spezifischen Antikörper angefärbt. Die ausgewählten NLS-Mutanten pp65d und pp65dTA tragen Deletionen im C-terminalen Bereich des Protein. Bei der Mutante pp65d wurden die Aminosäuren 513-561 deletiert; bei der Mutante pp65dTA fehlen zusätzlich die Aminosäuren 398-456 (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Schematische Darstellung der NLS-Deletionsmutanten des pp65 (modifiziert nach Schmolke *et al.*, 1995a). Die Mutante pp65d weist eine Deletion der Aminosäuren 513-561, die Mutante pp65dTA eine zusätzliche Deletion der Aminosäuren 398-456 auf.

Das Wildtyp pp65 zeigte die bekannte nukleäre Lokalisation (Abbildung 20 A). Die NLS-Mutante pp65d war in der ganzen Zelle nachweisbar, wobei der Anteil des im Zellkern lokalisierten Proteins höher zu sein schien (Abbildung 20 B). Auch die Mutante pp65dTA war sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachweisbar. Allerdings schien hier das Protein gleichmäßig verteilt (Abbildung 20 C).



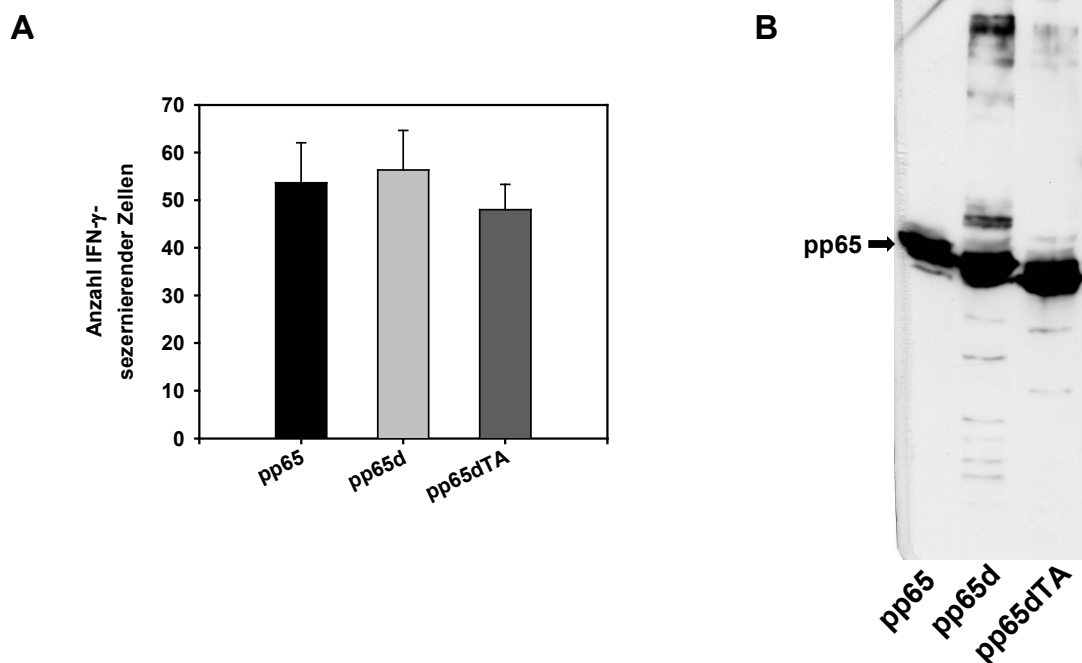
**Abbildung 20:** Immunfluoreszenzfärbung transfizierter HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit den pp65-Expressionplasmiden pp65 (A), pp65d (B) und pp65dTA (C) transfiziert und 2 Tage nach Transfektion einer Immunfluoreszenzfärbung mit dem pp65-spezifischen Antikörper 65-33 unterzogen.

Um der Frage nachzugehen, ob die veränderte subzelluläre Lokalisation des pp65 die Erkennung durch pp65-spezifische CTLL beeinflusst, wurden 293T zwei Tage nach Transfektion mit jeweils einem der drei Expressionsplasmide pp65, pp65d oder pp65dTA in einem ELISpot als Zielzellen eingesetzt. Hier waren keine deutlichen Unterschiede in der Erkennung der NLS-Deletionsmutanten im Vergleich zu dem Wildtyp pp65 erkennbar (Abbildung 21 A). Etwa 50 der 100 als Effektorzellen verwendeten CD8xA2pp65 reagierten auf die mit den unterschiedlichen pp65 Konstrukten transfizierten Zellen mit der Sekretion

von IFN- $\gamma$ .

Voraussetzung für eine vergleichende Analyse der Erkennung von Wildtyp pp65, pp65d und pp65dTA ist eine vergleichbare Transfektionseffizienz. Die Transfektionseffizienz wird durch viele verschiedene Faktoren wie z.B. Dichte und Viabilität der zu transfizierenden Zellen, Reinheit der DNA oder pH-Wert des Mediums beeinflusst und kann daher zwischen unterschiedlichen Ansätzen schwanken. Um solche Schwankungen auszuschließen, wurde die Transfektionsrate durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem pp65-spezifischen Antikörper 65-33 nach Fixierung der transfizierten Zellen kontrolliert. Bei allen drei Transfektionsansätzen lag die Effizienz der Transfektion bei 60 % (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde die Menge des exprimierten pp65 mittels Western Blot analysiert. Durch diesen Western Blot konnte bestätigt werden, dass in den transfizierten Zellen vergleichbare Menge an pp65 exprimiert wurden (Abbildung 21 B).



**Abbildung 21:** Einfluss der subzellulären Lokalisation auf die Erkennung des pp65. **A:** Messung der IFN- $\gamma$ -Sekretion mittels eines 20 Stunden ELISpots mit 293T-Zellen, die zwei Tage zuvor mit pp65RSV oder den NLS-Mutanten pp65dRSV und pp65dTARSV transfiziert worden waren. Als Effektoren wurden CD8x2pp65 mit einer Anzahl von 100 pro *Well* verwendet, die Anzahl der APZ betrug  $10^5$ /*Well*. **B:** Der Nachweis der exprimierten pp65-Mutanten erfolgte mit Hilfe eines Western Blots mit dem pp65-spezifischen Antikörper 65-33. Pro Spur wurden  $10^5$  Zellen aufgetragen.

### 3.1.7 Rolle des nukleären Exports bei der Erkennung von transfizierten und infizierten Zellen

Pp65 ist sowohl nach exogener Beladung durch Virionen oder DB als auch nach endogener Neusynthese nukleär lokalisiert. Obwohl bekannt ist, dass Degradation von Proteinen auch im Zellkern stattfinden kann (Shirangi *et al.*, 2002), ist die Rolle der nukleären Degradation



für die Antigenpräsentation noch nicht geklärt. Auch im Falle des pp65 konnte noch nicht gezeigt werden, in welchem Kompartiment die Generierung der antigenen Peptide stattfindet.

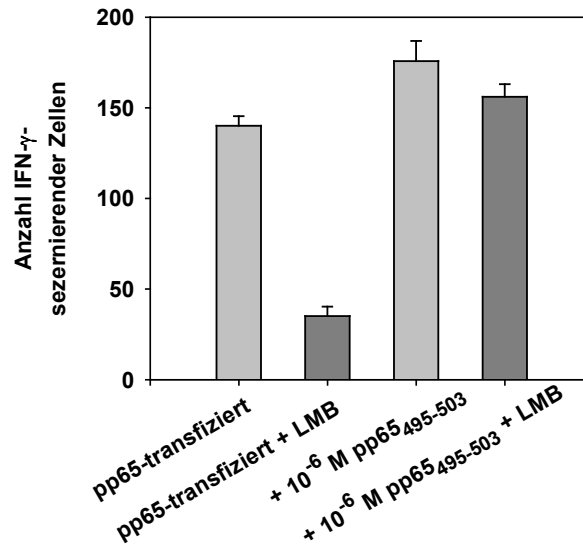
Durch Hemmung des nukleären Exports sollte untersucht werden, ob dieser Vorgang für die Prozessierung und Präsentation des pp65<sub>495-503</sub> eine Bedeutung hat.

Der am besten charakterisierte Transportweg durch den Kernporenkomplex ins Zytoplasma ist der CRM1-vermittelte nukleäre Exportweg. CRM1 bindet Proteine mit Leucin-reichen nukleären Export Sequenzen (NES) und transportiert sie ins Zytoplasma. Dieser Transport ist abhängig von der Bindung des CRM1 an das Nukleoporin NUP214 (auch CAN genannt) (Fornerod *et al.*, 1997a). Die Hemmung dieses Transportweges kann auf unterschiedliche Weise erfolgen:

1. Leptomycin B (LMB) ist eine verzweigte Fettsäure, die an CRM1 bindet und so durch Konkurrenz den nukleären Export hemmt (Fornerod *et al.*, 1997b).
2. Das HTLV-1 Rex Protein exportiert sehr effizient virale mRNA aus dem Zellkern. Rex enthält eine starke NES, die homolog zu der Prototyp-NES aus HIV-1 Rev ist. Durch Überexpression eines veränderten HTLV-1 Rex, dessen RNA-Bindedomäne deletiert und durch die starke NLS des SV40 T Antigen ersetzt wurde, kann der CRM1-vermittelte nukleäre Export kompetitiv gehemmt werden (Shirangi *et al.*, 2002).
3. Sequestrierung von CRM1 durch Überexpression von CANc, dem Carboxyterminus des Nukleoporins NUP214 (Aminosäuren 1864-2090). CANc kann aufgrund des Fehlens der aminoterminalen Interaktionsdomäne nicht an die Kernpore binden. Somit wird der CRM1-vermittelte Export von Proteinen durch Konkurrenz mit Wildtyp NUP214 blockiert (Rosorius *et al.*, 1999).

### 3.1.7.1 Einfluss von LMB

Es sollte zunächst der Einfluss von LMB auf die Präsentation von pp65<sub>495-503</sub> untersucht werden. Hierzu wurden pp65RSV-transfizierte 293T-Zellen zwei Tage nach Transfektion als APZ im ELISpot mit CD8xA2pp65 CTLL als Effektorzellen eingesetzt. Die Zielzellen wurden sowohl mit als auch ohne Zugabe von LMB inkubiert. LMB wurde mit einer Endkonzentration von 10 nM 30 min vor Kokultivierung mit den Effektorzellen zu den Zielzellen gegeben und verblieb während der Inkubationszeit von 20 Stunden im Medium. Um auszuschließen, dass LMB einen unspezifischen inhibitorischen Effekt auf die eingesetzten T-Zellen ausübt, wurden parallel als Kontrolle die Erkennung Peptid-beladener Zielzellen mit und ohne Zugabe von LMB getestet.



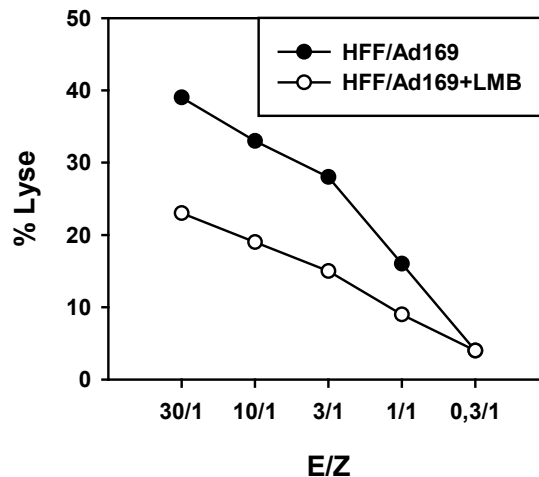
**Abbildung 22:** Einfluss von LMB auf die Erkennung pp65 transfizierter Zellen. 293T wurden zwei Tage nach Transfektion mit pp65RSV als APZ in einem 20 Stunden IFN- $\gamma$ -ELISpot eingesetzt. Die Zugabe des nukleären Export-Inhibitors LMB zu den APZ erfolgte 30 min vor Kokultivierung mit den T-Zellen mit einer Endkonzentration von 10 nM. In jedem *Well* wurden 200 Zellen der CTLL CD8xA2pp65 als Effektorzellen verwendet. Die Anzahl der APZ betrug 10<sup>5</sup>/*Well*. Als Kontrolle dienten mit 10<sup>-6</sup> M pp65<sub>495-503</sub> beladene 293T-Zellen mit und ohne Zugabe von LMB.

Durch Zugabe von LMB wurde die Erkennung des neusynthetisierten pp65 stark reduziert. Ohne LMB konnten im Mittel 140 Spots gezählt werden, während nach Zugabe von LMB nur etwa 40 Spots detektierbar waren (Abbildung 22). Auf die Erkennung von exogen mit Peptid beladenen Zellen hatte LMB dagegen nur geringen Einfluss; durch LMB-Zugabe erfolgte eine Reduktion der Spotanzahl von 160 auf 150. In der Zusammenschau deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass die durch LMB hervorgerufene Reduktion der Erkennung von neusynthetisiertem pp65 auf eine Hemmung des nukleären Exports und nicht auf eine unspezifische toxische Wirkung des LMB auf die T-Zellen zurückzuführen war.

Um zu überprüfen, ob sich dieser Effekt auch bei infizierten Zellen bestätigen ließ, wurden HCMV-infizierte Fibroblasten 24 Stunden nach Infektion mit und ohne Zugabe von LMB als APZ eingesetzt. In diesem Fall wurde zur Analyse des Einflusses von LMB auf die Antigenpräsentation ein CFT gewählt, um auszuschließen, dass LMB die lytische Aktivität der CTL negativ verändert.

Für den CFT wurden HFF mit einer *moi* von 10 mit HCMV infiziert und am folgenden Tag als Zielzellen verwendet. Die Zugabe des LMB erfolgte zeitgleich mit der Chrommarkierung, wurde nach Waschschrinen erneut dem Medium zugefügt und verblieb bis zum Ende der 5,5 stündigen Inkubationszeit im Medium. Als Effektoren wurden neben der CTLL CD8xA2pp65 zusätzlich die aus dieser Linie generierten Klone 47 und 53 verwendet.

Die pp65-spezifischen CTL (Abbildung 23; exemplarisch ist der CFT mit CD8xA2pp65 Klon 53 gezeigt) lysierten infizierte HFF bei einem E/Z von 30 zu 1 zu 40 %. Durch Zugabe von LMB konnte die Lyse um etwa 50 % reduziert werden. Die Lyse von Peptid beladenen Zellen wurde durch LMB-Zugabe nicht entscheidend verändert (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 23:** Einfluss von LMB auf die Erkennung infizierter Zellen. HFF wurden mit einer moi von 5-10 mit Ad169 infiziert und 24 Stunden nach Infektion in einem 5,5 Stunden CFT mit CD8xA2pp65 Klon 53 als Effektoren eingesetzt. Die Zugabe von LMB erfolgte zeitgleich mit Chrommarkierung der Zielzellen.

Anhand zweier unterschiedlicher Testmethoden konnte nachgewiesen werden, dass die Hemmung des CRM1-vermittelten nukleären Exports durch LMB sowohl die Erkennung von pp65RSV-transfizierten als auch HCMV-infizierten Zellen reduziert. Die Beobachtung, dass die Erkennung von exogen mit synthetischem Peptid beladenen Zellen durch LMB-Zugabe nicht maßgeblich verändert wurde, spricht gegen eine toxische Wirkung dieser Substanz auf CTL. Allerdings konnte durch LMB die Erkennung der pp65-positiven Zellen nicht komplett unterbunden werden. Eine mögliche Erklärung sind die zu der Zeit der LMB-Zugabe schon auf der Oberfläche befindlichen MHC-Peptid-Komplexe, die über mehrere Stunden stabil sein können und vermutlich zu dieser „Resterkennung“ führen.

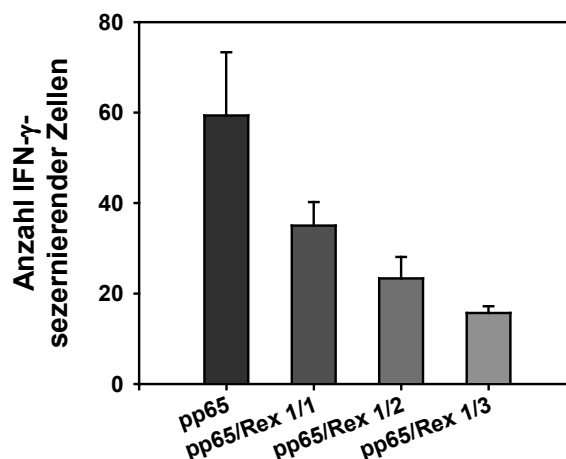
### 3.1.7.2 Wirkung von HTLV-1 Rex Überexpression auf die Erkennung von pp65

Die Bedeutung des nukleären Exports bei der Antigenpräsentation des pp65 sollte in zwei weiteren Ansätzen ohne pharmakologische Zusätze untersucht werden.

Im folgenden Versuch sollte daher durch Überexpression einer veränderten Form des HTLV-1 Rex Proteins (siehe 3.1.7) der CRM1-vermittelte Export gehemmt werden. Dazu wurden 293T-Zellen mit einer konstanten Menge an pp65RSV und unterschiedlichen Mengen an HTLV-1 Rex DNA kotransfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die kotransfizierten Zellen als Zielzellen in einem ELISpot mit der CTLL CD8xA2pp65 verwendet.

Wie Abbildung 24 zeigt, wurde die Erkennung der pp65RSV-transfizierten Zellen mit steigender Menge an kotransfizierter HTLV-1 Rex DNA reduziert. Durch Kotransfektion von dreifachem Überschuß an HTLV-1 Rex Expressionsplasmid erfolgte eine Abnahme der Erkennung pp65RSV-transfizierter Zellen auf etwa 30 % im Vergleich zu Zellen, die nur mit pp65RSV transfiziert worden waren.

Die zur Transfektion verwendeten 293T-Zellen sind durch die Expression des großen T-Antigens von SV40 in der Lage, transfizierte Plasmide mit SV40 ori (wie die für dieses Experiment verwendeten Plasmide) zu replizieren und bei Zellteilung an Tochterzellen weiterzugeben. Aus diesem Grund sollte eine Erhöhung der DNA-Menge keinen Einfluss auf die Expressionsrate des Proteins und damit auf das Versuchsergebnis haben. Die Ergebnisse dieses Versuches deuteten jedoch darauf hin, dass durch Steigerung der DNA-Menge die Anzahl der kotransfizierten Zellen erhöht wurde. Mittels eines Western Blots mit dem pp65-spezifischen Antikörper 65-33 konnte gezeigt werden, dass die Expressionsstärke von pp65 unabhängig von der Kotransfektion des HTLV-1 Rex und in allen verwendeten Zielzellansätzen gleich war (Daten nicht gezeigt).

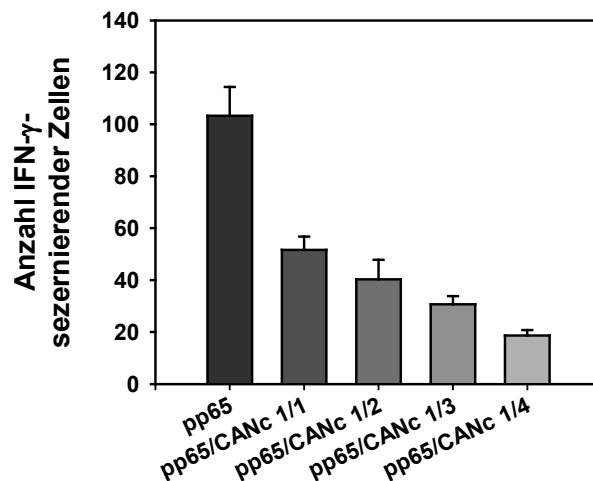


**Abbildung 24:** Wirkung von HTLV-1 Rex auf die Erkennung von pp65. 293T-Zellen wurden mit pp65RSV und steigenden Mengen des Expressionsplasmids für HTLV-1 Rex kotransfiziert und nach zwei Tagen in einem IFN- $\gamma$ -ELISpot eingesetzt. Die Effektoren CD8x2pp65 wurden mit einer Anzahl von 200 je *Well* ausgesät und mit  $10^5$  APC für 20 Stunden kokultiviert.

### 3.1.7.3 Einfluss der Überexpression von CANc auf die Erkennung von pp65

Eine Hemmung des nukleären Exports kann auch durch Überexpression des C-terminalen Endes von NUP214, CANc genannt, hervorgerufen werden (siehe 3.1.7). In vergleichbarer Weise wie im unter 3.1.7.2 beschriebenen Experiment wurden 293T-Zellen mit einer konstanten Menge an pp65RSV und unterschiedlichen Menge eines für CANc kodierenden Plasmids kotransfiziert. Die Durchführung eines ELISpots erfolgte zwei Tage nach Transfektion. Als Effektorzellen wurden CD8x2pp65 Klon 53 verwendet.

Das in Abbildung 25 dargestellte Ergebnis bestätigt, dass durch Hemmung des nukleären Exports die Erkennung von neusynthetisiertem pp65 reduziert wird. Während Zellen, die nur mit pp65RSV transfiziert worden waren, gut erkannt wurden, kam es bei Kotransfektion mit CANc zu einer verminderten Erkennung. Durch Steigerung der Menge der kotransfizierten CANc-DNA konnte die Erkennung der Zellen weiter reduziert werden. Bei Transfektion eines vierfachen Überschusses an CANc-DNA gegenüber pp65-DNA betrug die Erkennung der pp65-exprimierenden Zellen nur noch 20 % verglichen mit Zellen, die nicht mit CANc kotransfiziert worden waren.

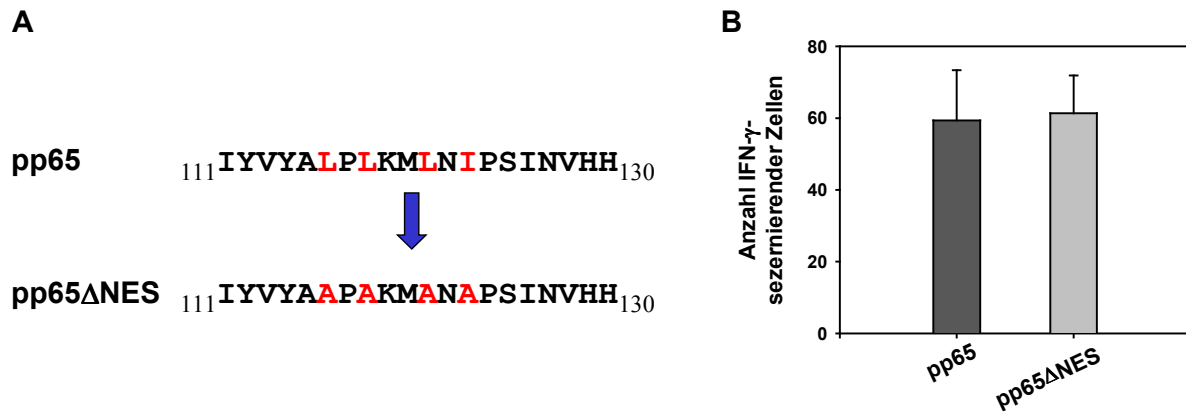


**Abbildung 25:** Einfluss von CANc auf die Erkennung pp65 exprimierender Zellen. IFN- $\gamma$ -ELISpot mit als APZ verwendeten 293T-Zellen, die zwei Tage zuvor mit pp65RSV und verschiedenen Mengen an CANc-DNA kotransfiziert worden waren. Die Effektoren CD8x2pp65 Klon 53 wurden mit einer Anzahl von 200 mit  $7,5 \times 10^4$  APZ je Well für 20 Stunden kokultiviert.

#### 3.1.7.4 Erkennung von pp65 nach Mutation einer putativen NES

Wie die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, wird die Präsentation von pp65 durch Hemmung des nukleären Exports reduziert. Dies führte zu der Annahme, dass pp65 durch den CRM1-vermittelten nukleären Exportweg aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert und dort degradiert wird. Voraussetzung für den nukleären Export durch CRM1 ist eine nukleäre Export Sequenz (NES) im zu transportierenden Protein.

NES sind hydrophobe Sequenzen, die mehrere Leucine in konserviertem Abstand enthalten (Bogerd *et al.*, 1996, Kim *et al.*, 1996). Anhand einer Proteinsignal-Datenbank (<http://psort.nibb.ac.jp/>) wurde pp65 auf mögliche NES untersucht. Dabei wurde eine putative NES im N-terminalen Bereich des Proteins identifiziert. Durch Mutation dieser Sequenz sollte deren Funktionalität als NES überprüft werden. Dazu sollten drei Leucine an Position 116, 118 und 121 und ein Isoleucin an Position 123 durch Alanine ersetzt werden (Abbildung 26 A).



**Abbildung 26:** Erkennung von pp65 nach Mutation einer putativen NES. A: Mutation einer putativen NES im N-terminalen Bereich des pp65 B: Mit Wildtyp-pp65 oder der NES-Mutante des pp65 transfizierte 293T wurden 2 Tage nach Transfektion mit einer Zellzahl von  $10^5$ /Well in einem IFN- $\gamma$ -ELISpot eingesetzt. Als Effektoren wurden je Well 200 Zellen der CTLL CD8xA2pp65 verwendet.

Durch Punktmutagenese des Plasmids pp65RSV wurde ein derart modifiziertes Konstrukt (pp65ΔNES) erhalten und mittels Sequenzierung überprüft. In einem ELISpot wurden Zellen verwendet, die zwei Tage zuvor mit pp65RSV bzw. pp65ΔNESRSV transfiziert worden waren. Im Mittel reagierten 60 der 100 eingesetzten Effektoren auf den Stimulus von pp65RSV-transfizierten Zellen mit der Produktion von IFN- $\gamma$ . Die Transfektion der NES-Mutante des pp65 führte nicht wie erwartet zu einer Reduktion der IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen (Abbildung 26 B). Somit konnte gezeigt werden, dass ein Austausch der drei Leucine an Position 116, 118 und 121 und des Isoleucin an Position 123 durch Alanine keinen Einfluss auf die Erkennung des pp65 ausübt. Eine mögliche Begründung hierfür ist es, dass diese Aminosäuresequenz keine funktionelle NES darstellt. Denkbar wäre aber auch, dass pp65 mittels eines Adaptorproteins an CRM1 bindet und so aus dem Kern in das Zytoplasma transportiert wird. Für das an der Zellzyklus-Regulation beteiligte Protein p27<sup>Kip1</sup> wurde beispielsweise beschrieben, dass eine Interaktion mit dem sog. *Jun activation domain binding protein* (JAB-1) als Adaptor zu CRM1 dessen nukleären Export ermöglicht (Tomoda *et al.*, 2002).

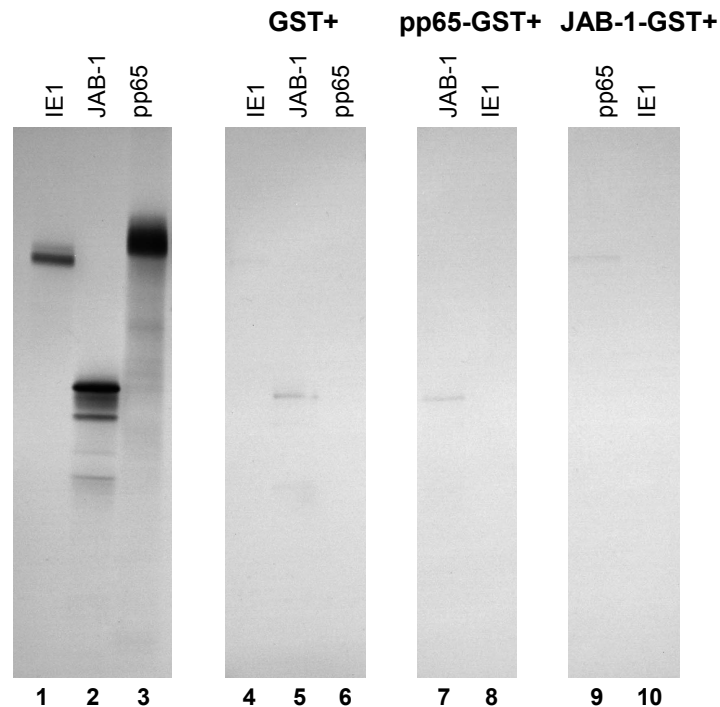
## 3.2 Untersuchung der Interaktion von pp65 mit dem zellulären JAB-1

Das JAB-1 reguliert durch Bindung an c-jun die AP-1-vermittelte Transkription (Claret *et al.*, 1996). Daneben wurde beschrieben, dass es durch direkte Interaktion die Stabilität von definierten Proteinen beeinflussen kann. So führt JAB-1 z.B. zu der Degradation von p27<sup>Kip1</sup>, eines Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors. Dies hat die Aufhebung des p27<sup>Kip1</sup>-induzierten Zellzyklusarrests zur Folge (Tomoda *et al.*, 1999, Tomoda *et al.*, 2002). Auch die Degradation des Tumorsuppressorproteins p53 wird durch JAB-1 beschleunigt (Bech-Otschir *et al.*, 2001).

Bei der Suche nach Interaktionspartnern des pp65 konnte in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Test JAB-1 als möglicher Interaktionspartner identifiziert werden (Thirion & Plachter, unveröffentlichte Daten). In der vorliegenden Arbeit sollte diese Wechselwirkung verifiziert und näher untersucht werden.

### 3.2.1 GST-Fällungsexperimente

Mit Hilfe von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fällungsexperimenten sollte die Interaktion von pp65 mit JAB-1 *in vitro* nachgewiesen werden. pp65 wurde in Fusion mit GST als „Fängerprotein“ in Bakterien exprimiert, während JAB-1 („Suchprotein“) durch *in vitro* Transkription und Translation (TNT) radioaktiv markiert wurde. Nach Koinkubation der beide Proteine wurde ungebundenes Protein durch mehrmaliges Waschen entfernt. Diese Waschschrte werden durch die Bindung des pp65-GST an Glutathion-Sepharose ermöglicht, die durch Zentrifugation pelletiert werden kann. Der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE folgte eine Autoradiographie. Auf dem Röntgenfilm lies sich im Falle einer Wechselwirkung von „Fängerprotein“ und radioaktiv markiertem Protein eine Bande mit einer elektrophoretischen Mobilität erkennen, die der des Suchproteins entsprach. Zudem wurde das Gel mit Fairbanks-Lösung gefärbt, um die Verwendung von vergleichbaren Mengen an GST-Fängerproteinen zu verifizieren. Als Negativkontrolle wurde radioaktiv-markiertes IE1 des HCMV verwendet, welches bekanntermaßen nicht an pp65 bindet. In einem weiteren Ansatz wurde JAB-1 in Fusion mit GST als „Fängerprotein“ exprimiert und pp65 radioaktiv markiert eingesetzt. Alle radioaktiv-markierten Proteine wurden außerdem mit an Glutathion-Sepharose gebundener GST inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Proteine an die Sepharose-Kügelchen oder GST auszuschließen.



**Abbildung 27:** GST-Fällungstest. Radiogramm eines 12,5 %igem Polyacrylamidgels. Spur 1-3: je 2 µl des *in vitro* TNT-Ansatzes. Spur 4-6: Verwendung von GST als Fängerprotein (Negativkontrolle); Spur 7 + 8: Verwendung von pp65-GST als Fängerprotein; Spur 9 + 10: Verwendung von JAB-1-GST als Fängerprotein.

Zur Kontrolle der Translationseffizienz und Qualität wurden jeweils 2 µl des *in vitro* TNT Ansatzes auf ein 12,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. In jeder Spur war eine durch Schwärzung des Röntgenfilms hervorgerufene deutliche Bande zu sehen. Während IE1 (Spur 1) und JAB-1 (Spur 2) in etwa gleicher Stärke exprimiert wurden, zeigte sich bei pp65 (Spur 3) eine stärkere Expression. Bei JAB-1 waren einige Abbaubanden zu sehen.

In Spur 7 wurde pp65-GST aufgetragen, das mit 7 µl des radioaktiv markierten JAB-1 inkubiert wurde. In dieser Spur war eine schwache Bande zu sehen, die auf JAB-1 zurückzuführen ist. Allerdings findet man diese Bande auch in Spur 5, in der GST nach Inkubation mit JAB-1 aufgetragen wurde. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass JAB-1 unspezifisch an GST und/oder die Glutathion-Sepharose-Kügelchen bindet.

In Spur 8 wurde die Negativkontrolle aufgetragen, für die das pp65-GST mit IE1 inkubiert wurde. Wie erwartet war keine Bande zu erkennen.

Die Ansätze, in denen JAB-1 in Fusion mit GST als „Fängerprotein“ eingesetzt wurde, sind in Spur 9 und 10 gezeigt. Bei der Koinkubation von JAB-1-GST mit pp65 (Spur 9) zeigte sich im Gel eine sehr schwache Bande, die auf eine sehr schwache Interaktion hindeuten könnte. Auch das Fehlen einer Bande in Spur 6, in der als Kontrolle GST nach Inkubation mit radioaktiv-markiertem pp65 aufgetragen wurde, führt zu der Annahme, dass es sich um eine spezifische Reaktion handelt. Die Inkubation von IE1 mit JAB-1-GST als Negativkontrolle führte wie erwartet zu keiner Interaktion, die durch eine Bande sichtbar wäre (Spur 10).



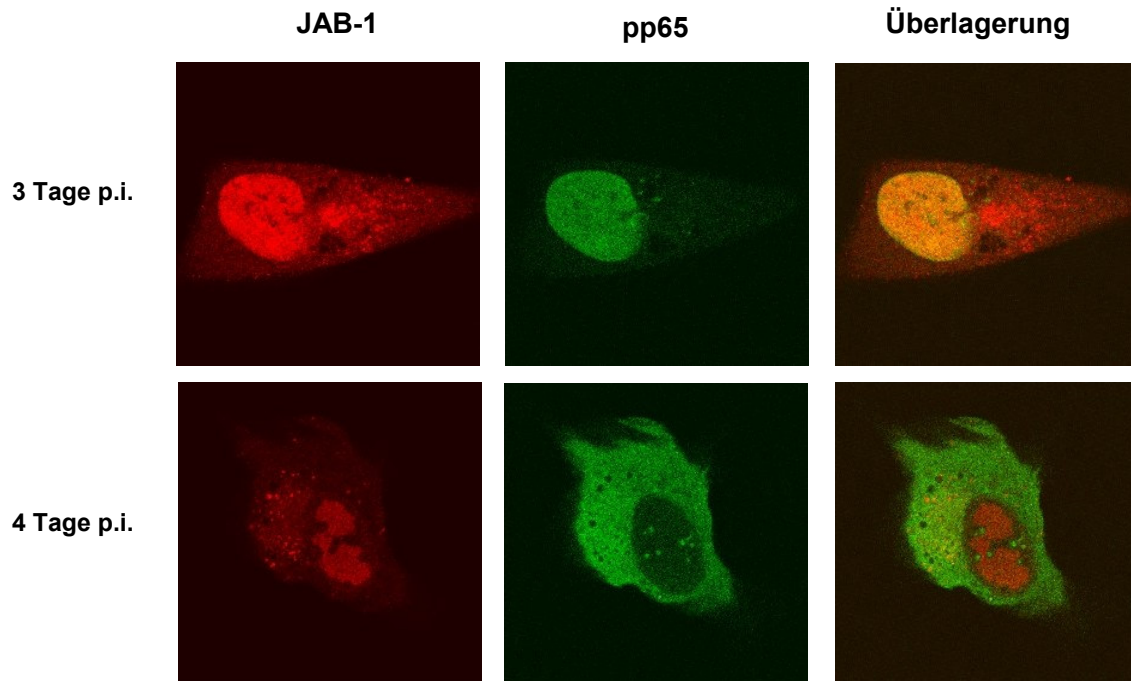
Diese GST-Fällungs-Experimente konnten keine starke Interaktion von pp65 mit JAB-1 nachweisen. Bei der Interpretation der Ergebnisse darf allerdings nicht vernachlässigt werden, dass die Versuchsbedingungen unter denen die Inkubation der Proteine (Puffer, Salzkonzentration, Detergenz) stattfindet, nicht den in der Zelle herrschenden Bedingungen gleicht. Es ist durchaus denkbar, dass eine in der Zelle wichtige Interaktion zweier Proteine *in vitro* nicht nachgewiesen werden kann, da sie möglicherweise noch durch andere Faktoren beeinflusst wird (z.B. Wechselwirkung mit weiteren Proteinen). Weiterhin ist denkbar, dass bakteriell exprimierte Proteine aufgrund fehlender posttranslationaler Modifikationen wie Glykosylierung und Phosphorylierung nicht ihre native Form besitzen und somit nicht in der Lage sind, andere Proteine zu binden. Zusammengefasst konnte mit Hilfe der GST-Fällungsansatzes *in vitro* kein eindeutiger Beweis einer Interaktion von pp65 mit JAB-1 erbracht werden.

### **3.2.2 Laser Scan Mikroskopie**

#### **3.2.2.1 Lokalisation von JAB-1 und pp65 in infizierten Zellen**

Mit Hilfe der Laser Scan Mikroskopie (LSM) sollte versucht werden, über eine Kolo-kalisation von pp65 mit JAB-1 einen Hinweis auf die Interaktion der beiden Proteine in infizierten Zellen zu erhalten. Für diesen Versuch wurden humane Fibroblasten mit einer MOI von 1 mit Ad169 infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit JAB-1- und pp65-spezifischen Antikörper angefärbt und im LSM untersucht. Drei Tage nach Infektion mit HCMV (Abbildung 28 oben) fand sich JAB-1 (rote Fluoreszenz) im Zellkern und in Teilen des Zytoplasmas lokalisiert, wohingegen pp65 (grüne Fluoreszenz) ausschließlich im Zellkern zu finden war. Bei Überlagerung der beiden Fluoreszenzen wurden durch die resultierende gelbe Fluoreszenz Bereiche im Zellkern erkennbar, in denen beide Proteine kolo-kalisieren. Diese Kolo-kalisation muss allerdings nicht notwendigerweise in einer Interaktion der beiden Proteine begründet sein. Um zu überprüfen, ob pp65-Expression in der infizierten Zelle einen Einfluss auf die Lokalisation von JAB-1 hatte, wurden parallele Untersuchungen mit einer pp65-defizienten HCMV-Mutante (RVAd65) durchgeführt. Im Vergleich zu mit Wildtyp-HCMV infizierten Zellen fand sich allerdings in RVAd65-infizierten Zellen keine veränderte Lokalisation von JAB-1 (Daten nicht gezeigt).

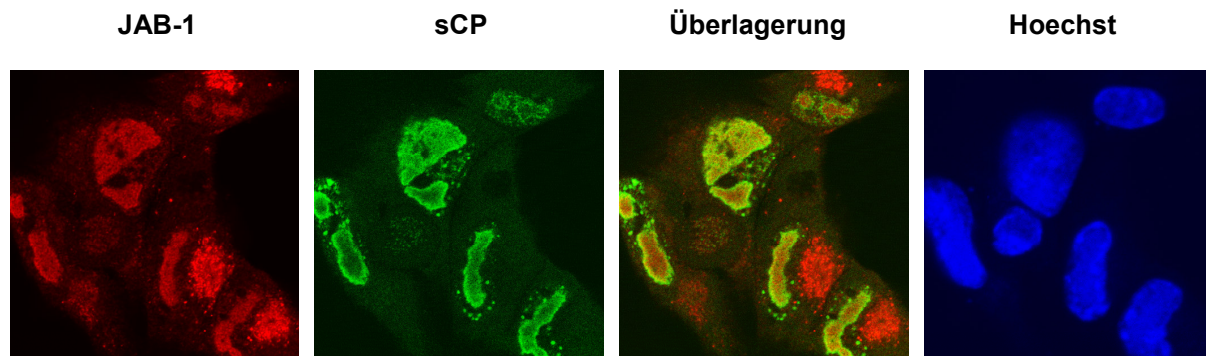
Abbildung 28 unten zeigt eine spät infizierte Zelle vier Tage p.i.. Typisch für diese Phase der Infektion ist die Lokalisation von pp65 im Zytoplasma. Charakteristisch sind die im Zellkern zu sehenden Einschlusskörperchen, von denen vermutet wird, dass sie den Ort der Kapsid-Morphogenese darstellen. Besonders auffällig ist auch die im Vergleich zu früh infizierten Zellen veränderte Lokalisation von JAB-1 in diesen nukleären Einschlusskörperchen. Bei Überlagerung der beiden Fluoreszenzen war keine Kolo-kalisation von JAB-1 und pp65 zu erkennen.



**Abbildung 28:** LSM von infizierten Fibroblasten drei (oben) und vier (unten) Tage nach Infektion. Färbungen wurden mit einem JAB-1- (rote Fluoreszenz, links) und pp65-spezifischen Antikörper (grüne Fluoreszenz, Mitte) durchgeführt. Überlagerung beider Fluoreszenzen resultiert in gelber Fluoreszenz (rechts).

### 3.2.2.2 Lokalisation von JAB-1 und dem viralen Kapsidprotein sCP in infizierten Zellen

Bei den Untersuchungen der Kolo-kalisation von pp65 mit JAB-1 in infizierten Zellen 4 Tage p.i. war eine deutliche Anfärbung der für HCMV-typischen, nukleären Einschlusskörperchen aufgefallen. Diese Strukturen sind bekanntermaßen Orte der viralen Kapsid-Morphogenese. In einem weiteren Experiment sollte daher untersucht werden, ob JAB-1 mit Proteinen des viralen Kapsids interagiert. Hierzu wurden Fibroblasten mit HCMV infiziert und fünf Tage nach Infektion einer Immunfluoreszenzfärbung des viralen Kapsidproteins sCP (*smallest Capsid Protein*) und von JAB-1 unterzogen. Durch eine Färbung der zellulären DNA mit Höchstfarbstoff konnte die Lage des Zellkerns bestimmt werden (Abbildung 29 rechts). JAB-1 (rote Fluoreszenz, links) wies die in 3.2.2.1 bereits beschriebene nukleäre Lokalisation auf. In einigen Zellen (im Bild unten rechts) befand sich JAB-1 Anfärbung zusätzlich in zytoplasmatischen Strukturen, die in anderen Versuchen als Anteile des Golgi-Apparates identifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Auch das sCP war im Zellkern lokalisiert, mit einer zum Rand hin stärker werdenden Fluoreszenz (Abbildung 29 2. v. links). Durch Überlagerung der beiden Fluoreszenzen (Abbildung 29 2. v. rechts) konnte eine deutliche Kolo-kalisation der beiden Proteine beobachtet werden. Dieser Versuch zeigte, dass JAB-1 an Orten der Kapsidmorphogenese des HCMV lokalisiert ist.



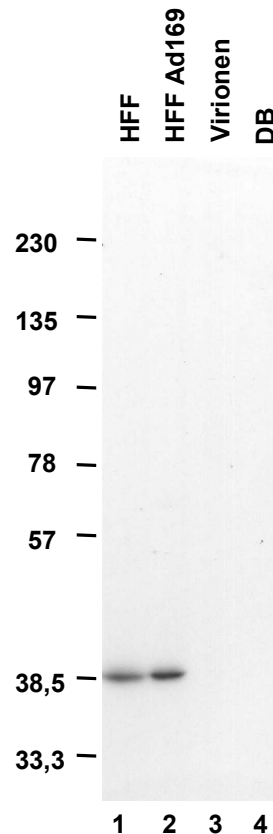
**Abbildung 29:** LSM von infizierten Fibroblasten. HFF wurden mit HCMV infiziert und fünf Tage nach Infektion mit dem JAB-1- (rote Fluoreszenz) und HCMV sCP-spezifischem Antikörper (grüne Fluoreszenz) angefärbt. Durch Verwendung des DNA-Farbstoffes Hoechst konnte die Lokalisation des Zellkerns identifiziert werden (rechts). Überlagerung beider Fluoreszenzen resultiert in gelber Fluoreszenz.

### 3.2.2.3 Untersuchung von Viruspartikeln auf das Vorhandensein von JAB-1

Viele Viren verpacken bei ihrer Morphogenese zelluläre Proteine in ihre Viruspartikel. Die beobachtete Kolo-kalisation von JAB-1 mit dem sCP von HCMV warf die Frage auf, ob JAB-1 in HCMV-Viruspartikel verpackt wird. Im Falle einer Verpackung wäre denkbar, dass JAB-1 pp65 direkt nach Eintritt der Virionen in die Zelle der proteasomalen Degradation zuführt.

In Western Blot Analysen sollte daher untersucht werden, ob JAB-1 in HCMV-Viruspartikeln zu finden ist. Außerdem sollte überprüft werden, ob JAB-1 durch pp65 modifiziert wird. Da bekannt ist, dass pp65 eine Kinaseaktivität besitzt (Yao *et al.*, 2000), wäre eine Phosphorylierung von JAB-1 durch pp65 denkbar. Für diesen Versuch wurden humanen Vorhautfibroblasten (HFF), HCMV-infizierte HFF, Virionen und DB mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einem JAB-1-spezifischen Antikörper inkubiert.

Der Western Blot (Abbildung 30) zeigte deutlich das Vorhandensein des 38 kDa großen JAB-1 in infizierten und nicht-infizierten HFF. Es war keine Größenveränderung des Proteins in infizierten Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen erkennbar, die auf eine Phosphorylierung hindeuten könnte. Im Gegensatz zu den Zellen war weder in Virionen noch in DB JAB-1 nachzuweisen.



**Abbildung 30:** Nachweis von JAB-1 in Viruspartikeln. Western Blot mit JAB-1-spezifischem Antikörper. Spur 1: Ad169-infizierte HFF, Spur 2: HFF, Spur 3: Ad169-Virionen, Spur 4: DB.

### 3.2.3 Einfluss von JAB-1-Überexpression auf die pp65 Erkennung

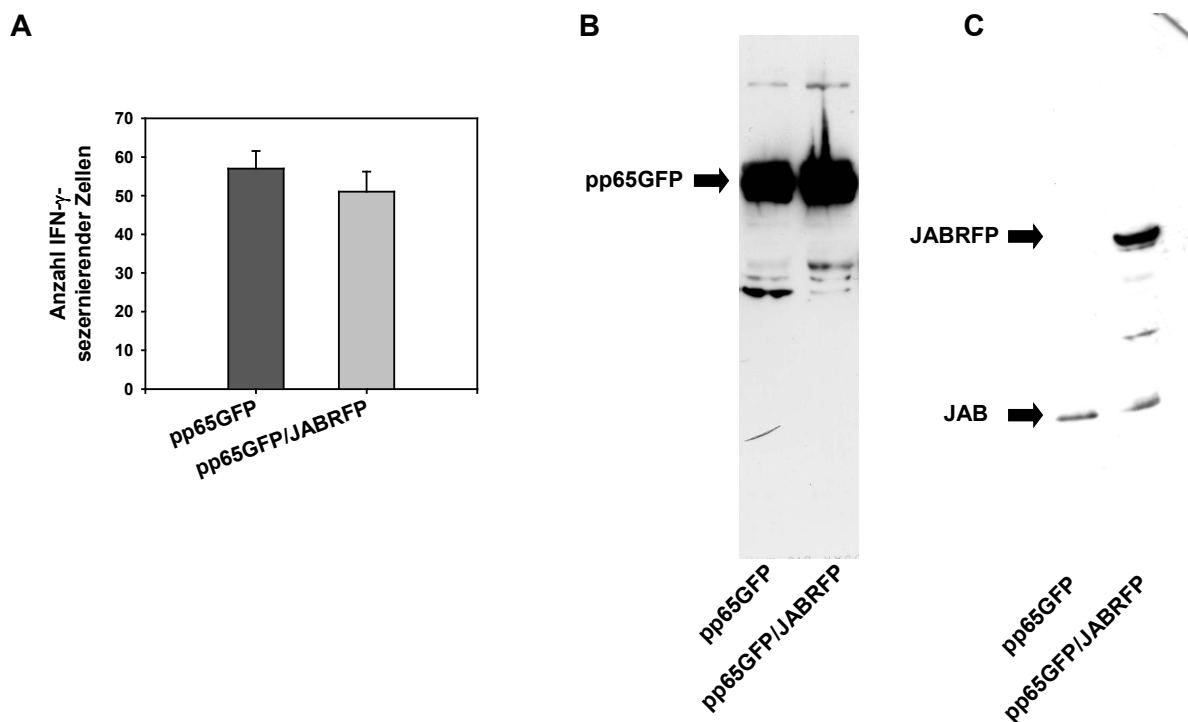
JAB-1 führt bei Überexpression zu einer verstärkten Degradation bestimmter Proteine. Um der Frage nachzugehen, ob JAB-1 die Degradation von pp65 beeinflusst, wurden 293T-Zellen mit pp65GFP und/oder mit JABRFP, einem für ein Fusionsprotein aus JAB-1 und dem *red fluorescent protein* aus der Seeanemone *Discosoma sp.* kodierenden Plasmid, transfiziert. Diese Fusionsproteine mit fluoreszierenden Proteinen wurden gewählt, um die Transfektionsrate auch ohne Fixierung und Immunfärbung der Zelle zu analysieren. Außerdem ermöglicht diese Methode, zwischen zellulärem (ungefärbten) und transfiziertem (gefärbten) und damit überexprimierten JAB-1 zu unterscheiden. Zwei Tage nach Transfektion wurden diese Zellen im ELISpot mit den Effektoren CD8xA2pp65 als Zielzellen verwendet.

Wie Abbildung 31 A zeigt, reagierten 60 der eingesetzten 100 Effektorzellen auf den Stimulus mit pp65GFP transfizierten Zellen mit der Sekretion von IFN- $\gamma$ . Durch Überexpression des JAB-1 kam es zu keiner deutlichen Veränderung der Erkennung dieser Zielzellen.

Parallel dazu wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob die

Menge an pp65 sowohl in Zellen die nur mit pp65GFP als auch in Zellen, die zusätzlich mit JABRFP transfiziert worden waren, vergleichbar waren. Transfizierte Zellen wurden auf einem Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit dem pp65-spezifischen Antikörper 65-33 nachgewiesen. Wie aus Abbildung 31 B ersichtlich, war die Expression des pp65GFP in beiden verwendeten Zielzellansätzen gleich. Anschließend wurden die Antikörper von der PVDF-Membran abgelöst und eine erneute Färbung mit einem JAB-1-spezifischen Antikörper angeschlossen. In beiden Spuren war das zelluläre JAB-1 nachweisbar (Abbildung 31 C). In Zellen, die neben pp65GFP auch mit JABRFP transfiziert worden waren, war zusätzlich eine Bande bei etwa 70 kDa zu sehen, die auf das JABRFP zurückzuführen ist.

Durch diesen Versuch konnte demonstriert werden, dass die Überexpression von JAB-1 die Antigenerkennung pp65-exprimierender Zellen weder steigert noch reduziert.



**Abbildung 31:** Einfluss von JAB-1 auf die Erkennung von pp65. **A:** 293T-Zellen wurden mit pp65GFP oder mit pp65GFP und JABRFP transfiziert und zwei Tage später in einem 20 Stunden IFN- $\gamma$ -ELISpot mit einer Zellzahl von  $10^5$ /Well verwendet. Die Effektoren CD8xA2pp65 wurden mit einer Zellzahl von 100/Well eingesetzt. **B:** Western Blot mit pp65-spezifischem Antikörper. **C:** Western Blot mit JAB-1-spezifischem Antikörper. Die nachgewiesenen Proteinbanden sind durch Pfeile markiert.

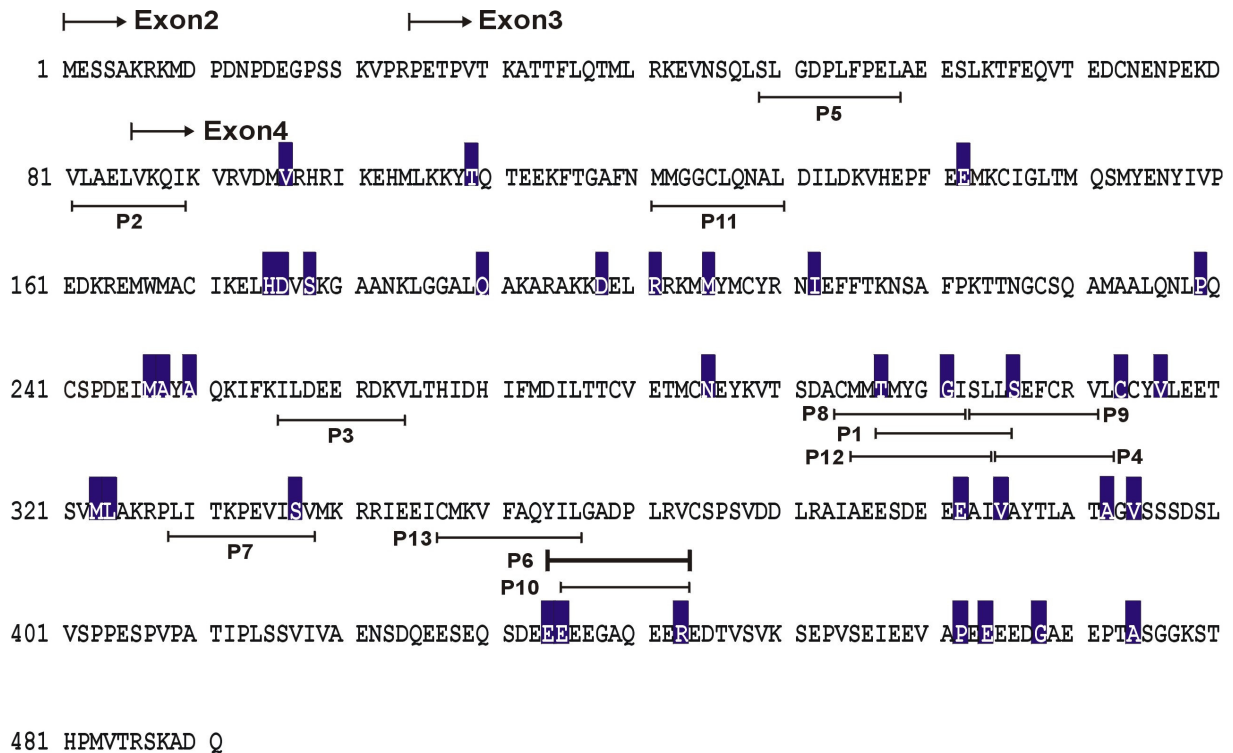
### **3.3 Identifikation eines HLA-A2-präsentierten Peptids aus dem IE1-Protein des HCMV**

Neben pp65 ist auch IE1 als wichtige CTL-Zielstruktur des HCMV identifiziert worden (Borysiewicz *et al.*, 1988a; Borysiewicz *et al.*, 1988b). Allerdings ist die Rolle des IE1 in der Kontrolle einer HCMV-Infektion noch unklar. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, auch die gegen IE1 gerichtete CTL-Antwort näher zu charakterisieren. Grundlegende Voraussetzung für derartige Untersuchungen stellt die Verfügbarkeit von CTL-Linien gegen IE1 dar. Um die pp65- und IE1-spezifische Immunantwort im gleichen genetischen Hintergrund analysieren können, sollten HLA-A2-restringierte IE1-spezifische CTL generiert werden. Dies sollte analog dem Vorgehen zur Generierung von pp65-spezifischen CTL im HLA-A2-transgenen Mausmodell erfolgen. Im Gegensatz zu pp65 war allerdings zu Beginn der Arbeit kein geeignetes Epitop des IE1 bekannt. Um möglichst vergleichbare CTL zu generieren, sollte das für die Immunisierung benötigte Peptid mit hoher Affinität an HLA-A2 binden. Zudem sollte dieses Peptid aus einer konservierten Region des IE1-Proteins stammen, um seine Frequenz bei HCMV-seropositiven Spendern stammübergreifend nachweisen zu können und somit die biologische Relevanz bei der Immunkontrolle einer HCMV-Infektion *in vivo* zu bestätigen. Ziel war es daher zunächst, ein Peptid in der Primärstruktur des IE1 zu identifizieren, welches diesen Anforderungen genüge.

#### **3.3.1 Auswahl von Peptiden mit HLA-A\*0201-Bindemotiv aus IE1**

Aufgrund zahlreicher Untersuchungen der Bindungseigenschaften von CTL-Epitopen konnte von Rammensee und Kollegen ein Computerprogramm entwickelt werden, mit dessen Hilfe bevorzugte Bindungsmotive für bestimmte MHC Klasse I-Moleküle vorherbestimmt werden können (Rammensee *et al.*, 1999). Für das HLA-A\*0201-Molekül wurden als Ankeraminoacids Leucin an Position 2 und Leucin oder Valin am C-Terminus beschrieben (Falk *et al.*, 1991). In anderen Arbeiten wurde der Einfluss von verschiedenen Aminosäureresten an bestimmten Nicht-Anker-Positionen des Peptids auf die Bindung an das HLA-A2-Molekül näher charakterisiert (Ruppert *et al.*, 1993).

Mit Hilfe der SYFPEITHI-Datenbank (Rammensee *et al.*, 1999) und unter Berücksichtigung der Daten von Ruppert (1993) wurden aus der Aminosäuresequenz des IE1-Proteins aus dem HCMV-Stamm Ad169 13 Peptide mit HLA-A\*0201- Bindemotiv ausgewählt. Die Lage dieser Peptide innerhalb des IE1-Leserahmens ist in Abbildung 32 wiedergegeben. Durch den Vergleich der IE1-Sequenzen verschiedener HCMV-Stämme konnten nicht konservierte Aminosäuren in diesem Leserahmen identifiziert werden (Chou, 1992, Zwegberg Wirgart *et al.*, 1998, Retiere *et al.*, 1998). Sie sind in Abbildung 32 farblich hervorgehoben.



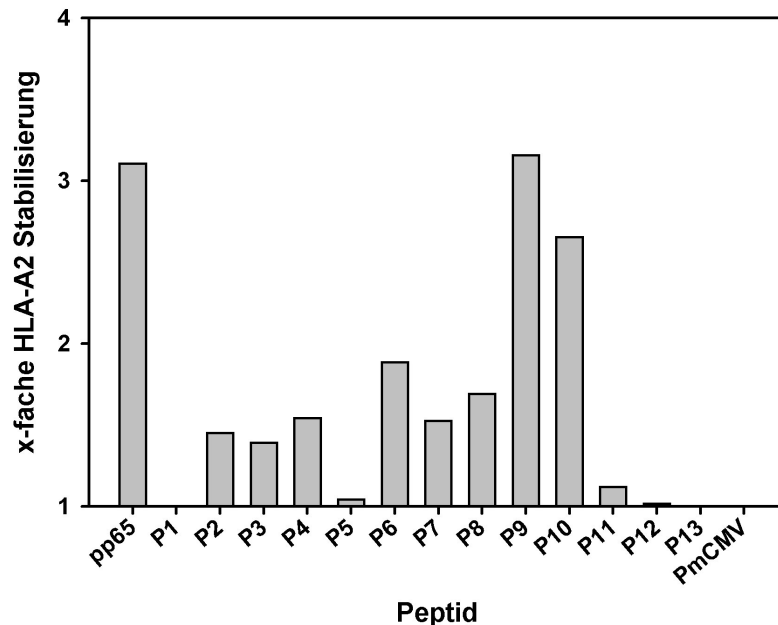
**Abbildung 32:** Aminosäuresequenz des IE1-Proteins aus dem HCMV-Stamm Ad169. Die ausgewählten Peptide sind durch Balken markiert. Die in verschiedenen HCMV-Stämmen nicht konservierten Aminosäuren sind lila unterlegt.

### 3.3.2 Untersuchung der HLA-A2-Bindungskapazität

Voraussetzung für die Induktion einer CTL-Antwort ist die Bindung von Peptiden an MHC Klasse I-Moleküle. Im folgenden Versuch sollte die Fähigkeit der 13 aus dem Leserahmen des IE1 ausgewählten Peptide analysiert werden, an HLA-A2 zu binden. Diese Untersuchung wurde mit Hilfe des MHC Klasse I-Stabilisierungstest auf T2-Zellen durchgeführt. Da T2-Zellen keinen TAP besitzen, gelangen nur wenige Peptide zur Beladung der MHC-Moleküle in das ER. Diese Peptide stammen meist aus im ER abgespalteten Signalpeptiden. MHC Klasse I-Moleküle sind allerdings ohne Peptid nur wenige Minuten an der Oberfläche von Zellen stabil; sie werden schnell internalisiert und degradiert. Aus diesem Grund haben T2-Zellen *per se* nur eine geringe MHC Klasse I-Oberflächenexpression. Durch exogene Zugabe von Peptiden können jedoch die MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche stabilisiert werden. Dabei korreliert die Dauer der Oberflächenexpression und die Anzahl der stabilisierten MHC-Moleküle mit der Affinität des zugegebenen Peptids.

Um die Bindungskapazität der 13 ausgewählten Peptide an HLA-A2 messen zu können, wurden TAP-defiziente HLA-A2-positive T2-Zellen mit dem jeweiligen Peptid für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Oberflächenexpression von MHC Klasse I-Molekülen nach Färbung mit einem MHC Klasse I-spezifischen Antikörper im FACS analysiert. Als Positivkontrolle diente das HLA-A2-präsentierte Peptid aus pp65 (AS 495-503), für das eine starke HLA-A2-Bindekapazität beschrieben ist (Wills *et al.*, 1996, Diamond *et al.*, 1997). Ein

irrelevantes K<sup>d</sup>-bindendes Peptid aus dem mCMV-Protein M84 wurde als Negativkontrolle verwendet (PmCMV).



**Abbildung 33:** Stabilisierung von HLA-A2 auf der Oberfläche von T2-Zellen nach exogener Zugabe von synthetischen Peptiden. Die MHC Klasse I-Oberflächenexpression wurde nach Anfärbung mit dem HLA-ABC-spezifischen Antikörper W6/32 im FACS gemessen. Als Positivkontrolle wurde das HLA-A2-präsentierende Peptid pp65<sub>495-503</sub> verwendet, als Negativkontrolle ein K<sup>d</sup>-bindendes Peptid aus mCMV M84 (PmCMV).

Die Inkubation von T2 mit pp65<sub>495-503</sub> führte wie erwartet zu einem starken Anstieg der MHC Klasse I-Oberflächenexpression (Abbildung 33). Die Affinität der IE1-Peptide variierte hingegen stark: während die Zugabe der Peptide P1, P5, P11, P12, P13 und der Negativkontrolle PmCMV keine oder nur äußerst geringe Veränderungen bewirkten, führten die Peptide P9 und P10 in vergleichbarer Weise wie pp65<sub>495-503</sub> zu einer etwa dreifachen Erhöhung der MHC Klasse I-Expression. Einige Peptide (P2-P4, P6-P8) zeigten mittlere Affinität zu HLA-A2, die Steigerung der MHC Klasse I-Expression betrug hier zwischen 40 und 80 %.

Drei Peptide mit der höchsten Bindekapazität an HLA-A2-die Peptide P6, P9 und P10-wurden für weitere Versuche ausgewählt.

### 3.3.3 Anlage von humanen T-Zell-Linien

Obwohl die Bindung an bestimmte MHC Klasse I-Moleküle mit hoher Affinität Voraussetzung für die Antigenität eines Peptids ist, führen nicht alle in dieser Weise identifizierten Peptide *in vivo* zu einer signifikanten CTL-Antwort. Um herauszufinden, welches IE1-Peptid auch *in vivo* generiert wird und zu einer messbaren T-Zell-Antwort führt, wurden aus dem Blut gesunder HCMV-seropositiver, HLA-A2-positiver Spender T-Zell-Kulturen angelegt. Im Blut vorhandene Gedächtnis-T-Zellen werden nur durch solche Peptide zur Proliferation *in vitro*



angeregt, die während der Virusinfektion *in vivo* generiert und durch MHC Klasse I-Moleküle in geeigneter Weise präsentiert wurden.

Zur Anlage der T-Zell-Kulturen wurden PBMC aus frischem heparanisiertem Vollblut oder *Buffy Coats* isoliert und mit den Peptiden P6, P9 oder P10 kokultiviert. Die T-Zellen wurden einmal pro Woche mit Peptid beladenen, bestrahlten, PHA-aktivierten B-Zell-Blasten restimuliert. Zudem wurde rekombinantes humanes IL-2 als spezifischer Wachstumsfaktor für T-Zellen zugegeben. Nach 3-4 Wochen wurde ihre zytolytische Aktivität in CFTs überprüft. Auf diese Weise konnten aus dem Blut zweier HLA-A2-homozygoter Spender (A+B) T-Zell-Linien etabliert werden, die gegen P6 gerichtet waren. Bei diesen T-Zell-Kulturen konnte ein traubenförmiges Wachstum der Zellen beobachtet werden; die Lebensdauer einer auf diese Weise angelegten humanen T-Zell-Kultur betrug zwischen 6 und 10 Wochen.

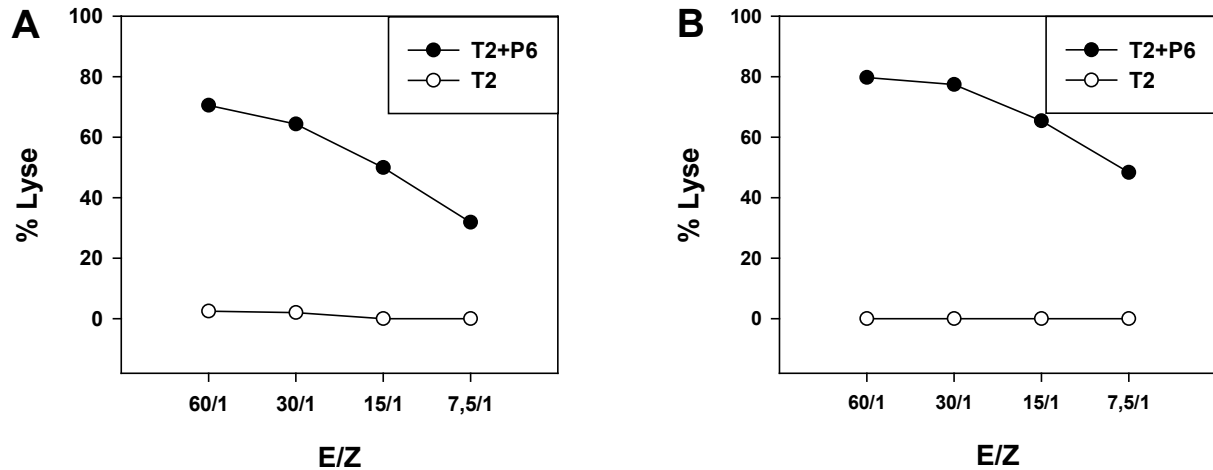
T-Zell-Kulturen, die mit den Peptiden P9 und P10 angelegt waren, zeigten schlechtes Wachstum und waren nicht in der Lage, Peptid-beladene Zellen zu lysieren.

Bei mehreren Wiederholungen zeigte sich, dass die Stimulation mit Peptid nicht immer zu der Proliferation von T-Zellen führte. Außerdem gelang es nicht, P6-spezifische T-Zellen aus PBMC HLA-A2-heterozygoter Spender zu generieren. Um zu verifizieren, dass die Generierung P6-spezifischer CTL auf die Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen und nicht auf eine *ex vivo-Priming* zurückzuführen ist, wurden parallel PBMC aus HCMV-seronegativen Spendern restimuliert. Hier konnte keine Proliferation der Zellen beobachtet werden. Dies deutete darauf hin, dass das verwendete Protokoll in der Tat zur Expansion von P6-spezifischen Gedächtniszellen geführt hatte.

### **3.3.4 Lyse von Peptid-beladenen und infizierten Zellen**

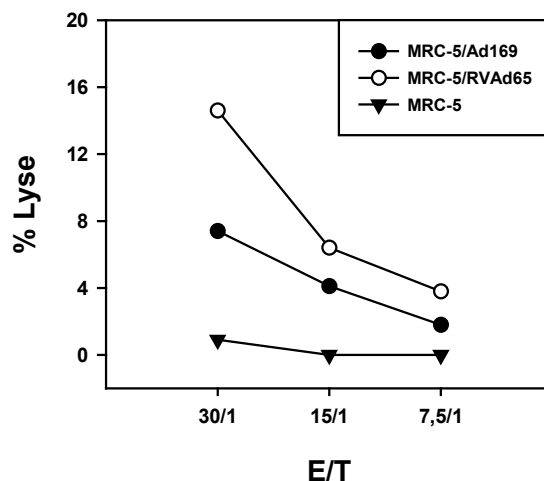
Eine charakteristische und namensgebende Eigenschaft von zytotoxischen T-Zellen ist die Erkennung und Lyse von APZ, die im CFT gemessen werden kann. Die durch Peptid-Restimulation generierten T-Zellen sollten auf diese Eigenschaft getestet werden.

Als Zielzellen wurden exogen mit synthetischem Peptid beladene T2-Zellen gewählt, da sie aufgrund des fehlenden TAP nur wenige endogene Peptide auf ihrer Oberfläche präsentieren können und somit eine hohe Dichte an mit dem exogen zugegebenen Peptid beladenen MHC Klasse I-Molekülen präsentieren. Die lytische Aktivität der T-Zell-Linien, die aus PBMC von Spender A (als A-P6 bezeichnet) und B (als B-P6 bezeichnet) generiert wurden, wurde bei verschiedenen E/Z bestimmt. In Abbildung 34 sieht man, dass mit P6 angelegte CTLL geeignet waren, exogen mit P6 beladene T2-Zellen effizient zu lysieren. Bei einem E/Z von 60/1 wurden 70 % (Spender A) bzw. 80 % (Spender B) der mit  $5 \times 10^{-7}$  M P6 beladenen T2 erkannt. Auch bei niedrigeren E/Z von 7,5:1 waren noch 35 % (Spender A) bzw. 50 % (Spender B) Lyse zu beobachten.



**Abbildung 34:** Lyse von Peptid beladenen T2-Zellen. Die Lyse von mit  $5 \times 10^{-7}$  M P6 beladenen T2-Zellen wurde in einem 4 Stunden CFT bestimmt. A: Die CTLL A-P6 wurde nach 6 Restimulationen mit verschiedenen E/Z eingesetzt. B: Erkennung Peptid-beladener T2 durch die CTLL B-P6 nach 6 Restimulationen. Als Negativkontrolle dienten T2 ohne Zugabe von Peptid.

Allerdings konnte dieser Versuch nicht die Frage beantworten, ob das Peptid P6 aus IE1 auch bei HCMV-Infektion durch endogene Prozessierung des IE1-Proteins generiert und präsentiert wird. Aus diesem Grunde wurden HCMV-infizierte Fibroblasten als Zielzellen in einem weiteren CFT eingesetzt. Dazu wurden die HLA-A2-positiven humanen embryonalen Lungenfibroblasten MRC-5 verwendet, die nach einer Vorbehandlung mit  $\text{IFN-}\gamma$  mit dem HCMV-Laborstamm Ad169 oder der pp65-Deletionsmutante RVAd65 infiziert wurden. In Abbildung 35 ist exemplarisch die in einem 6 stündigen CFT gemessene lytische Aktivität der P6-spezifischen CTLL A-P6 gezeigt.



**Abbildung 35:** Lyse von infizierten Fibroblasten durch P6-spezifische CTLL. MRC-5 wurden nach einer Vorbehandlung mit  $\text{IFN-}\gamma$  für 72 Stunden mit Ad169 oder der pp65-Mutante RVAd65 infiziert und nach 16 Stunden in einem 5,5 Stunden CFT verwendet. Als Effektoren wurde die CTLL A-P6 in den gezeigten E/Z verwendet.

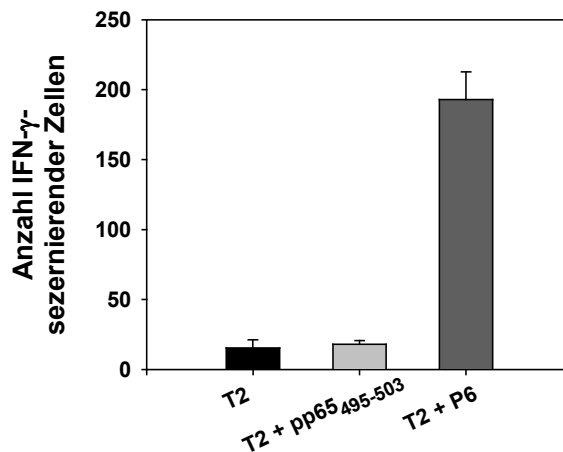
Während nicht-infizierte MRC-5 von der P6-spezifischen CTLL nicht erkannt wurden, wurden sowohl Ad169- als auch RVAd65-infizierte MRC-5 lysiert. Allerdings lag hier die Lyse bei einem E/Z von 30/1 nur bei 8 % (Ad169-infizierte MRC-5) bzw. 15 % (RVAd65-infizierte MRC-5). Dieser Versuch zeigte, dass P6 auch im Rahmen der viralen Infektion aus IE1 freigesetzt und auf HLA-A2 präsentiert wird.

### 3.3.5 IFN- $\gamma$ -Produktion P6-spezifischer CTLL

In einem ELISpot sollte untersucht werden, ob die durch Restimulation mit P6 aus PBMC generierten CTLL aus Spender A in der Lage sind, IFN- $\gamma$  zu sezernieren.

Dazu wurden T2-Zellen mit P6 beladen und 20 Stunden mit den P6 spezifischen T-Zellen kokultiviert. Als Kontrolle, ob es sich um eine spezifische IFN- $\gamma$  Ausschüttung handelt, wurden neben T2-Zellen ohne Peptid auch T2-Zellen verwendet, die mit dem hier irrelevanten pp65<sub>495-503</sub> beladen wurden.

Aus Abbildung 36 ist ersichtlich, dass etwa 200 der im Test eingesetzten 5000 Effektorzellen auf Stimulus mit P6-beladenen Zielzellen mit der Sekretion von IFN- $\gamma$  reagierten. T2-Zellen ohne Peptid und pp65<sub>495-503</sub>-beladene T2-Zellen wurden kaum erkannt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass P6-spezifische CTLL neben der zytolytischen Aktivität die Fähigkeit besitzen, auf Stimulus mit P6-beladenen Zellen IFN- $\gamma$  zu sezernieren.



**Abbildung 36:** IFN- $\gamma$ -ELISpot mit Peptid-beladenen T2-Zellen. Die Sekretion von IFN- $\gamma$  durch die CTLL A-P6 nach Kokultivierung von mit P6 beladenen T2-Zellen wurden in einem 20 Stunden ELISpot gemessen. Als Negativkontrolle dienten T2-Zellen ohne Peptid und pp65<sub>495-503</sub>-beladene T2-Zellen. Pro Well wurden 5000 Effektorzellen verwendet. Die Peptidkonzentration lag bei  $10^{-5}$  M.

### 3.3.6 Messung von Frequenzen P6-spezifischer T-Zellen im Blut HLA-A2 positiver gesunder Spender

Zur Beantwortung der Frage, welche Bedeutung das identifizierte IE1 Peptid P6 in der Überwachung der latenten Infektion *in vivo* hat, wurden ELISpot-Analysen mit PBMC aus dem Blut gesunder HLA-A2-positiver Spender ohne vorherige Restimulation durchgeführt.

Dazu wurden die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit Hilfe von magnetischer Separation durch MACS-Säulen aus den PBMC isoliert und mit einer Zellzahl von  $10^5$  pro *Well* mit Peptid beladenen K562-A2 kokultiviert. Als Positivkontrolle fungierte das HLA-A2 präsentierte pp65<sub>495-503</sub>.

Weder in 14 HCMV-seropositiven noch in 4 HCMV-seronegativen Spendern konnten gegen P6 gerichtete CTL detektiert werden. Hingegen konnte bei 12 der 14 seropositiven Spendern Reaktivität gegen das pp65-Peptid gemessen werden; bei den 4 seronegativen Spendern wurde wie erwartet keine Reaktivität gegen IE1 oder pp65 beobachtet. Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass P6-spezifische Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut nur in geringer Frequenz, unterhalb der Nachweisgrenze des ELISpot-Tests, vorkommen, während pp65-spezifische CTL in den meisten HCMV-seropositiven HLA-A2-positiven Spendern *ex vivo* detektierbar sind.

## 4 Diskussion

Das HCMV ist ein Erreger von erheblicher klinischer Bedeutung. Infektionen führen bei immunsupprimierten Patienten trotz der Verfügbarkeit antiviraler Therapeutika noch immer zu schweren Krankheitsverläufen mit hoher Morbidität und Mortalität (Pass, 2001). Bei immunkompetenten Personen hingegen kommt es aufgrund der effizienten Kontrolle der Virusinfektion durch das Immunsystem in der Regel nicht zu schwerwiegenden Erkrankungen. Besonders CD8+-T-Zellen spielen bei der Immunkontrolle der HCMV-Infektion eine herausragende Rolle (Reusser *et al.*, 1991; Cwynarski *et al.*, 2001; Gratama *et al.*, 2001).

HCMV kodiert für mehr als 200 Proteine. Trotz dieser großen Anzahl an möglichen antigenen Zielstrukturen ist die CD8+-T-Zellantwort nur auf wenige virale Proteine fokussiert. Alle bisher veröffentlichten Studien haben gezeigt, dass die im Blut HCMV-seropositiver Spender nachweisbaren CTL im Wesentlichen gegen die Tegumentproteine pp65 und pp150, sowie gegen gB und IE1 gerichtet sind (Borysiewicz *et al.*, 1988a; Borysiewicz *et al.*, 1988b; Gyulai *et al.*, 2000). Als besonders immundominant stellte sich das Tegumentprotein pp65 dar (McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1996; Boppana & Britt, 1996). Aus diesem Protein konnte ein HLA-A2-präsentiertes Peptid identifiziert werden, gegen das eine große Anzahl der CD8+-T-Zellen im Blut gesunder HLA-A2-positiver, HCMV-seropositiver Spender gerichtet ist (AS 495-503; Wills *et al.*, 1996, Diamond *et al.*, 1997). Pp65<sub>495-503</sub>-spezifische CTL konnten in einer Frequenz von bis zu 5 % mittels Tetramer-Färbung im peripheren Blut seropositiver Spender detektiert werden (Gillespie *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002). In einem Einzelfall waren über einen Zeitraum von zwei Jahren sogar etwa 50 % aller CD8+-T-Zellen eines gesunden Spenders gegen dieses dominante Epitop gerichtet (Lang *et al.*, 2002).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe verschiedener Ansätze die Mechanismen, die für die Immundominanz des pp65 verantwortlich sind, aufzuklären. Dazu sollte die Prozessierung und Präsentation des pp65 anhand pp65<sub>495-503</sub>-spezifischer CTL untersucht werden, die durch Immunisierung HLA-transgener Mäuse generiert werden sollten. In einem zweiten Ansatz sollte eine mögliche Wechselwirkung des pp65 mit dem zellulären JAB-1 und deren Einfluss auf die Präsentation des immundominanten Tegumentproteins untersucht werden. Schließlich sollte die 1996 aufgestellte Hypothese einer selektiven Unterdrückung der IE1-Präsentation durch pp65 näher charakterisiert werden (Gilbert *et al.*, 1996).

## 4.1 Immundominanz des pp65

Immundominanz bezeichnet das Phänomen, dass das Immunsystem des Wirtes nur auf einige der vielen möglichen Epitope in fremden Proteinen reagiert. Dieses Phänomen kann sowohl bei Infektionen mit Viren (z.B. LCMV, HCMV, Influenza A Virus) wie auch mit Bakterien (*Listeria monocytogenes*) beobachtet werden (Deng *et al.*, 1997; Weidt *et al.*, 1998; Busch & Pamer, 1998; Brehm *et al.*, 2002). Analyse und Aufklärung der zur Immundominanz führenden Faktoren sind für das Verständnis von immunologischen Vorgängen wichtig und stellen die Grundlage für die Entwicklung wirksamer Vakzinen dar. Es gibt eine Reihe Faktoren, die zur Immundominanz eines bestimmten Antigens beitragen. Der Einfluss und die Gewichtung dieser Faktoren sind für jedes Antigen unterschiedlich. So konnte für die Influenza A Virus Infektion der Maus anhand der Untersuchung von fünf Antigenen eine Hierarchie der zur Immundominanz beitragenden Faktoren aufgestellt werden (Chen *et al.*, 1999). Auch im Falle des pp65 liegt nahe, dass die Immundominanz des Tegumentproteins durch mehrere Faktoren beeinflusst wird. Aufgrund der hohen Frequenz pp65-spezifischer CTL bei seropositiven Personen kann davon ausgegangen werden, dass bereits bei der Induktion der HCMV-spezifischen Immunantwort bevorzugt T-Lymphozyten gegen dieses Tegumentprotein geprimt und expandiert werden.

Als *Priming* bezeichnet man den ersten Kontakt einer naiven T-Zelle mit Antigen. Voraussetzung für die Aktivierung solcher naiven T-Zellen ist - neben der Wechselwirkung von T-Zell-Rezeptor mit Peptid-beladenem MHC-Molekül - die Interaktion der auf der T-Zell-Oberfläche vorhandenen kostimulatorischen Moleküle mit den entsprechenden Liganden der APZ. In der Regel tragen nur professionelle APZ, wie Makrophagen und Dendritische Zellen, diese Liganden (Whitmire & Ahmed, 2000). Im Fall einer Virusinfektion professioneller APZ können Peptide über den klassischen MHC Klasse I-Präsentationsweg präsentiert werden. Häufig sind jedoch nicht-professionelle APZ Ziel von viralen Infektionen. Virale Antigene, die in solchen Zellen synthetisiert werden, können von professionellen APZ aus dem extrazellulären Fluid aufgenommen werden. Diese Proteine können durch endosomale Proteasen gespalten und anschließend entweder auf endosomale Klasse I-Moleküle geladen oder über das Zytosol in den klassischen Präsentationsweg geleitet werden (Yewdell, 2002; Gromme & Neefjes, 2002).

Bei HCMV führt die Kokultivierung von infizierten Fibroblasten mit Dendritischen Zellen zu Kreuzpräsentation von viralen Antigenen (Tabi *et al.*, 2001; Arrode *et al.*, 2000). Zudem werden von infizierten Zellen lösliche Faktoren ins Medium abgegeben, die die Reifung der Dendritischen Zellen beeinflussen (Arrode *et al.*, 2002). Es ist somit denkbar, dass Kreuzpräsentation beim *Priming* von T-Zellen gegen HCMV-Proteine eine wichtige Rolle spielt. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Erkenntnis, dass Viruspartikel in

professionelle APZ eingebracht werden und auf diese Weise zu einem effektiven *Priming* führen können. So konnte gezeigt werden, dass DB geeignet sind, pp65 in verschiedene Zelltypen einzubringen, auch wenn diese Zellen nicht für eine HCMV-Infektion permissiv sind (Pepperl *et al.*, 2000). In der Konsequenz führte die Immunisierung von Mäusen mit DB zur Induktion einer deutlichen pp65-spezifischen Immunantwort. Daraus wird deutlich, dass der Prozessierung und Präsentation des pp65 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Immundominanz des Proteins zukommt. Es sollten daher verschiedene molekulare Aspekte untersucht werden, die Einfluss auf die Entstehung von MHC Klasse I-präsentierten Peptiden des pp65 nehmen.

## 4.2 Prozessierung und Präsentation von pp65

### 4.2.1 Generierung von pp65-spezifischen stabilen CTLL

Grundlage der Untersuchungen zur Prozessierung und Präsentation des pp65 war die Herstellung stabiler CTLL. Bereits 1997 konnte von Diamond gezeigt werden, dass durch Immunisierung von HLA-A2-transgenen Mäusen mit pp65<sub>495-503</sub> gegen dieses Peptid gerichtete CTL isoliert und in Kultur über längere Zeit hinweg passagiert werden können (Diamond *et al.*, 1997). In Anlehnung an diese Ergebnisse konnte in der vorliegenden Arbeit durch DB-Immunisierung von transgenen  $\alpha 2K^b$ -Mäusen und nachfolgender Restimulation der Milzzellen mit Peptid-beladenen Stimulatorzellen eine pp65<sub>495-503</sub>-spezifische CTLL generiert werden. Diese CTLL war geeignet, sowohl exogen mit Peptid beladene als auch HCMV-infizierte humane Zielzellen zu erkennen und zu lysieren. Allerdings wurden Zellen, welche nach Transfektion pp65 exprimierten, nur schlecht erkannt. Als Ursache wurde das Fehlen einer Wechselwirkung von murinem CD8-Molekül und  $\alpha_3$ -Domäne des humanen HLA-A2 der Zielzellen vermutet. Durch erneute Immunisierung von CD8xHLA-A2 doppeltransgenen Mäusen konnte eine weitere pp65<sub>495-503</sub>-spezifische CTLL generiert werden. Die beiden in der anschließenden Klonierung erhaltenen CTL-Klone waren geeignet, pp65<sub>495-503</sub>-präsentierende Zielzellen, sowohl nach Beladung der Zellen mit synthetischem Peptid als auch nach endogener Prozessierung des pp65, mit hoher Sensitivität zu erkennen. Auch bei der Erkennung von Zielzellen nach transienter Expression von pp65 erwiesen sich diese Klone als außerordentlich sensitiv.

### 4.2.2 Erkennung von infizierten Zellen durch pp65-spezifische CTL

Pp65 ist Hauptbestandteil des Teguments und wird bei Infektion durch die Viruspartikel in signifikanter Menge in die Zelle eingeschleust. Eine Neusynthese des Proteins erfolgt erst in späteren Phasen der Infektion. McLaughlin-Taylor und Kollegen konnten zeigen, dass für die Erkennung infizierter Zellen durch pp65-spezifische CTL keine endogene virale Genexpression notwendig ist (McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994). Somit stellte sich die Frage

nach der Kinetik der Erkennung von infizierten Zellen und der Abhängigkeit dieser Erkennung von der Infektionsdosis.

Die Präsentation von pp65 an Tag 1 und 2 nach Infektion war eindeutig abhängig von der Infektionsdosis, mit der die Zellen infiziert worden waren. So kam es erst bei einer  $moi$  von 10 zu einer deutlich messbaren Erkennung. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das in Viruspartikeln enthaltene pp65 nach Einschleusung in die Zelle Quelle des auf HLA-A2 präsentierten Peptids pp65<sub>495-503</sub> ist. Zudem führte die Beladung von Zielzellen mit DB, die weder DNA noch Kapsid enthalten, zu einer vergleichbaren Erkennung dieser Zielzellen.

Durch Immunfluoreszenzfärbungen von DB-beladenen HFF konnte gezeigt werden, dass das durch Partikel eingebrachte pp65 mehrere Tage in diesen Zellen nachweisbar ist. Dies führte zu der Vermutung, dass pp65 ein überaus stabiles Protein ist, dessen Immundominanz nicht in einer erhöhten metabolischen Umsatzrate begründet ist. Es ist allerdings denkbar, dass diese Stabilität in Verbindung mit einer hohen Abundanz dazu beiträgt, dass pp65 über längeren Zeitraum in infizierten Zellen präsent ist und als Quelle antigener Peptide dient.

Auch 96 Stunden p.i. war pp65 in infizierten Zellen nachweisbar. Als Quelle hierfür kommt sowohl die exogene Einschleusung durch Partikel als auch die Neusynthese des Proteins in Frage. Allerdings war im CFT keine Erkennung infizierter Zellen 96 Stunden p.i. mehr detektierbar. Es ist anzunehmen, dass die fehlende Erkennung auf die starke Reduzierung der MHC Klasse I-Oberflächenexpression durch die Expression der Immunevasionsgene des HCMV zu diesem Zeitpunkt der Infektion zurückzuführen war. Zusammengefasst kann also festgestellt werden, dass Zellen in den frühen Phasen der HCMV-Infektion sehr wohl durch aktivierte pp65-spezifische CTL erkannt und lysiert werden und dass dies durch die exogene Beladung des MHC Klasse I-Weges vermittelt wird. Gleichzeitig unterliegt die pp65-spezifische Erkennung infizierter Zielzellen jedoch in den späteren Infektionsphasen den bekannten, HCMV-induzierten Immunevasionsmechanismen. Die sehr effiziente exogene Beladung des MHC Klasse I-Präsentationsweges durch Viruspartikel und subvirale DB legt die Vermutung nahe, dass auch die für das *Priming* der Immunantwort essentielle Präsentation von HCMV-spezifischen Peptiden durch professionelle APZ über exogene Beladung vermittelt werden kann. Die hier erhaltenen Ergebnisse stellen die Grundlage dar, diese Prozesse nun auch *in vivo* näher zu untersuchen.

Eine Reihe von Untersuchungen zu HCMV wurden unter Einsatz von  $IFN-\gamma$  durchgeführt. Das im Verlauf einer Infektion hauptsächlich von T-Zellen und NK-Zellen produzierte  $IFN-\gamma$  führt zu einer erhöhten Expression von MHC Klasse I und II-Genen und von TAP; es induziert neben LMP 2 und 7 die MECL-Untereinheit des Immunproteasoms. Es konnte gezeigt werden, dass mit  $IFN-\gamma$  vorbehandelte HCMV-infizierte Zellen zu verschiedenen



Zeitpunkten nach Infektion (2-66 Stunden) durch pp65-spezifische CTL lysiert werden (McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994). Da IFN- $\gamma$  aber in multipler Weise auf die Zielzellen einwirkt, ist die Interpretation von derartig erhaltenen Ergebnissen jedoch schwierig. Ein Teil der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde daher ohne den Einsatz von IFN- $\gamma$  durchgeführt. Es zeigte sich, dass HCMV-infizierten Zellen 16 Stunden p.i. durch pp65-spezifische CTL auch ohne Vorbehandlung der Zelle mit IFN- $\gamma$  erkannt werden. Daraus ergibt sich die Erkenntnis, dass die Prozessierung und Präsentation des hier als Modell-Antigen verwendeten Peptids aus pp65 auch unabhängig von der Induktion des Immunproteasoms erfolgt.

#### **4.2.3 Proteasomale Degradation**

Die Degradation von Proteinen, die Voraussetzung für die Präsentation von Peptiden ist, erfolgt hauptsächlich durch das Proteasom (Rock & Goldberg, 1999). Es sind allerdings auch Proteasom-unabhängige Abbauewege bekannt, zu denen unter anderem endolysosomale Proteasen gehören (Del-Val & Lopez, 2002). Wichtig für das Verständnis von Immundominanz ist die Aufklärung der Prozessierungswege von immundominanten Proteinen. Für pp65 sollte daher geklärt werden, ob dessen Degradation durch das Proteasom erfolgt. Da keine humanen Proteasom-defizienten Zellen zur Verfügung standen, mussten Untersuchungen zur proteasomalen Degradation mit Hilfe von Inhibitoren des Proteasoms durchgeführt werden. Die verfügbaren Proteasomen-Inhibitoren sind allerdings in der Regel nur geeignet, eine der drei Proteasomenaktivitäten zu hemmen. Außerdem zeigen viele Proteasomen-Inhibitoren Kreuzreaktivität mit anderen Proteasen (zusammengefasst in Kisselev & Goldberg, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass pp65 nach transienter Expression durch das Proteasom degradiert wird. Durch die Verwendung von drei Proteasomen-Inhibitoren mit unterschiedlichen Wirkmechanismen (MG-132, Lactacystin, Proteasomen-Inhibitor I) konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte auf eine unspezifische Hemmung anderer Proteasen zurückzuführen war. In anderen Arbeiten konnte eine Beeinträchtigung der Degradation nachfolgenden Schritte der MHC Klasse I-Präsentation oder der lytischen Aktivität der CTL ausgeschlossen werden (Rock *et al.*, 1994, Kuckelkorn *et al.*, 2002). Somit konnte durch diese Experimente der Beweis erbracht werden, dass die Prozessierung und nachfolgende Präsentation des pp65 proteasomal erfolgt. Allerdings konnte durch diesen Versuch nicht geklärt werden, ob pp65 durch Proteasomen im Zellkern oder im Zytoplasma degradiert wird, da sich diese Proteasomen weder im Aufbau noch in der Funktion voneinander unterscheiden (Reits *et al.*, 1997).

#### **4.2.4 Rolle der subzellulären Lokalisation des pp65**

Pp65 ist bereits kurze Zeit nach Infektion durch exogene Aufnahme aus Viruspartikeln im

Zellkern nachweisbar. Auch nach endogener Neusynthese ist das Protein nukleär lokalisiert. Für den Transport des pp65 in den Zellkern sind verschiedene nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) identifiziert worden (Schmolke *et al.*, 1995a).

Viele immundominante virale Proteine sind nukleär lokalisiert. Allerdings ist bisher nicht bekannt, wie Peptide aus nukleär lokalisierten Proteinen in den MHC Klasse I-Präsentationsweg eingeschleust werden. Eine mögliche Erklärung bietet die von Yewdell aufgestellte Hypothese, dass defekte ribosomale Produkte (DRiPs) die Hauptquelle von antigenen Peptiden darstellen (Yewdell, 1996). Die Tatsache, dass infizierte Zellen schon kurze Zeit nach Infektion durch CTL erkannt werden können, führte Yewdell zu der Annahme, dass aufgrund von fehlerhaften mRNAs oder falscher Translation viele fehlgefaltete Proteine schon kurz nach Synthese im Zytoplasma degradiert und in den MHC Klasse I-Präsentationsweg eingeschleust werden. Es konnte gezeigt werden, dass zytoplasmatische DRiPs mehr als 30 % der neusynthetisierten Proteinen ausmachen (Schubert *et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage gestellt werden, ob eine Veränderung der subzellulären Verteilung des pp65 einen Einfluss auf die Präsentation von pp65-Peptiden im Kontext von MHC Klasse I hat. Aus Vorarbeiten (Schmolke *et al.*, 1995a) standen die Mutanten pp65d und pp65dTA des pp65 zur Verfügung, die aufgrund der Deletionen verschiedener NLS nach transienter Expression neben nukleärer auch in unterschiedlichem Ausmaß zytoplasmatische Anordnung der trunkierten pp65-Varianten zeigten.

Die transiente Überexpression dieser verschiedenen pp65-Mutanten führte jedoch nicht zur messbaren Verstärkung der Erkennung von transfizierten Zellen durch pp65<sub>495-503</sub>-spezifische CTL. Dies deutet darauf hin, dass zytoplasmatische Retention für die effiziente Präsentation von pp65 nicht essentiell ist. Eingeschränkt wird diese Feststellung aber dadurch, dass die für die Erkennung der Zelle durch pp65<sub>495-503</sub>-spezifische CTL notwendige Anzahl an Peptid-MHC Klasse I-Komplexen ungeklärt ist. Es ist bekannt, dass bei einigen Antigenen schon wenige derartige Komplexe für die Erkennung ausreichen (Sykulev *et al.*, 1996). Es wäre also denkbar, dass aufgrund der starken transienten Expression des pp65 im gewählten Versuchansatz eine geringe Mengen von Protein, welches zytoplasmatisch degradiert wird, ausreicht, um maximale Antigenpräsentation und somit Erkennung durch CTL zu vermitteln. In diesem Falle würde eine Erhöhung des Anteils an zytoplasmatisch lokalisiertem Proteins durch NLS-Deletion ebenfalls keinen messbaren Einfluss auf die Antigenpräsentation ausüben. Zur Klärung der Frage, inwieweit der Anteil an zytoplasmatisch lokalisiertem pp65 für seine Präsentation wichtig ist, wird es notwendig sein, aufbauend auf den Erkenntnissen aus den hier vorgestellten Experimenten, eine quantitative Analyse der Peptidpräsentation nach Expression verschiedener Varianten, beispielsweise mittels HPLC-Analyse durchzuführen.

#### 4.2.5 Rolle des nukleären Exports

Proteasomen sind in der Zelle sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorhanden (Reits *et al.*, 1997). Die Frage, in welchem Kompartiment die Degradation von nukleären Proteinen zu Peptiden erfolgt, die im weiteren Verlauf im Kontext von MHC Klasse I präsentiert werden, ist bisher nicht geklärt. Im Falle des Nukleoproteins des Influenza A Virus gaben Immunfluoreszenzfärbungen den Hinweis auf eine proteasomale Degradation in sog. PML onkogenen Domänen im Zellkern (Anton *et al.*, 1999). Allerdings konnte nicht geklärt werden, ob diese Degradation die Quelle der für die Immunerkennung verantwortlichen Peptide darstellt.

Auch für pp65 konnte die Frage nach dem zellulären Ort der Degradation bisher nicht beantwortet werden. Die Aufklärung des Prozessierungsweges dieses Proteins ist Voraussetzung für das Verständnis seiner Immundominanz. Da pp65 vorwiegend nukleär lokalisiert ist, wäre für die zytoplasmatische Degradation ein Export des Proteins durch den Kernporenkomplex ins Zytoplasma anzunehmen. Dieser nukleäre Export ist nur für kleine Proteine bis zu einer Größe von 60 kDa durch Diffusion möglich; für pp65 müsste daher ein aktiver Transportvorgang angenommen werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Erkennung sowohl pp65-transfizierter als auch HCMV-infizierter Zellen nach Zugabe des CRM1-spezifischen nukleären Export-Hemmstoffes LMB vermindert ist. Da die Erkennung von exogen mit Peptid beladenen Zellen kaum durch LMB reduziert war, kann eine Beeinträchtigung der Funktion der für die Analyse eingesetzten CTL als unwahrscheinlich erachtet werden. Weiterhin ist bekannt, dass LMB sehr spezifisch den nukleären Export hemmt (Fornerod *et al.*, 1997b) und keinen Einfluss auf die proteasomale Degradation hat (Freedman *et al.*, 1998). Somit lässt sich aus den hier erhaltenen Ergebnissen die Hypothese ableiten, dass die Prozessierung und anschließende Präsentation von pp65-Peptiden im Kontext von MHC Klasse I vom aktiven nukleären Export des Proteins über den CRM1-vermittelten Exportweg abhängig ist. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass LMB in unbekannter Weise in den MHC Klasse I-Präsentationsweg eingreift.

Um unspezifische Effekte des LMB auszuschließen, wurde der Einfluss des nukleären Exports auf die Präsentation des pp65 durch Überexpression des HTLV-1 Rex Proteins untersucht. Dieses Protein bindet an CRM1. Überexpression eines in der RNA-Bindedomäne deletierten Rex ist geeignet, durch Konkurrenz den CRM1-vermittelten nukleären Export zu hemmen (Shirangi *et al.*, 2002). Auch in diesem Versuch konnte eine Reduktion der Erkennung pp65-exprimierender Zellen beobachtet werden. In einem dritten Ansatz wurde durch die Überexpression des C-Terminus des Nukleoporins CAN (CANc) der nukleäre Export gehemmt. CAN (auch als NUP214 bezeichnet) dient als Adaptor zwischen CRM1 und dem Kernporenkomplex. Durch die Überexpression des C-Terminus kann CRM1 gebunden,

aber nicht aus dem Zellkern transportiert werden, da die durch den N-Terminus vermittelte Bindung an den Kernporenkomplex fehlt (Rosorius *et al.*, 1999). Auch die Überexpression von CANc führte zu einer verminderten Erkennung pp65-exprimierender Zellen.

Somit konnte durch drei methodisch unterschiedliche Ansätze gezeigt werden, dass die Funktionalität des aktiven nukleären Exportweges für die Präsentation des pp65 im Kontext von MHC Klasse I von entscheidender Bedeutung ist. Eine solche Abhängigkeit der Antigenprozessierung und –präsentation vom nukleären Export eines Proteins ist bislang noch nicht beschrieben worden und stellt ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit dar. Unklar blieb aus diesen Experimenten jedoch, ob dieser Effekt direkt auf die Hemmung des Exports von pp65 zurückzuführen ist oder ob es sich um nicht näher definierte, indirekte Effekte der Transporthemmung auf die Antigenprozessierung und –präsentation handelt. Dies wäre denkbar, da der nukleäre Export einen wichtigen zellulären Transportweg darstellt, über den beispielsweise auch mRNAs in das Zytoplasma gelangen. In Publikationen zu diesem Thema wurden lediglich Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt (Stommel *et al.*, 1999; Shirangi *et al.*, 2002); die Verwendung von Inhibitoren des nukleären Exports in funktionellen Tests zur Antigenpräsentation wie CFT oder ELISpot wurde bisher nicht veröffentlicht.

Eine Möglichkeit, die Rolle des nukleären Exports des pp65 für seine Prozessierung und Präsentation weiter abzuklären ist es, durch Mutagenese des für den nukleären Export verantwortlichen Abschnitts in der Primärstruktur des pp65 den Transport ohne weitere Beeinflussung der zellulären Vorgänge zu hemmen. Obwohl Untersuchungen am nukleären Export bis vor einiger Zeit weniger intensiv verfolgt wurden als die Erforschung des nukleären Imports, konnte doch eine Konsensussequenz nukleärer Exportsequenzen (NES) bestimmt werden (Bogerd *et al.*, 1996, Kim *et al.*, 1996). Diese NES sind Sequenzen mit in der Regel vier Leucinen (in einigen Fällen auch Isoleucin) in konservierten Abständen (Konsensus: LX<sub>(1-3)</sub> LX<sub>(2-3)</sub> LXL, Henderson & Eleftheriou, 2000)

In pp65 konnte eine ähnliche Sequenz zwischen AS 116 und AS 123 (LPLKMLNI) identifiziert werden. Durch Austausch der drei Leucine und des Isoleucins durch Alanin wurde eine pp65-„NES-Mutante“ hergestellt. Die Expression dieser Mutante in Zielzellen führte bei gleicher Expressionsstärke auch zu einer vergleichbaren Erkennung durch pp65 spezifische CTL. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die identifizierte Sequenz nicht als nukleäres Exportsignal fungiert.

Henderson und Eleftheriou konnten anhand eines Modellsystems zeigen, dass sich NES-Sequenzen trotz gleicher oder ähnlicher Konsensussequenz stark in ihrer Aktivität unterscheiden. Zusätzlich konnten auch inaktive NES-ähnliche Sequenzen identifiziert werden (Henderson & Eleftheriou, 2000). In Cyclin B1 und MPF konnten NES gefunden werden, deren Sequenz sich von der Leucin-reichen Konsensussequenz unterschieden;

dennoch konnte für diese Proteine ein nukleozytoplasmatischer Transport beobachtet werden (Hagting *et al.*, 1998; Toyoshima *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurden auch Proteine beschrieben, die selbst keine aktive NES enthalten, aber dennoch aus dem Kern transportiert werden. Dieser Transport wird durch die Bindung eines Adaptorproteins vermittelt, welches mit CRM1 interagieren kann. Im Falle des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p27<sup>Kip1</sup> konnte JAB-1 als Adaptor zwischen p27<sup>Kip1</sup> und CRM1 identifiziert werden (Tomoda *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte in Vorarbeiten mit Hilfe des Hefe-Hybrid Systems eine Interaktion von pp65 mit JAB-1 identifiziert werden. Somit ist denkbar, dass pp65 durch Interaktion mit dem Adaptormolekül JAB-1 aus dem Zellkern exportiert und durch zytoplasmatische Proteasomen prozessiert wird. Ausgehend von den hier erhaltenen Erkenntnissen müssen sich weitere Untersuchungen anschließen, um dies abzuklären.

### 4.3 Untersuchungen zur Interaktion von pp65 und JAB-1

In Vorarbeiten wurde in Hefe-Hybrid Analysen JAB-1 als möglicher Interaktionspartner von pp65 identifiziert (Thirion & Plachter, unveröffentlichte Daten). JAB-1 wurde ursprünglich als Regulator der AP-1 vermittelten Transkription identifiziert (Claret *et al.*, 1996). Es wird auch als CSN 5 Untereinheit des COP9 Signalosoms bezeichnet. Das COP9 Signalosom ist ein Multiprotein-Komplex, dessen Untereinheiten Homologien zu den Untereinheiten des 26S Proteasoms aufweisen. Bei *Arabidopsis* wurde COP9 als Repressor der Licht-induzierten Morphogenese identifiziert (Wie *et al.*, 1994). Neuere Veröffentlichungen bringen allerdings insbesondere JAB-1 mit der Proteindegradation in Verbindung (Schwechheimer & Deng, 2001). So vermittelt JAB-1 den Transport des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p27<sup>Kip1</sup> über den CRM1-Weg aus dem Zellkern ins Zytoplasma, wo p27<sup>Kip1</sup> anschließend degradiert wird (Tomada *et al.*, 2002). Auch für das Tumorsuppressorprotein p53 wurde eine Wechselwirkung mit JAB-1 beschrieben, die die Degradation des p53 zur Folge haben soll (Bech-Otschir *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand von GST-Fällungsexperimenten keine eindeutige Interaktion von JAB-1 und pp65 nachgewiesen werden. Hier muss allerdings berücksichtigt werden, dass die *in vitro* Bedingungen nicht den physiologischen Bedingungen in der Zelle entsprechen. Es ist möglich, dass eine *in vivo* auftretende Interaktion *in vitro* nicht nachweisbar ist, insbesondere wenn es sich um eine schwache oder temporäre Bindung handelt. Es ist weiterhin bekannt, dass es bei GST-Fällungsexperimenten häufig zu unspezifischen Bindungen der untersuchten Proteine an GST oder die Glutathion-Sepharose-Kügelchen kommt, was die Auswertung der Experimente erschwert (Ausubel *et al.*, 1997). In den hier durchgeführten Experimenten wurde ebenfalls eine unspezifische Bindung von JAB-1 an GST oder die Glutathion-Sepharose-Kügelchen beobachtet. Zur weiteren Abklärung einer möglichen Wechselwirkung zwischen JAB-1 und pp65 wurde daher

versucht, die Kolokalisation der Proteine mit Hilfe der Laser Scan Mikroskopie *in vivo* nachzuweisen. Auch diese Analyse führte zu keinem eindeutigen Ergebnis. Zwar konnte in Zellen drei Tage nach Infektion Kolokalisation beider Proteine im Zellkern beobachtet werden; aufgrund der in beiden Fällen beobachteten homogenen Verteilung erlaubt es diese Beobachtung jedoch nicht, eine Aussage darüber zu treffen, ob es sich um eine zufällige Lokalisation dieser Proteine im selben Kompartiment oder um eine tatsächliche Interaktion handelt. Beim Vergleich Ad169-infizierter Zellen mit Zellen, die mit der pp65-Deletionsmutante RVAd65 infiziert worden waren, wurden keine Unterschiede in der Lokalisation von JAB-1 erkennbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass pp65 keinen Einfluss auf die Lokalisation von JAB-1 hat.

Zu einem unerwarteten Ergebnis führte die Analyse der Lokalisation von JAB-1 und pp65 in spät infizierten Zellen. Während pp65 im Zytoplasma nachweisbar war, konnte JAB-1 in den für diese Phase der Infektion typischen nukleären Einschlusskörperchen gefunden werden. Diese Einschlusskörperchen werden in der Literatur als Ort der Viruskapsid-Morphogenese und Zentrum viraler Replikation beschrieben (Penfold & Mocarski, 1997). Eine Färbung mit einem für ein Kapsidprotein spezifischen Antikörper bestätigte die Vermutung, dass JAB-1 am Ort der Kapsidmorphogenese lokalisiert ist. Nach Identifizierung von JAB-1 an Orten der viralen Replikation liegt auch hier die Vermutung nahe, dass JAB-1 auch Einfluss auf die virale Replikation haben könnte. Zur Klärung dieser Frage sind weitere Experimente zur Untersuchung der Kolokalisation und Wechselwirkung von JAB-1 mit Proteinen der viralen Replikationsmaschinerie notwendig.

Der Nachweis der Kolokalisation von JAB-1 mit viralen Kapsidproteinen führte zu der Vermutung, JAB-1 könnte bei der Virusmorphogenese in Partikel verpackt werden. Diese Vermutung konnte allerdings nicht bestätigt werden. Auch eine denkbare Modifikation des JAB-1 durch eine pp65-vermittelte Phosphorylierung konnte nicht beobachtet werden.

In neueren Veröffentlichungen wurde JAB-1 mit der durch Bindung und nukleären Export vermittelten Destabilisierung anderer Proteine in Verbindung gebracht (zusammengefasst in Schwechheimer & Deng, 2001). Nachdem die Ergebnisse dieser Arbeit auf die Notwendigkeit des nukleären Exports für die MHC Klasse I-vermittelte Präsentation von pp65 hindeuten, gleichzeitig aber keine funktionelle NES identifiziert werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass JAB-1 als Adaptor zwischen pp65 und CRM1 fungiert, ähnlich wie es für p27<sup>Kip1</sup> gezeigt werden konnte (Tomoda *et al.*, 2002). Durch Überexpression von JAB-1 in pp65-exprimierenden Zellen sollte der Einfluss von JAB-1 auf die Präsentation von pp65 in einem ELISpot untersucht werden. In diesem Versuch konnte allerdings keine Änderung der Erkennung pp65-exprimierender Zellen durch Überexpression von JAB-1 beobachtet werden.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Interaktion von JAB-1 und pp65 eine solche Wechselwirkung weder bestätigt noch ausgeschlossen werden kann. Weitere Untersuchungen zur Abklärung des Effekts von JAB-1 auf die Prozessierung und Präsentation von pp65 werden sich auf die Hemmung der Expression von JAB-1, beispielsweise mit Hilfe der RNA-Interferenz-Methode zu fokussieren haben (Fire, 1999; Elbashir *et al.*, 2001).

#### **4.4 Identifikation eines HLA-A2-bindenden Epitops aus dem IE1-Protein**

Das *Immediate Early* 1-Protein (IE1) ist das am stärksten exprimierte Protein in der sehr frühen Phase der HCMV-Infektion. Es konnte schon früh als Zielstruktur der MHC Klasse I-restringierten Immunantwort gegen HCMV identifiziert werden (Borysiewicz *et al.*, 1988a; Borysiewicz *et al.*, 1988b). Allerdings rückte die Identifikation von pp65 als immundominantes Protein der CTL-Antwort IE1 als Antigen der MHC Klasse I-restringierten Immunantwort gegen HCMV vorübergehend in den Hintergrund (McLaughlin-Taylor *et al.*; 1994; Wills *et al.*, 1996; Boppana & Britt, 1996). Dies wurde durch die Erkenntnis verstärkt, dass eine mit pp65 assoziierte Kinase die Präsentation von IE1 über den MHC Klasse I-Präsentationsweg selektiv inhibiert (Gilbert *et al.*, 1996). Mittlerweile gibt es aber zunehmend Hinweise darauf, dass IE1-spezifische CTL ebenfalls in hoher Frequenz sowohl bei gesunden Spendern wie auch bei Transplantatempfängern vorhanden sind (Gyulai *et al.*, 2000; Kern *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002). Allerdings ist die Rolle von IE1-spezifischen CTL im Rahmen der HCMV-Infektion weiterhin unklar, da noch kein Beweis für deren Schutzfunktion erbracht wurde. Es ist jedoch denkbar, dass IE1-spezifische CTL Einfluss auf Latenz und Reaktivierung von HCMV haben, da dieses Protein im Gegensatz zu pp65 schon sehr früh stark exprimiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit sollte damit begonnen werden, das Wechselspiel von pp65 und IE1 in Bezug auf die MHC Klasse I-restringierte CTL-Antwort zu untersuchen. Es sollten die Voraussetzungen geschaffen werden, die von Gilbert und Kollegen postulierte pp65-vermittelte Unterdrückung der IE1-Präsentation zu überprüfen. Hierzu sollte in analoger Weise wie für pp65 ein IE1-spezifischer CTL-Klon in HLA-A2-transgenen Mäusen durch Peptidimmunisierung generiert werden. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war kein HLA-A2-präsentiertes Peptid aus einer konservierten Region des IE1 bekannt. Voraussetzung war daher die Identifizierung eines HLA-A2-präsentierten Peptids, welches in verschiedenen HCMV-Stämmen konserviert sein sollte.

Anhand der SYFPEITHI-Datenbank wurden 13 Peptide mit HLA-A2 Bindemotiven ausgewählt. Nach Analyse der HLA-A2-Stabilisierungskapazität dieser Peptide mittels des T2-Stabilisierungstest wurden die drei Peptide ausgesucht, deren Zugabe zu TAP-defizienten T2-Zellen die stärkste Zunahme an MHC Klasse I-Oberflächenexpression zur

Folge hatte. Durch Restimulation von PBMC zweier HLA-A2-homozygoter HCMV-seropositiver Spender mit dem als P6 bezeichneten Peptid (IE1<sub>354-363</sub>) konnten wiederholt CTLL generiert werden. Diese CTLL waren geeignet, sowohl Peptid-beladene als auch HCMV-infizierte Zellen zu lysieren. Zudem konnte in einem ELISpot nach Stimulus durch Peptid-beladene Zellen die Sekretion von IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden. Die Restimulierung von PBMC mit den Peptiden P9 und P10 führte zu keiner oder nur geringer Proliferation. Diese T-Zellen zeigten keine spezifische Lyse von Peptid-beladenen Zellen. Auch führte die Restimulierung von PBMC HLA-A2-positiver HCMV-seronegativer Spender mit P6 nicht zur Proliferation der Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich im Falle der durch P6-Restimulierung generierten CTLL nicht um ein *in vitro-Priming* der T-Zellen handelt.

Obwohl die Generierung von P6-spezifischen CTLL durch Restimulation von PBMC HLA-A2-homozygoter Spender mit P6 mehrfach wiederholt werden konnten, gelang es nicht, CTLL durch Restimulation von PBMC aus heterozygoten Spendern herzustellen. Zudem konnten P6-spezifischen Vorläuferzellen *ex vivo* ohne vorherige Kultivierung mit Peptid im ELISpot nicht nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass P6-spezifische CTL *in vivo* in geringerer Frequenz gebildet werden als solche, die gegen das als Kontrolle gewählte pp65-Peptid gerichtet sind. Der Grund hierfür könnte in der nur moderaten Affinität zu HLA-A2 liegen, die auf die Struktur des P6 zurückzuführen sein könnte. P6 ist ein Dekamer, welches wahrscheinlich über die Ankeraminosäuren Ile<sub>355</sub> und Val<sub>363</sub> an HLA-A2 bindet. Im Falle dieser Bindung entsteht eine interne Schleife von einer Aminosäure, die möglicherweise die Interaktion mit HLA-A2 beeinträchtigt.

Als weitere Erklärung für die subdominante Rolle des P6 in HLA-A2-positiven Spendern wäre auch denkbar, dass es zu einer Interferenz von pp65 und IE1 kommt. Kern und Kollegen fanden durch durchflusszytometrische Messungen der IFN- $\gamma$  Produktion von Peptid-spezifischen CTL eine Dominanz von pp65- oder IE1-spezifischen CTL in einzelnen Spendern, die sie durch eine Verbindung der Präsentation jedes der beiden Peptide mit bestimmten HLA-Molekülen erklärten (Kern *et al.*, 2000). Sollte dies der Fall sein, könnte die Subdominanz des P6 durch das Vorhandensein des immundominanten pp65<sub>495-503</sub> begründet werden. Erst kürzlich konnte ein HLA-A2-präsentiertes Peptid aus IE1 identifiziert werden (IE1<sub>316-324</sub>), gegen das hohe Frequenzen an CD8+-T-Zellen detektiert werden konnten (Khan *et al.*, 2002). Interessanterweise waren bei der Mehrzahl der untersuchten gesunden HLA-A2-positiven, HCMV-seropositiven Spender hohe Frequenzen von entweder IE1<sub>316-324</sub>-spezifischen CTL oder pp65<sub>495-503</sub>-spezifischen CTL messbar. Dieser Befund unterstützt die von Kern aufgestellte Hypothese, dass die Präsentation von pp65 auf bestimmten HLA-Molekülen die des IE1 ausschließt und umgekehrt.

Im Blut von gesunden HCMV-seropositiven Spendern sind gegen IE1<sub>316-324</sub>- und pp65<sub>495-503</sub>-gerichtete CD8+-T-Zellen mit vergleichbaren Frequenzen zu detektieren, die teilweise bis zu



---

einigen Prozent aller CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ausmachen können (Khan *et al.*, 2002). Somit steht neben dem in dieser Arbeit identifizierten Peptids P6 ein weiteres HLA-A2-präsentiertes Peptid aus IE1 zur Verfügung, welches zur Generierung IE1-spezifischer CTL genutzt werden kann. Durch Immunisierung von HLA-A2-transgenen Mäusen mit diesen beiden Peptiden generierte CTLL sollten ein hilfreiches Werkzeug sein, um die Wechselwirkung von IE1 und pp65 in Bezug auf die MHC Klasse I-Präsentation zu untersuchen.

## 5 Literatur

**Ahn JH, Brignole EJ 3rd, Hayward GS.**

Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML.

Mol Cell Biol. 1998 Aug;18(8):4899-913.

**Ahn JH, Hayward GS.**

Disruption of PML-associated nuclear bodies by IE1 correlates with efficient early stages of viral gene expression and DNA replication in human cytomegalovirus infection.

Virology. 2000 Aug 15;274(1):39-55.

**Anton LC, Schubert U, Bacik I, Princiotta MF, Wearsch PA, Gibbs J, Day PM, Realini C, Rechsteiner MC, Bennink JR, Yewdell JW.**

Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen.

J Cell Biol. 1999 Jul 12;146(1):113-24.

**Arrode G, Boccaccio C, Abastado JP, Davrinche C.**

Cross-presentation of human cytomegalovirus pp65 (UL83) to CD8+ T cells is regulated by virus-induced, soluble-mediator-dependent maturation of dendritic cells.

J Virol. 2002 Jan;76(1):142-50.

**Arrode G, Boccaccio C, Lule J, Allart S, Moinard N, Abastado JP, Alam A, Davrinche C.**

Incoming human cytomegalovirus pp65 (UL83) contained in apoptotic infected fibroblasts is cross-presented to CD8(+) T cells by dendritic cells.

J Virol. 2000 Nov;74(21):10018-24.

**Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K.**

Current Protocols in Molecular Biology, Volume 3, 1997, Chapter 20.2

John Wiley & Sons, Inc.

**Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollmann C, Dubiel W.**

COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system.

EMBO J. 2001 Apr 2;20(7):1630-9.

**Benz C, Reusch U, Muranyi W, Brune W, Atalay R, Hengel H.**

Efficient downregulation of major histocompatibility complex class I molecules in human epithelial cells infected with cytomegalovirus.

J Gen Virol. 2001 Sep;82(Pt 9):2061-70.

**Bogerd HP, Fridell RA, Benson RE, Hua J, Cullen BR.**

Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay.

Mol Cell Biol. 1996 Aug;16(8):4207-14.

**Bogyo M, Gaczynska M, Ploegh HL.**

Proteasome inhibitors and antigen presentation.

Biopolymers. 1997;43(4):269-80.

**Boppana SB, Britt WJ.**

Recognition of human cytomegalovirus gene products by HCMV-specific cytotoxic T cells. *Virology*. 1996 Aug 1;222(1):293-6.

**Borysiewicz LK, Graham S, Hickling JK, Mason PD, Sissons JG.**

Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells: their precursor frequency and stage specificity. *Eur J Immunol*. 1988a Feb;18(2):269-75.

**Borysiewicz LK, Hickling JK, Graham S, Sinclair J, Cranage MP, Smith GL, Sissons JG.**

Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells. Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Exp Med*. 1988b Sep 1;168(3):919-31.

**Brehm MA, Pinto AK, Daniels KA, Schneck JP, Welsh RM, Selin LK.**

T cell immunodominance and maintenance of memory regulated by unexpectedly cross-reactive pathogens. *Nat Immunol*. 2002 Jul;3(7):627-34.

**Britt WJ, Auger D.**

Human cytomegalovirus virion-associated protein with kinase activity. *J Virol*. 1986 Jul;59(1):185-8.

**Britten CM, Meyer RG, Kreer T, Drexler I, Wolfel T, Herr W.**

The use of HLA-A\*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays. *J Immunol Methods*. 2002 Jan 1;259(1-2):95-110.

**Busch DH, Pamer EG.**

MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, in vitro proliferation, and diversity of responding CTL. *J Immunol*. 1998 May 1;160(9):4441-8.

**Chamovitz DA, Segal D.**

JAB1/CSN5 and the COP9 signalosome. A complex situation. *EMBO Rep*. 2001 Feb;2(2):96-101.

**Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Horsnell T, Hutchison CA 3rd, Kouzarides T, Martignetti JA, et al.**

Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1990;154:125-69.

**Chen W, Anton LC, Bennink JR, Yewdell JW.**

Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity*. 2000 Jan;12(1):83-93.

**Cherrington JM, Mocarski ES.**

Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element. *J Virol*. 1989 Mar;63(3):1435-40.

**Chou S.**

Effect of interstrain variation on diagnostic DNA amplification of the cytomegalovirus major immediate-early gene region.

J Clin Microbiol. 1992 Sep;30(9):2307-10.

**Claret FX, Hibi M, Dhut S, Toda T, Karin M.**

A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors.

Nature. 1996 Oct 3;383(6599):453-7.

**Compton T, Nepomuceno RR, Nowlin DM.**

Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface.

Virology. 1992 Nov;191(1):387-95.

**Compton T, Nowlin DM, Cooper NR.**

Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate.

Virology. 1993 Apr;193(2):834-41.

**Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, Wagner S, Mahendra P, Apperley J, Goldman J, Craddock C, Moss PA.**

Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation.

Blood. 2001 Mar 1;97(5):1232-40.

**Davis MM, Bjorkman PJ.**

T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.

Nature. 1988 Aug 4;334(6181):395-402.

**de Jong MD, Galasso GJ, Gazzard B, Griffiths PD, Jabs DA, Kern ER, Spector SA.**

Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus.

Antiviral Res. 1998 Oct;39(3):141-62.

**Del-Val M, Lopez D.**

Multiple proteases process viral antigens for presentation by MHC class I molecules to CD8(+) T lymphocytes.

Mol Immunol. 2002 Oct;39(3-4):235.

**Deng Y, Yewdell JW, Eisenlohr LC, Bennink JR.**

MHC affinity, peptide liberation, T cell repertoire, and immunodominance all contribute to the paucity of MHC class I-restricted peptides recognized by antiviral CTL.

J Immunol. 1997 Feb 15;158(4):1507-15.

**Diamond DJ, York J, Sun JY, Wright CL, Forman SJ.**

Development of a candidate HLA A\*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection.

Blood. 1997 Sep 1;90(5):1751-67.

**DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP.**

Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system.

Mol Cell Biol. 1987 Jan;7(1):379-87.

**Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T.**

RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs.  
Genes Dev. 2001 Jan 15;15(2):188-200.

**Eskiw CH, Bazett-Jones DP.**

The promyelocytic leukemia nuclear body: sites of activity?  
Biochem Cell Biol. 2002;80(3):301-10.

**Falk K, Rotzschke O, Deres K, Metzger J, Jung G, Rammensee HG.**

Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast.  
J Exp Med. 1991 Aug 1;174(2):425-34.

**Fire A.**

RNA-triggered gene silencing.  
Trends Genet. 1999 Sep;15(9):358-63.

**Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj JW.**

CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals.  
Cell. 1997b Sep 19;90(6):1051-60.

**Fornerod M, van Deursen J, van Baal S, Reynolds A, Davis D, Murti KG, Fransen J, Grosveld G.**

The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88.  
EMBO J. 1997a Feb 17;16(4):807-16.

**Fowler KB, McCollister FP, Dahle AJ, Boppana S, Britt WJ, Pass RF.**

Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection.  
J Pediatr. 1997 Apr;130(4):624-30.

**Freedman DA, Levine AJ.**

Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6.  
Mol Cell Biol. 1998 Dec;18(12):7288-93.

**Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL.**

Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes.  
Nature. 1993 Sep 16;365(6443):264-7.

**Gallina A, Percivalle E, Simoncini L, Revello MG, Gerna G, Milanesi G.**

Human cytomegalovirus pp65 lower matrix phosphoprotein harbours two transplantable nuclear localization signals.  
J Gen Virol. 1996 Jun;77 ( Pt 6):1151-7.

**Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT.**

Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium.  
Cancer Res., 12: 264-265, 1952.

**Gilbert MJ, Riddell SR, Li CR, Greenberg PD.**

Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major

immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus.  
J Virol. 1993 Jun;67(6):3461-9.

**Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg PD.**

Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product.  
Nature. 1996 Oct 24;383(6602):720-2.

**Gillespie GM, Wills MR, Appay V, O'Callaghan C, Murphy M, Smith N, Sissons P, Rowland-Jones S, Bell JI, Moss PA.**

Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors.  
J Virol. 2000 Sep;74(17):8140-50.

**Gorlich D.**

Transport into and out of the cell nucleus.  
EMBO J. 1998 May 15;17(10):2721-7.

**Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R.**

Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.  
J Gen Virol. 1977 Jul;36(1):59-74.

**Gratama JW, van Esser JW, Lamers CH, Tournay C, Lowenberg B, Bolhuis RL, Cornelissen JJ.**

Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection.  
Blood. 2001 Sep 1;98(5):1358-64.

**Greaves RF, Mocarski ES.**

Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1mutant.  
J Virol. 1998 Jan;72(1):366-79.

**Gromme M, Neefjes J.**

Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways.  
Mol Immunol. 2002 Oct;39(3-4):181.

**Gyulai Z, Endresz V, Burian K, Pincus S, Toldy J, Cox WI, MERIC C, Plotkin S, Gonczol E, Berencsi K.**

Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs.  
J Infect Dis. 2000 May;181(5):1537-46.

**Hagting A, Karlsson C, Clute P, Jackman M, Pines J.**

MPF localization is controlled by nuclear export.  
EMBO J. 1998 Jul 15;17(14):4127-38.

**Henderson BR, Eleftheriou A.**

A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals.

Exp Cell Res. 2000 Apr 10;256(1):213-24.

**Hengel H, Koszinowski UH.**

Interference with antigen processing by viruses.

Curr Opin Immunol. 1997 Aug;9(4):470-6.

**Irmieri A, Gibson W.**

Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus.

Virology. 1983 Oct 15;130(1):118-33.

**Irwin MJ, Heath WR, Sherman LA.**

Species-restricted interactions between CD8 and the alpha 3 domain of class I influence the magnitude of the xenogeneic response.

J Exp Med. 1989 Oct 1;170(4):1091-101.

**Jacobs JP, Jones CM, Baille JP.**

Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5.

Nature. 1970 Jul 11;227(254):168-70.

**Jarvis M, Nelson J.**

Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages.

Curr Opin Microbiol. 2002 Aug;5(4):403.

**Kedl RM, Schaefer BC, Kappler JW, Murrack P.**

T cells down-modulate peptide-MHC complexes on APCs in vivo.

Nat Immunol. 2002 Jan;3(1):27-32.

**Kern F, Faulhaber N, Frommel C, Khatamzas E, Prosch S, Schonemann C, Kretzschmar I, Volkmer-Engert R, Volk HD, Reinke P.**

Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides.

Eur J Immunol. 2000 Jun;30(6):1676-82.

**Kern F, Surel IP, Faulhaber N, Frommel C, Schneider-Mergener J, Schonemann C, Reinke P, Volk HD.**

Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited.

J Virol. 1999 Oct;73(10):8179-84.

**Khan N, Cobbold M, Keenan R, Moss PA.**

Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype.

J Infect Dis. 2002 Apr 15;185(8):1025-34.

**Kim FJ, Beeche AA, Hunter JJ, Chin DJ, Hope TJ.**

Characterization of the nuclear export signal of human T-cell lymphotropic virus type 1 Rex reveals that nuclear export is mediated by position-variable hydrophobic interactions.

Mol Cell Biol. 1996 Sep;16(9):5147-55.

**Kisselev AF, Goldberg AL.**

Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates.  
Chem Biol. 2001 Aug;8(8):739-58.

**Kloetzel PM.**

Antigen processing by the proteasome.  
Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Mar;2(3):179-87.

**Korioth F, Maul GG, Plachter B, Stamminger T, Frey J.**

The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1.  
Exp Cell Res. 1996 Nov 25;229(1):155-8.

**Kuckelkorn U, Ferreira EA, Drung I, Liewer U, Kloetzel PM, Theobald M.**

The effect of the interferon-gamma-inducible processing machinery on the generation of a naturally tumor-associated human cytotoxic T lymphocyte epitope within a wild-type and mutant p53 sequence context.  
Eur J Immunol. 2002 May;32(5):1368-75.

**Kwok SF, Staub JM, Deng XW.**

Characterization of two subunits of Arabidopsis 19S proteasome regulatory complex and its possible interaction with the COP9 complex.  
J Mol Biol. 1999 Jan 8;285(1):85-95.

**Laemmli UK.**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature. 1970 Aug 15;227(259):680-5.

**Lafemina RL, Pizzorno MC, Mosca JD, Hayward GS.**

Expression of the acidic nuclear immediate-early protein (IE1) of human cytomegalovirus in stable cell lines and its preferential association with metaphase chromosomes.  
Virology. 1989 Oct;172(2):584-600.

**Lang KS, Moris A, Gouttefangeas C, Walter S, Teichgraber V, Miller M, Wernet D, Hamprecht K, Rammensee HG, Stevanovic S.**

High frequency of human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD8+ T cells detected in a healthy CMV-seropositive donor.  
Cell Mol Life Sci. 2002 Jun;59(6):1076-80.

**Lanzavecchia A.**

Lack of fair play in the T cell response.  
Nat Immunol. 2002 Jan;3(1):9-10.

**Levitskaya J, Coram M, Levitsky V, Imreh S, Steigerwald-Mullen PM, Klein G, Kurilla MG, Masucci MG.**

Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1.  
Nature. 1995 Jun 22;375(6533):685-8.

**Levitskaya J, Sharipo A, Leonchiks A, Ciechanover A, Masucci MG.**

Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1.



Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Nov 11;94(23):12616-21.

**Lozzio CB, Lozzio BB.**

Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.  
Blood. 1975 Mar;45(3):321-34.

**McLaughlin-Taylor E, Pande H, Forman SJ, Tanamachi B, Li CR, Zaia JA, Greenberg PD, Riddell SR.**

Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes.  
J Med Virol. 1994 May;43(1):103-10.

**McVoy MA, Adler SP.**

Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer.  
J Virol. 1994 Feb;68(2):1040-51.

**Miyahira Y, Murata K, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Rodrigues MM, Zavala F.**

Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay.  
J Immunol Methods. 1995 Apr 12;181(1):45-54.

**Mocarski ES, Courcelle CT**

Cytomegaloviruses and their Replication  
in Fields Virology 4<sup>th</sup> Edition 2001; Vol 2 2629-2673.

**Monaco JJ.**

A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing.  
Immunol Today. 1992 May;13(5):173-9.

**Moore MW, Carbone FR, Bevan MJ.**

Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation.  
Cell. 1988 Sep 9;54(6):777-85.

**Nigg EA.**

Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation.  
Nature. 1997 Apr 24;386(6627):779-87.

**Ohno M, Fornerod M, Mattaj IW.**

Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers.  
Cell. 1998 Feb 6;92(3):327-36.

**Pass RF**

Cytomegalovirus  
in Fields Virology 4<sup>th</sup> Edition 2001, Vol 2 2675-2705.

**Penfold ME, Mocarski ES.**

Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis.  
Virology. 1997 Dec 8;239(1):46-61.

**Pepperl S, Munster J, Mach M, Harris JR, Plachter B.**

Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression.

J Virol. 2000 Jul;74(13):6132-46.

**Rammensee H, Bachmann J, Stefanovic S.**

MHC Ligands and Peptide Motifs

Springer Verlag, 1998

**Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S.**

SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs.

Immunogenetics. 1999 Nov;50(3-4):213-9.

**Reddehase MJ.**

The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses

Curr Opin Immunol. 2000 Dec;12(6):738.

**Reimann J, Schirmbeck R.**

Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation.

Immunol Rev. 1999 Dec;172:131-52.

**Reinke P, Prosch S, Kern F, Volk HD.**

Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients.

Transpl Infect Dis. 1999 Sep;1(3):157-164.

**Reits EA, Benham AM, Plougastel B, Neefjes J, Trowsdale J.**

Dynamics of proteasome distribution in living cells.

EMBO J. 1997 Oct 15;16(20):6087-94.

**Reits EA, Vos JC, Gromme M, Neefjes J.**

The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins.

Nature. 2000 Apr 13;404(6779):774-8.

**Retiere C, Imbert BM, David G, Courcoux P, Hallet MM.**

A polymorphism in the major immediate-early gene delineates groups among cytomegalovirus clinical isolates.

Virus Res. 1998 Sep;57(1):43-51.

**Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD.**

Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease.

Blood. 1991 Sep 1;78(5):1373-80.

**Riddell SR, Rabin M, Geballe AP, Britt WJ, Greenberg PD.**

Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression.

J Immunol. 1991a Apr 15;146(8):2795-804.

**Riddell SR, Reusser P, Greenberg PD.**

Cytotoxic T cells specific for cytomegalovirus: a potential therapy for immunocompromised patients.  
Rev Infect Dis. 1991b Nov-Dec;13 Suppl 11:S966-73.

**Rock KL, Goldberg AL.**

Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides.  
Annu Rev Immunol. 1999;17:739-79.

**Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL.**

Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules.  
Cell. 1994 Sep 9;78(5):761-71.

**Roizman B, Pellett EP**

The Family Herpesviridae: A Brief Introduction  
in Fields Virology 4<sup>th</sup> Edition 2001, Vol 2 2381-2397.

**Rosorius O, Reichart B, Kratzer F, Heger P, Dabauvalle MC, Hauber J.**

Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1.  
J Cell Sci. 1999 Jul;112 ( Pt 14):2369-80.

**Rowe WP, Hartley JW, Waterman S, Turner HC, Huebner RJ**

Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids.  
Proc Soc Exp Biol Med. 1956; 92:418-24.

**Ruppert J, Sidney J, Celis E, Kubo RT, Grey HM, Sette A.**

Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules.  
Cell. 1993 Sep 10;74(5):929-37.

**Salmon-Ceron D.**

Cytomegalovirus infection: the point in 2001.  
HIV Med. 2001 Oct;2(4):255-9.

**Salter RD, Howell DN, Cresswell P.**

Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids.  
Immunogenetics. 1985;21(3):235-46.

**Sambrook J, Russell DW**

Molecular cloning-a laboratory manual, 3<sup>rd</sup> Edition 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA

**Schipper RF, D'Amato J, Bakker JT, Bakker J, van Rood JJ, Oudshoorn M.**

HLA gene haplotype frequencies in bone marrow donors worldwide registries.  
Hum Immunol. 1997 Jan;52(1):54-71.

**Schmolke S, Drescher P, Jahn G, Plachter B.**

Nuclear targeting of the tegument protein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus: an unusual bipartite nuclear localization signal functions with other portions of the protein to mediate its efficient nuclear transport.

J Virol. 1995a Feb;69(2):1071-8.

**Schmolke S, Kern HF, Drescher P, Jahn G, Plachter B.**

The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture.

J Virol. 1995b Oct;69(10):5959-68.

**Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G.**

Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.

Int J Cancer. 1977 May 15;19(5):621-6.

**Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR.**

Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes.

Nature. 2000 Apr 13;404(6779):770-4.

**Schwechheimer C, Deng XW.**

COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation.

Trends Cell Biol. 2001 Oct;11(10):420-6.

**Sherman LA, Hesse SV, Irwin MJ, La Face D, Peterson P.**

Selecting T cell receptors with high affinity for self-MHC by decreasing the contribution of CD8.

Science. 1992 Oct 30;258(5083):815-8.

**Shirangi TR, Zaika A, Moll UM.**

Nuclear degradation of p53 occurs during down-regulation of the p53 response after DNA damage.

FASEB J. 2002 Mar;16(3):420-2.

**Sijts AJ, Ruppert T, Rehmann B, Schmidt M, Koszinowski U, Kloetzel PM.**

Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes.

J Exp Med. 2000 Feb 7;191(3):503-14.

**Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G.**

Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues.

J Gen Virol. 1995 Apr;76 ( Pt 4):741-50.

**Somogyi T, Michelson S, Masse MJ.**

Genomic location of a human cytomegalovirus protein with protein kinase activity (PK68).

Virology. 1990 Jan;174(1):276-85.

**Steffens HP, Kurz S, Holtappels R, Reddehase MJ.**

Preemptive CD8 T-cell immunotherapy of acute cytomegalovirus infection prevents lethal disease, limits the burden of latent viral genomes, and reduces the risk of virus recurrence.

J Virol. 1998 Mar;72(3):1797-804.

**Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ, Wahl GM.**

A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking.

EMBO J. 1999 Mar 15;18(6):1660-72.

**Sykulev Y, Joo M, Vturina I, Tsomides TJ, Eisen HN.**

Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity*. 1996 Jun;4(6):565-71.

**Tabi Z, Moutaftsi M, Borysiewicz LK.**

Human cytomegalovirus pp65- and immediate early 1 antigen-specific HLA class I-restricted cytotoxic T cell responses induced by cross-presentation of viral antigens. *J Immunol*. 2001 May 1;166(9):5695-703.

**Taguchi T, McGhee JR, Coffman RL, Beagley KW, Eldridge JH, Takatsu K, Kiyono H.**

Detection of individual mouse splenic T cells producing IFN-gamma and IL-5 using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. *J Immunol Methods*. 1990 Mar 27;128(1):65-73.

**Talbot P, Almeida JD.**

Human cytomegalovirus: purification of enveloped virions and dense bodies. *J Gen Virol*. 1977 Aug;36(2):345-9.

**Theobald M, Biggs J, Dittmer D, Levine AJ, Sherman LA.**

Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 19;92(26):11993-7.

**Tomazin R, Boname J, Hegde NR, Lewinsohn DM, Altschuler Y, Jones TR, Cresswell P, Nelson JA, Riddell SR, Johnson DC.**

Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat Med*. 1999 Sep;5(9):1039-43.

**Tomoda K, Kubota Y, Arata Y, Mori S, Maeda M, Tanaka T, Yoshida M, Yoneda-Kato N, Kato JY.**

The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/Csn5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem*. 2002 Jan 18;277(3):2302-10.

**Tomoda K, Kubota Y, Kato J.**

Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*. 1999 Mar 11;398(6723):160-5.

**Topilko A, Michelson S.**

Morphological and cytochemical analysis of human cytomegalovirus inoculum: correlation of free particles in inoculum with counterparts in infected cells. *Res Virol*. 1994 Mar-Apr;145(2):65-73.

**Toyoshima F, Moriguchi T, Wada A, Fukuda M, Nishida E.**

Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *EMBO J*. 1998 May 15;17(10):2728-35.

**Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB**

Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses 2000; Academic Press

**Varshavsky A.**

The N-end rule: functions, mysteries, uses.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 29;93(22):12142-9.

**Vitiello A, Marchesini D, Furze J, Sherman LA, Chesnut RW.**

Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex.

J Exp Med. 1991 Apr 1;173(4):1007-15.

**Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddell SR.**

Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor.

N Engl J Med. 1995 Oct 19;333(16):1038-44.

**Wang EC, McSharry B, Retiere C, Tomasec P, Williams S, Borysiewicz LK, Braud VM, Wilkinson GW.**

UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 May 28;99(11):7570-5.

**Wei N, Chamovitz DA, Deng XW.**

Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development.

Cell. 1994 Jul 15;78(1):117-24.

**Weidt G, Utermohlen O, Heukeshoven J, Lehmann-Grube F, Deppert W.**

Relationship among immunodominance of single CD8+ T cell epitopes, virus load, and kinetics of primary antiviral CTL response.

J Immunol. 1998 Mar 15;160(6):2923-31.

**Whitmire, JK, Ahmed R.**

Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses.

Curr Opin Immunol. 2000 Aug;12(4):448-55.

**Wiertz E, Hill A, Tortorella D, Ploegh H.**

Cytomegaloviruses use multiple mechanisms to elude the host immune response.

Immunol Lett. 1997 Jun 1;57(1-3):213-6.

**Wilkinson GW, Kelly C, Sinclair JH, Rickards C.**

Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product.

J Gen Virol. 1998 May;79 ( Pt 5):1233-45.

**Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, Sissons JG.**

The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL.

J Virol. 1996 Nov;70(11):7569-79.

**Xu Y, Ahn JH, Cheng M, apRhys CM, Chiou CJ, Zong J, Matunis MJ, Hayward GS.**

Proteasome-independent disruption of pml oncogenic domains (pods), but not covalent modification by sumo-1, is required for human cytomegalovirus immediate-early protein ie1 to inhibit pml-mediated transcriptional repression.

J Virol. 2001 Nov;75(22):10683-95.

**Yamashita Y, Shimokata K, Mizuno S, Yamaguchi H, Nishiyama Y.**

Down-regulation of the surface expression of class I MHC antigens by human cytomegalovirus.

Virology. 1993 Apr;193(2):727-36.

**Yao ZQ, Gallez-Hawkins G, Lomeli NA, Li X, Molinder KM, Diamond DJ, Zaia JA.**

Site-directed mutation in a conserved kinase domain of human cytomegalovirus-pp65 with preservation of cytotoxic T lymphocyte targeting.

Vaccine. 2001 Feb 8;19(13-14):1628-35.

**Yewdell JW, Anton LC, Bennink JR.**

Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules?

J Immunol. 1996 Sep 1;157(5):1823-6.

**Yewdell JW, Bennink JR, Hosaka Y.**

Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes.

Science. 1988 Feb 5;239(4840):637-40.

**Yewdell JW, Bennink JR.**

Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses.

Annu Rev Immunol. 1999;17:51-88.

**Yewdell JW, Schubert U, Bennink JR.**

At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules.

J Cell Sci. 2001 Mar;114(Pt 5):845-51.

**Yewdell JW.**

To DRiP or not to DRiP: generating peptide ligands for MHC class I molecules from biosynthesized proteins.

Mol Immunol. 2002 Oct;39(3-4):139.

**Zhu H, Shen Y, Shenk T.**

Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis.

J Virol. 1995 Dec;69(12):7960-70.

**Zweyberg Wirgart B, Brytting M, Linde A, Wahren B, Grillner L.**

Sequence variation within three important cytomegalovirus gene regions in isolates from four different patient populations.

J Clin Microbiol. 1998 Dec;36(12):3662-9.

## 6 Veröffentlichungen

**Frankenberg N, Welker C, Jaenicke R.**

Does the elimination of ion pairs affect the thermal stability of cold shock protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*?

FEBS Lett. 1999 Jul 9;454(3):299-302.

**Frankenberg N, Pepperl-Klindworth S, Meyer RG, Plachter B.**

Identification of a conserved HLA-A2-restricted decapeptide from the IE1 protein (pUL123) of human cytomegalovirus.

Virology. 2002 Apr 10;295(2):208-16.

**Pepperl-Klindworth S, Frankenberg N, Plachter B.**

Development of novel vaccine strategies against human cytomegalovirus infection based on subviral particles.

J Clin Virol. 2002 Aug;25 Suppl 2:75.

**Pepperl-Klindworth S, Frankenberg N, Riegler S, Plachter B.**

Protein delivery by subviral particles of human cytomegalovirus

Gene Therapy; im Druck



## 7 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	erworbenes Immundefizienzsyndrom ( <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> )
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BSA	bovines Serumalbumin
CFT	Chromfreisetzungstest
CPE	zytopathischer Effekt
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten ( <i>cytotoxic T-lymphocyte</i> )
CTLL	zytotoxische T-Lymphozyten-Linie
DB	<i>Dense Bodies</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E/Z	Effektor-/Zielzellverhältnis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELISpot	<i>Enzyme linked immuno spot assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GFP	grün-fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GST	Glutathion-S-Transferase
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HFF	humane Vorhautfibroblasten ( <i>human foreskin fibroblasts</i> )
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HLA	humanes Leukozyten Antigen ( <i>human leucocyte antigen</i> )
HSV-1	Herpes Simplex Virus-1
HTLV-1	humanes T-Zell-Leukämie Virus-1
IE	<i>immediate early</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
JAB-1	<i>Jun activation domain binding protein-1</i>
KMT	Knochenmarktransplantation
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
LMB	Leptomycin B
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Laser Scan Mikroskop
mCMV	murines Cytomegalovirus
MHC	Major Histocompatibility Complex

---

NES	nukleäre Export Sequenz
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
NIEPs	nicht-infektiöse HCMV-Partikel ( <i>non infectious enveloped particles</i> )
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	mononukleäre Zellen aus peripherem Blut ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PHA	Phytohämagglutinin
PML	promyeloischen Leukämie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	PML onkogene Domänen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFP	rot-fluoreszierendes Protein ( <i>red fluorescent protein</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	<i>Rous Sarcoma Virus</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
TAP	<i>Transporter associated with antigen presentation</i>
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen ( <i>volume/volume</i> )
w/v	Gewicht/Volumen ( <i>weight/volume</i> )

International übliche Terminologie auf Englisch wurde beibehalten und zur Kennzeichnung *kursiv* gesetzt.

## Danksagung

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experimente wurden in der Zeit von Juni 1999 bis Juli 2002 am Institut für Virologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz - Institutsleiter Prof. Dr. X - unter der Betreuung von Prof. Dr. X durchgeführt.

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. X für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten und in diesem überaus interessanten Themengebiet zu promovieren. Er hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und hat meine Arbeit durch die Möglichkeit, an nationalen und internationalen Kongressen teilzunehmen, unterstützt.

Frau Dr. X danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und die Vertretung vor dem Fachbereich Biologie (FB 21).

Frau Dr. X danke ich für die gute Zusammenarbeit, ihre stete Diskussionsbereitschaft und viele wertvolle Anregungen.

Bei Frau X und Frau X möchte ich mich herzlich für die technische Unterstützung bedanken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe X danke ich für die freundliche Aufnahme, die gute Einarbeitung und viele hilfreiche Tipps. Besonderer Dank gilt hier Herrn Dr. X und Herrn Dr. X für zahlreiche Diskussionen und hilfreiche Ratschläge. Auch die Bereitstellung von Zellen, Versuchstieren und Materialien sei dankend erwähnt.

Den Mitarbeitern des Tumorstudienzentrums danke ich für die freundliche Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Hier möchte ich besonders Herrn Dr. X und Herrn X für die Bereitstellung von Materialien und Zellen und die Einarbeitung in verschiedene Methoden danken. Auch ihre stete Diskussionsbereitschaft sei dankend erwähnt.

Herrn Dr. X danke ich herzlich für die unzähligen Bilder am LSM.

Ich danke X für das kritische Durchlesen der Arbeit und viele nette Gespräche.

Bei allen Mitgliedern des Instituts für Virologie bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft. Hier sei besonders dem Leiter des Instituts – Prof. Dr. X – für wissenschaftliche Anregungen gedankt. Frau X und Frau X danke ich für die Unterstützung in Verwaltungsfragen und Beschaffung diverser Büromaterialien.

Einen weiteren Dank möchte ich an die Blutbank Mainz, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. X, für die Bereitstellung von *Buffy coats* und die Durchführung von HLA-Typisierungen richten.