

**Mechanismus der ER-assoziierten Degradation des Glykoproteins gp48 des
murinen Cytomegalievirus**

D i s s e r t a t i o n

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Anja Bubeck
aus Heilbronn/Neckar

2002

Tag der mündlichen Prüfung:	06.03.2002
Dekan:	Herr Prof. Dr. H.-U. Schnitzler
1.Berichterstatter:	Herr Prof. Dr. U. H. Koszinowski
2.Berichterstatter:	Frau Prof. Dr. V. Hemleben

1	Einleitung.....	1
1.1	Cytomegalieviren in der Familie der Herpesviren.....	1
1.1.1	Struktur der Cytomegalieviren.....	1
1.1.2	Replikation der Cytomegalieviren.....	2
1.1.3	Übertragung und klinische Bedeutung des humanen Cytomegalievirus (HCMV).....	4
1.1.4	Murines Cytomegalievirus als Modellsystem.....	5
1.2	Die offenen Leserahmen bei MCMV und HCMV.....	6
1.2.1	Immunantwort gegen virale Erreger und insbesondere MCMV.....	7
1.2.2	MHC Klasse I-vermittelte Antigenpräsentation.....	8
1.2.3	Inhibition der MHC Klasse I-Antigenpräsentation durch HCMV und MCMV.....	8
1.2.4	MCMV <i>m06/gp48</i>	11
1.3	ER-assoziierte Degradation (ERAD).....	11
1.3.1	Virale Interaktion mit dem Proteasom.....	15
1.4	Ziel der Arbeit.....	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Chemikalien.....	17
2.2	Antikörper.....	19
2.2.1	Sekundärantikörper.....	20
2.3	Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren.....	20
2.3.1	Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien im analytischen Maßstab (Minipräparation).....	21
2.3.2	Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien im quantitativen Maßstab (Maxipräparation)....	22
2.3.3	BAC-DNA Isolierung aus Bakterien im analytischen Maßstab (BAC-Minipräparation). 23	
2.3.4	BAC-DNA-Isolierung aus Bakterien im quantitativen Maßstab (BAC-Maxipräparation)24	
2.3.5	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	24
2.4	Klonierung von DNA.....	24
2.4.1	Restriktionsverdau von DNA.....	24
2.4.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	25
2.4.3	Behandlung mit Klenow-Polymerase.....	25
2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	25
2.4.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	26
2.4.6	Ligation.....	26
2.4.7	Herstellung elektrokompetenter Bakterien.....	27
2.4.8	Elektroporation von Bakterien.....	27
2.5	Analyse von DNA.....	28
2.5.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	28

2.6	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	29
2.6.1	Zellen und Zellkultur	29
2.6.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	30
2.6.3	Herstellung eines MCMV-Virusstocks.....	30
2.6.4	Bestimmung des MCMV-Titers durch Endpunkttitration.....	31
2.6.5	Experimentelle Infektion mit MCMV.....	31
2.7	Radio-Immunpräzipitation.....	31
2.7.1	Endo H-Verdau	33
2.7.2	Behandlung mit Proteinase K (Prot K).....	33
2.7.3	SDS-PAGE	34
2.8	Western Blot	35
2.9	Konfokale Laserscanmikroskopie.....	36
2.10	Herstellung von Mikrosomen.....	37
2.10.1	<i>In vitro</i> Versuche mit ATP bzw. ATP-regenerierendem System.....	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Das Schicksal von gp48 in stabil transfizierten Zelllinien	39
3.2	Vergleich des polyklonalen Kaninchen-Antiserums m06-2 und des monoklonalen Mausantikörpers CROMA229	40
3.3	Untersuchung der Abbaukinetik von gp48 unter Einfluss des spezifischen proteasomalen Inhibitors Lactacystin	42
3.4	Wirkung verschiedener proteasomaler Inhibitoren auf gp48	44
3.5	Stabilisation von freiem gp48 in einem Prä-Golgi-Kompartiment in einer membranassoziierten Form.....	45
3.6	Abbaukinetik und Membranassoziation der Mutante gp48 Δ CT.....	47
3.7	Die Rolle der Ubiquitinierung bei der proteasomalen Degradation von gp48	50
3.8	Die Rolle der Glykosylierung von gp48 bei der proteasomalen Degradation.....	52
3.9	Lokalisation der proteasomalen Degradation von gp48.....	54
3.10	Entwicklung eines <i>in vitro</i> Systems zur proteasomalen Degradation von gp48.....	56
3.10.1	Isolation der Mikrosomen aus NIH 3T3-Zellen	56
3.10.2	Degradation von m06/gp48 und m06/gp48 Δ CT <i>in vitro</i>	57
3.10.3	Transport von m06/gp48 aus den Mikrosomen.....	58
3.11	Das Schicksal von gp48 während der Virusinfektion	59
4	Diskussion	62
4.1	Das Glykoprotein gp48 von MCMV kann zwei verschiedene Abbauwege durchlaufen	62

4.2	Gp48 akkumuliert bei der Inhibition des Proteasoms in einer membranassoziierten und Endo H-sensitiven Form	63
4.3	ERAD von gp48 erfolgt im ER/ERGIC Kompartiment der Zelle.....	64
4.4	Die Rolle des cytoplasmatischen Anteils von gp48 als Angriffspunkt für das Proteasom und die Ubiquitinierung	66
4.5	Die Rolle der Oligosaccharidseitenketten des Glykoproteins gp48 bei der proteasomalen Degradation.	67
4.6	<i>In vitro</i> System zur proteasomalen Degradation von gp48	68
4.7	Die proteasomale Degradation von gp48 während der Infektion	70
5	Zusammenfassung.....	72
6	Literatur.....	74
7	Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen.....	88
8	Publikationen	91
9	Danksagung.....	92
10	Lebenslauf.....	93

1 Einleitung

1.1 Cytomegalieviren in der Familie der Herpesviren

Die Cytomegalieviren (CMV) gehören zur Familie der Herpesviridae. Bis heute konnten bei verschiedenen Wirbeltierarten fast 100 unterschiedliche Herpesviren identifiziert werden. Herpesviren besitzen ein doppelsträngiges DNA-Genom mit hoher Kodierungskapazität und sind von einem Capsid und einer Hülle umgeben.

Charakteristisch für Herpesviren ist die Fähigkeit, lebenslang im Wirtsorganismus zu verbleiben ohne chronische Krankheitsbilder auszulösen. In diesem als Latenz bezeichneten Zustand ist die virale Genexpression fast vollständig eingestellt und im Wirt sind keine Viruspartikel nachweisbar. Das Virus ist für das Immunsystem des Wirtes nicht erkennbar bis eine Reaktivierung stattfindet.

Die Herpesviren können in drei Unterfamilien, α -, β - und γ -Herpesviren, eingeteilt werden. Für diese Einteilung legt man das Wirtsspektrum, die Replikationsgeschwindigkeit und den Zelltropismus zu Grunde. Die α -Herpesviren haben ein breites Wirtsspektrum und kurze Replikationszeiten. Wichtige Vertreter der α -Herpesviren sind z.B. Herpes Simplex-Virus Typ 1 und 2 (HSV-1; HSV-2) sowie das Varicella-Zoster-Virus (VZV). Von der kriechenden Ausbreitung des Hautausschlags bei Herpes simplex-Infektionen leitet sich der Name der gesamten Virusfamilie ab (griechisch herpein: kriechen). Die β -Herpesviren unterscheiden sich von den α -Herpesviren durch ihr enges Wirtsspektrum (Speziesspezifität) und ihre langen Replikationszyklen. Häufig sind infizierte Zellen vergrößert und weisen cytoplasmatische und nukleäre Einschlüsse (Eulenaugen) auf. Der Name „Cytomegalie“ bezieht sich auf die Größenzunahme infizierter Zellen. Neben dem murinen Cytomegalievirus (MCMV) und humanen Cytomegalievirus (HCMV) gehören die humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV-6, HHV-7) zu dieser Unterfamilie. Die γ -Herpesviren schließlich zeigen ebenfalls ein enges Wirtsspektrum, das normalerweise auf die Familie oder Ordnung des natürlichen Wirtes beschränkt ist. Die Viren dieser Gruppe infizieren bevorzugt B- und T-Lymphozyten, wo sie als latentes Virus nachgewiesen werden können. Zu ihren bekanntesten Vertretern gehören das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das humane Herpesvirus 8 (HHV-8) (Mocarski, 1996; Roizman, 1996).

1.1.1 Struktur der Cytomegalieviren

In ihrer Morphologie sind die Cytomegalieviren den anderen Mitgliedern der Herpesvirusfamilie sehr ähnlich. Die Virionen haben einen Durchmesser von 150 bis 200 nm. Im Kern ("core") des Viruspartikels befindet sich die lineare, doppelsträngige DNA assoziiert mit einer fibrillären Proteinmatrix. Umgeben wird der Kern von einem ikosaedrischen Capsid, das sich aus 162 Capsomeren

zusammensetzt. Das Capsid wiederum wird von einer relativ unstrukturierten Proteinmatrix aus ca. 20 viralen Proteinen umgeben, die man als Tegument bezeichnet. Die Hülle („envelope“) schließlich leitet sich von Membranen der infizierten Zelle ab. In diese Hülle sind „spike“-ähnlich virale Glykoproteine eingelagert (Roizman, 1996) (Abb.1).

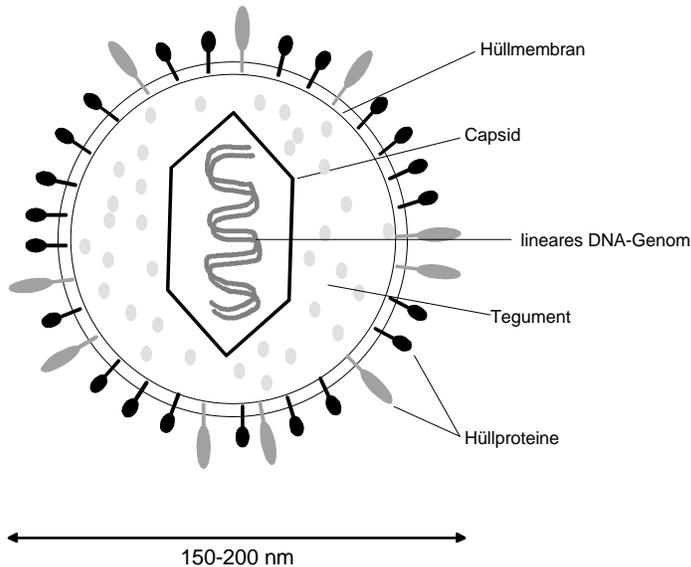


Abb.1 Schematische Darstellung eines Herpesvirions

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

Bei der humanen CMV-Infektion entstehen neben den intakten Virionen auch nicht-infektiöse Viruspartikel. Diese als „dense bodies“ bezeichneten, im Cytoplasma der infizierten Zelle vorkommenden Strukturen besitzen keine virale DNA und kein Capsid und bestehen hauptsächlich aus dem viralen Tegument-Protein pp65 (Irmieri and Gibson, 1983). Das murine Cytomegalievirus zeigt im Gegensatz zu HCMV keine Bildung von „dense bodies“, allerdings wird die Bildung von Virionen mit mehreren Capsiden (Multi-Capsid-Virionen) beobachtet (Chong and Mims, 1981).

1.1.2 Replikation der Cytomegalieviren

HCMV und MCMV besitzen die größten Genome der Säugetier-infizierenden Viren. Wie bei allen Herpesviren ist ihr Replikationszyklus streng reguliert und kaskadenartig organisiert. Während der produktiven Infektion (lytischer Infektionszyklus) dringen die Virionen in die Zelle ein, es kommt zur Vermehrung der viralen DNA und zur Morphogenese im Zellkern, schließlich stirbt die infizierte Zelle ab.

Die Adsorption des Virions beginnt mit der spezifischen Bindung von Virushüllproteinen an Rezeptormolekülen der Zelloberfläche und führt zur Verschmelzung der Virus- und Wirtszellmembran (Abb. 2). Im Fall der Cytomegalieviren ist dabei bis heute nur der unspezifische Rezeptor Heparin-Sulfat-Proteoglykan bekannt, wobei ein zweiter Rezeptor vermutet wird (Albrecht et al., 1976; LaFemina

and Hayward, 1986; LaFemina and Hayward, 1983). Capsid und Tegument gelangen ins Cytoplasma und das Capsid wird entlang der Mikrotubuli zum Kern transportiert. Hier gelangt das Virus-Genom durch Kernporen ins Nukleoplasma, wo es sich zum Episom zirkularisiert und die kaskadenartig regulierte Replikation des viralen Genoms beginnt. Zeitlich kann die Replikation der Cytomegalieviren, wie bei allen Herpesviren, in drei Phasen eingeteilt werden. In der „immediate early“ Phase (IE) werden regulatorische Proteine exprimiert, die dann die Expression der „early“ Gene (E) induzieren. Während dieser Phase werden Proteine hergestellt, die für die Replikation des viralen Genoms benötigt werden. Die DNA-Synthese findet nach dem „rolling-circle“-Mechanismus statt und resultiert in der Bildung eines einzigen DNA-Doppelstrangs, der mehrere Einheiten des viralen Genoms enthält („Concatemere“). Mit der DNA-Synthese beginnt auch die „late“ Phase (L), in der vor allem Strukturproteine zur Bildung der Virionen und zum Zusammenbau der Viruspartikel („assembly“) exprimiert werden. Das DNA enthaltende Capsid und die Tegumentproteine vereinigen sich an der inneren Kernmembran (INM). Der Austrittsmechanismus des Capsids aus dem Kern und der Erwerb der Hüllmembran wird noch kontrovers diskutiert. Für die Herpesviren gibt es zwei Theorien, die den Erwerb und die Herkunft der äußeren Virushüllmembran erklären (Abb. 2). Die „single envelope Theorie“ geht davon aus, dass die äußere Virushülle beim Austritt aus dem Kern erworben wird, also der äußeren Kernmembran entspricht, und während der Ausschleusung des Virus aus der Zelle nicht mehr abgeworfen wird, sondern enthaltene Proteine bei der Wanderung durch den Golgi-Apparat modifiziert werden. Diese Theorie beruht vor allem auf Beobachtungen bei dem α -Herpesvirus HSV-1 und war lange Jahre weithin akzeptiert (Enquist et al., 1998; Johnston et al., 1998; Roizman, 1996; van Genderen et al., 1994). Für das Pseudorabies-Virus (PrV, Schwein) aber auch für HCMV wird derweilen die „double envelope Theorie“ diskutiert. Diese Theorie besagt, dass das virale Capsid beim Austritt aus dem Kern eine erste Hülle erhält, diese aber im Cytoplasma wieder abstreift und das Capsid bei der Wanderung durch ER und Golgi seine endgültig Hülle erhält (Gershon et al., 1994; Granzow et al., 1997; Radsak et al., 1996; Whealy et al., 1991; Zhu et al., 1995). Bis jetzt gibt es jedoch nur Beobachtungen, die die eine oder andere Theorie stützen, ein endgültiger Beweis konnte noch nicht erbracht werden. Allerdings finden sich inzwischen auch für HSV-1 Veröffentlichungen, die die „double envelope Theorie“ verfechten (Skepper et al., 2001).

Nach einer meist asymptomatisch verlaufenden Primärinfektion können Herpesviren lebenslang im Wirt persistieren. Im Zustand der Latenz liegt das virale Genom als Episom vor und nur wenige virale Proteine werden synthetisiert. Die Reaktivierung kann durch endo- und exogene Stressfaktoren sowie Immunsuppression erfolgen (Mocarski, 1996).

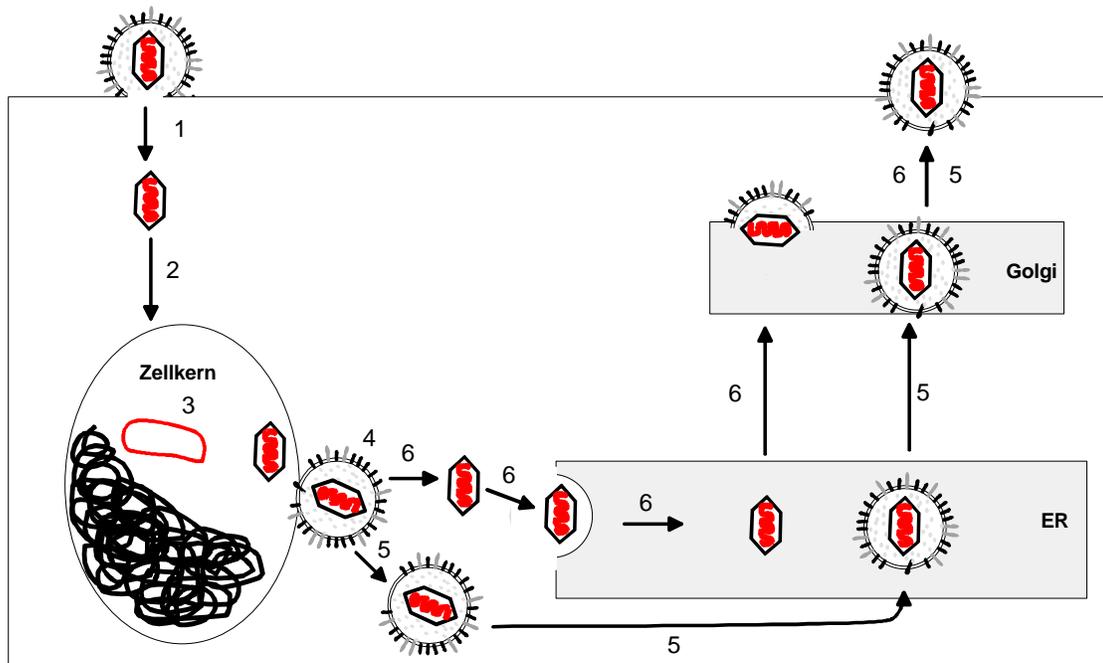


Abb 2. Zwei verschiedene Modelle zur Ausschleusung von Herpesviren aus der infizierten Zelle

Die Zelle wird durch die Adsorption und Aufnahme des Virus an der Zelloberfläche infiziert (1). Dabei verliert das Virus die äußere Hülle, und das Capsid wird entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (2). Dort wird das lineare Genom aus dem Capsid entlassen und zirkularisiert innerhalb von 4 h (3). Im Kern erfolgt dann die Genexpression und Replikation des Virus. In der „late“ Phase wird dann das virale Genom wiederum in Capside verpackt (4), die dann aus dem Kern austreten und eine äußere Hülle erhalten. Für den weiteren Austritt der Viren aus der Zelle werden zwei Theorien diskutiert: Die „single envelope theorie“ (5) geht davon aus, dass das Virus bereits bei dem Austritt aus dem Kern seine endgültige Hülle erhält, die dann beim Durchlauf von ER und Golgi nur noch modifiziert wird. Hinweise auf diese Theorie gibt es vor allem bei HSV-1. Die „double envelope theorie“ (6) besagt, dass das Virus die im Kern erhaltene Hülle an der äußeren Kernmembran abstreift und nur die Capside ins Cytosol entlassen werden. Die entgültige Hülle erhält das Virus dann erst durch Knospung im Golgi-Apparat. Hinweise auf diese Theorie gibt es vor allem bei Pseudorabies Virus (PrV), HCMV und VZV.

1.1.3 Übertragung und klinische Bedeutung des humanen Cytomegalievirus (HCMV)

Abhängig von der geographischen Lage und dem sozialen Status sind ca. 40-100 % der Erwachsenen mit HCMV infiziert (Britt and Alford, 1996). Dabei ist die Durchseuchung in Ländern der dritten Welt generell höher (bis zu 100 %). Das Virus kann durch Speichel, seltener durch Muttermilch, aber auch durch Schmierkontamination mit virushaltigen Blut oder Urin übertragen werden. Auch sexuelle Übertragungswege durch Zervixsekret und Samenflüssigkeit sind möglich (Britt and Alford, 1996). Abhängig vom Funktionszustand des Immunsystems kann die Infektion akut oder chronisch verlaufen. Es kommt jedoch immer zur Etablierung einer latenten Infektion, während der das virale Genom

lebenslang in bestimmten Wirtszellen persistiert. Bei Personen mit intaktem Immunsystem verläuft die Primärinfektion meist asymptomatisch, wohingegen immunsupprimierte Personen (AIDS-Patienten, Organtransplantierte) und immunologisch nicht kompetente Personen (z.B. Neugeborene) oft schwerwiegende Krankheitsbilder zeigen.

Die intrauterine Infektion kann, abhängig von der Dauer der Schwangerschaft, zur Schädigung des Fötus oder zum Abort führen. Bei kongenital infizierten Neugeborenen kann es zu Missbildungen des zentralen Nervensystems (Mikrocephalie, Chorioretinitis), Hörschäden, Hepatosplenomegalie und Thrombocytopenie kommen (Boppana et al., 1992; Stagno et al., 1982; Stagno et al., 1986). Die kongenitale Infektion erfolgt bei ca. 1% aller Kinder, davon zeigen ca. 15% Symptome. Bei weiteren 10-15% treten nach Jahren Spätschäden auf, die sich in Innenohrschwerhörigkeit, Sprachstörungen und neurologischen Zeichen eines frühkindlichen Hörschadens manifestieren (Hanshaw and Dudgeon, 1978b; Hanshaw and Dudgeon, 1978a; Stagno and Whitley, 1985).

Bei immunsupprimierten und immundefizienten Personen treten bei Infektionen folgende Symptome auf: CMV-Mononukleasen, Hepatitiden, Retinitis, gastrointestinale Ulcerationen, interstitielle Pneumonien und selten auch Encephalitiden (Meyers, 1984; Smith and Brennessel, 1994). Die CMV-Pneumonie ist die häufigste Todesursache bei AIDS-Patienten und Knochenmarkstransplantatempfängern (Enright et al., 1993; Moskowitz et al., 1985).

Die multiplen Symptome, in denen sich eine HCMV-Infektion manifestiert, spiegeln sich in der Vielfalt der Zellen wieder, in denen das Virus nach Infektion nachgewiesen werden kann. Das Virus verbreitet sich im gesamten Wirtsorganismus durch den Transport im Blutstrom in phagozytierenden Zellen (Stoddart et al., 1994). Das Virus repliziert in Epithel- und Endothelzellen verschiedenster Organe (Speicheldrüsen, Nieren, Nebennieren, Leber, Lunge, Milz und Knochenmark). Allerdings ist bis heute weitgehend unklar, in welchen Zellen das Virus während der Latenzphase persistiert und wie es aus dieser Phase wieder reaktiviert werden kann. Potentieller Ort der Viruslatenz und der Reaktivierung scheinen trotz kontroverser Diskussionen Zellen des Monocyten- und Makrophagensystems zu sein (de-Jong et al., 1998; Hahn et al., 1998; Soderberg-Naucler et al., 1997).

1.1.4 Murines Cytomegalievirus als Modellsystem

Die strikte Speziespezifität der Cytomegalieviren verhindert, die HCMV-Infektion im Tiermodell zu untersuchen. Da der Verlauf der Infektion und die Etablierung der Latenz im jeweiligen Wirt bei HCMV und MCMV sehr ähnlich ist, dient die Infektion der Maus mit MCMV als Modellsystem zur Untersuchung der Cytomegalieinfektion *in vivo*. Wie auch bei einer HCMV-Infektion führt die Infektion immunkompetenter Mäuse mit MCMV zur Kontrolle der Infektion und zur Viruslatenz (Hudson, 1979). Die Infektion immunsupprimierter Mäuse hingegen resultiert in tödlich verlaufenden interstitiellen Pneumonien, Hepatitiden und Entzündungen der Nebennieren (Brody and Craighead, 1974; Mayo et al.,

1977; Reddehase et al., 1985b). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MCMV durch Reaktivierungsprotokolle, wie z.B. Immunsuppression, aus der Latenz reaktiviert werden kann (Hamilton and Seaworth, 1985; Reddehase et al., 1994). Dieses Modellsystem ermöglicht also MCMV-Mutanten im Gesamtkontext zu untersuchen und so unbekannte Pathogenesemechanismen in der CMV-Infektion zu identifizieren.

1.2 Die offenen Leserahmen bei MCMV und HCMV

HCMV und MCMV besitzen mit Genomen von ca. 230 kbp Länge die größten Genome Säugetier-infizierender Viren. Nach der vollständigen Sequenzierung des AD169-Laborstammes von HCMV (Chee et al., 1990) und des Smith-Stammes von MCMV (Rawlinson et al., 1996) ergaben sich 200 bzw. 170 potentielle offene Leserahmen (ORF). Von den 170 ORFs von MCMV zeigen nur 48,8% Homologien zu anderen bekannten Proteinen. Im Vergleich zwischen MCMV und HCMV finden sich 78 Gene mit signifikanter Homologie zueinander (Rawlinson et al., 1996), von denen 33 konserviert in allen Herpesviren zu finden sind (Chee et al., 1990). Die Funktion der Mehrzahl der CMV-Gene ist jedoch unbekannt, auch ist bei vielen potentiellen ORFs nicht bekannt, ob sie für die Virusvermehrung *in vitro* und *in vivo* essentiell sind (Wagner, 2000).

Um die Rolle der bisher unbekanntenen ORFs zu untersuchen, wurden in den letzten Jahren verschiedene Methoden entwickelt, um einzelne ORFs im Viruskontext zu mutieren. Ein entscheidender Fortschritt war dabei die Klonierung des gesamten MCMV- (Messerle et al., 1997) und HCMV- (Borst et al., 1999) Genoms als „bacterial artificial chromosome“ (BAC). Diese Technik ermöglicht es, das gesamte virale Genom in *Escherichia coli* (*E. coli*) zu überführen, um dort das Genom gezielt oder zufällig zu mutagenisieren, was die schnelle und effiziente Untersuchung verschiedener Mutanten im viralen Kontext erlaubt (Brune et al., 1999; Brune et al., 2000; Wagner and Koszinowski, 2001; Wagner et al., 1999).

Die große Kodierungskapazität der Cytomegalieviren ermöglicht durch verschiedenste Interaktionsstrategien mit zellulären Proteinen den Wirt zum eigenen Vorteil zu manipulieren (Alcami and Koszinowski, 2000). So gibt es sowohl bei HCMV als auch bei MCMV sogenannte Immunevasionsgene, die durch verschiedene Mechanismen die Antigenpräsentation durch den MHC Klasse I-Komplex verhindern und somit den Hauptkontrollmechanismus des Immunsystems in Bezug auf die virale Infektion ausschalten (Ahn et al., 1996; Ziegler et al., 2000; Ahn et al., 1997; Jones et al., 1995; Jones et al., 1996; Jones and Sun, 1997; Reusch et al., 1999; Thale et al., 1995; Wiertz et al., 1996b; Wiertz et al., 1996a; Ziegler et al., 1997).

1.2.1 Immunantwort gegen virale Erreger und insbesondere MCMV

Die Immunantwort von Vertebraten lässt sich in ein angeborenes und ein erworbenes System unterteilen. In der frühen Phase der Infektion spielen die angeborenen unspezifischen Mechanismen des Immunsystems eine wichtige Rolle. Zum einen werden durch Phagozytose Pathogene aufgenommen und zerstört (Makrophagen und neutrophile Granulocyten, natürliche Killerzellen (NK)). Weiterhin bereitet die Ausschüttung von Cytokinen das Immunsystem auf die später erfolgende erworbene Immunantwort vor. Der Mechanismus der angeborenen Immunantwort führt jedoch nicht zur schützenden Immunität, sondern verhindert die Virusausbreitung in frühen Stadien bis die erworbene Immunantwort greift.

Die erworbene Immunantwort kann in zelluläre und humorale Komponenten unterteilt werden und spielt die Hauptrolle in der Reaktion des Immunsystems auf virale Infektionen. Bei der erworbenen Immunantwort müssen T- und B-Lymphozyten mit spezifischen Antigenen in Kontakt kommen, die von den sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden. Die proteolytischen Spaltprodukte viraler Proteine müssen dabei über den sogenannten „Majorhistokompatibilitätskomplex“ (MHC) präsentiert werden. MHC Klasse I-Komplexe werden in diesem Fall mit in der Zelle synthetisierten endogenen Antigenen viraler Proteine beladen, die über den sekretorischen Transportweg zum MHC-Molekül gelangen. MHC Klasse II-Komplexe präsentieren hingegen Peptide exogener Produkte, die über einen endosomal/lysosomal assoziierten Transportweg zur Beladung gelangen. Nahezu alle Zellen tragen den MHC Klasse I-Molekülkomplex, wohingegen sich die MHC Klasse II-Komplexe nur auf sogenannten „professionellen“ APCs (Makrophagen, B-Lymphozyten, dendritische Zellen) befinden. Die über MHC Klasse I-Komplexe präsentierten viralen Antigene können durch CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) erkannt werden, die dann die infizierten Zellen zerstören. Die Erkennung der Antigene der MHC Klasse II-Komplexe erfolgt durch CD4⁺ T-Helferzellen, die durch Zytokinausschüttung B-Lymphozyten zur Antikörpersynthese und Makrophagen zur Phagozytose anregen.

Für MCMV konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass für die Kontrolle der MCMV-Infektion hauptsächlich die MHC Klasse I-restringierte CD8⁺ CTL Antwort verantwortlich gemacht werden kann. Sowohl adoptive Transferexperimente als auch *in vivo*-Depletion von CD8⁺- und CD4⁺-Zellen zeigten, dass Mäuse nur in der Gegenwart von CD8⁺ CTLs in der Lage waren, die CMV-Infektion in den Griff zu bekommen, wohingegen der Verlust der CD4⁺ T-Helferzellen keinerlei Effekt zeigten (Jonjic et al., 1990; Reddehase et al., 1985a; Reddehase et al., 1988).

Die CD4⁺ T-Helferzellen-abhängige Antikörperantwort scheint aber bei der Reaktivierung des Virus eine Rolle zu spielen. Mäuse mit fehlender Antikörperproduktion zeigten bei Reaktivierung deutlich

höhere Virustiter als Mäuse mit funktionierendem Immunsystem. So kann durch die Antikörper möglicherweise die Verbreitung von reaktivierten Viren eingegrenzt werden (Jonjic et al., 1994).

1.2.2 MHC Klasse I-vermittelte Antigenpräsentation

Zur Kontrolle der CMV-Infektion durch CD8⁺ T-Zellen ist die Präsentation antigener Peptide durch MHC Klasse I-Komplexe nötig (Zinkernagel and Doherty, 1974; Zinkernagel and Doherty, 1979). MHC Klasse I-Komplexe setzen sich aus verschiedenen Komponenten zusammen. Die schwere Kette wird bei der Maus hauptsächlich durch drei allele Genloci (K, D, und L) codiert, die auf dem H2-Locus auf Chromosom 17 lokalisiert sind. Neben der schweren Kette besteht das MHC Klasse I-Molekül auch aus einer nicht kovalent gebundenen leichten Kette, dem β_2 -Mikroglobulin (β_2m). Dieses Heterodimer bildet über Disulfidbrücken vier Domänen: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und β_2m . Die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne bilden eine Peptidbindende Grube an der Moleküloberfläche. Hier können 8-11 Aminosäuren umfassende Peptide gebunden werden (Bjorkman et al., 1987), die durch das cytosolische Proteasom generiert wurden (Coux et al., 1996; Hochstrasser, 1996). Die im Cytosol generierten Peptide werden über den ATP-abhängigen Peptidtransporter (TAP, „transporter associated with antigen processing“) ins Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER) transportiert (Hill and Ploegh, 1995). Hier erfolgt der Zusammenbau der MHC-Moleküle, die schwere Kette assoziiert mit β_2 -Mikroglobulin (β_2m) und wird mit Peptid beladen. Beim Zusammenbau dieses Komplexes sind eine Reihe von Chaperonen wie Calnexin, Calreticulin und Tapasin beteiligt (Degen and Williams, 1991; Ortmann et al., 1997; Sadasivan et al., 1996; Suh et al., 1996). Danach wird dieser Komplex über den sekretorischen Transportweg zur Zelloberfläche gebracht und dort den cytotoxischen CD8⁺-T-Zellen präsentiert wird. Dabei wird die schwere Kette durch Anhängen von Zuckerresten modifiziert. Im medialen Bereich des Golgi-Apparates wird die Glykosylierung der schweren Kette so verändert, dass das Enzym Endoglykosidase H (Endo H) die Zuckerreste nicht mehr abspalten kann. Die unterschiedlichen kompartimentspezifischen Glykosylierungsstufen ermöglichen eine grobe intrazelluläre Lokalisation der Moleküle.

1.2.3 Inhibition der MHC Klasse I-Antigenpräsentation durch HCMV und MCMV

Durch jahrtausendelange Ko-Evolution von Virus und Wirt haben Viren verschiedene Strategien entwickelt, die Immunantwort des Wirtes zu beeinflussen (Alcami and Koszinowski, 2000; Ploegh, 1998).

Eine der Strategien der Viren ist die Verhinderung der Antigenpräsentation durch MHC Klasse I-Moleküle. Das erste virale Produkt, dem eine solche immunmodulierende Funktion zugeschrieben wurde, war das E3/19 K Protein von Adenovirus (Burgert and Kvist, 1985; Burgert and Kvist, 1987). Dieses virale Protein bindet direkt an den MHC Klasse I-Komplex und hält diesen im ER zurück.

Inzwischen wurde eine Vielzahl viraler Proteine identifiziert, die durch verschiedene Strategien die Antigenpräsentation über den MHC Klasse I-Komplex verhindern und somit die Erkennung virusinfizierter Zellen durch CD8⁺CTL oder CTL einschränkt, so auch bei HCMV und MCMV (Abb. 3). Das Produkt des HCMV-Gens US6 behindert den Peptidtransport durch den TAP-Transporter und damit die Beladung der MHC Klasse I-Komplexe mit viralen Peptiden (Ahn et al., 1997; Hengel et al., 1997). Die Produkte der Gene US2 und US11 hingegen binden an die schwere MHC Klasse I-Kette und bewirken deren sofortigen Rücktransport aus dem ER in das Cytosol, wo die schwere Kette durch das Proteasom degradiert wird (Wiertz et al., 1996b; Wiertz et al., 1996a). In MCMV wurden unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um die MHC Klasse I-abhängige Antigenpräsentation an der Zelloberfläche zu verhindern. Das Genprodukt von *m152/gp40* bindet MHC Klasse I-Moleküle und löst einen Transportblock im ER/cis Golgi-Kompartiment (ERGIC) der Zelle aus (Ziegler et al., 1997; Ziegler et al., 2000). Das Glykoprotein *m06/gp48* bindet im ER an MHC Klasse I-Moleküle und leitet diese zur Degradation ins lysosomale Kompartiment (Reusch et al., 1999). *m04/gp34* schließlich bildet zusammen mit MHC Klasse I-Molekülen einen Komplex, der zur Zelloberfläche transportiert wird (Kleijnen et al., 1997). Dort verhindert *m04/gp34* die Erkennung bestimmter MHC Klasse I-Moleküle durch CD8⁺CTL (Kavanagh et al., 2001).

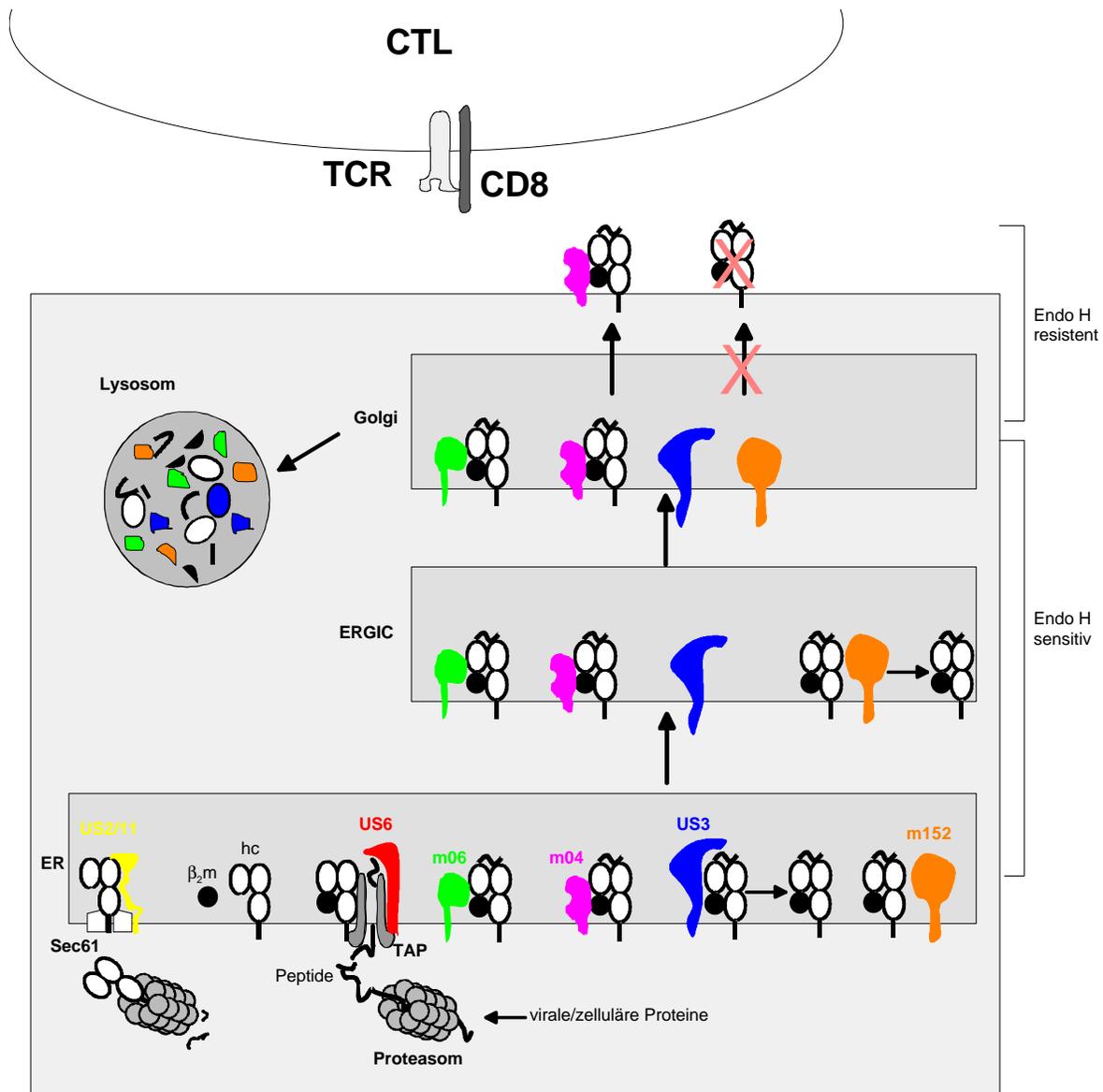


Abb. 3: Interferenz von HCMV und MCMV mit der MHC Klasse I-restringierten Antigenpräsentation

Virale und zelluläre Proteine werden im Cytosol vom Proteasom in Peptide gespalten, die über den *Transporter associated with antigen processing* (TAP) in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert werden und dort mit der schweren Kette (hc) und β_2m einen Komplex bilden. Nur trimolekulare Komplexe aus schwerer Kette, β_2m und Peptid können das ER verlassen und über den konstitutiv sekretorischen Transportweg durch den Golgi-Apparat an die Zellmembran transportiert werden, um die gebundenen Peptide dem T-Zellrezeptor von CTL zu präsentieren. HCMV und MCMV haben verschiedene Strategien entwickelt, die MHC Klasse I-abhängige Präsentation von Peptiden zu verhindern. Das US6-Glykoprotein (rot) von HCMV hemmt den Peptidtransport durch den TAP-Transporter, indem es von der ER-Seite aus an den Transporter bindet und somit den Transport der Peptide in das ER verhindert. Die HCMV-Glykoproteine US2 und US11 (gelb) führen unabhängig voneinander zur Dislokation neu synthetisierter MHC Klasse I-schwerer Ketten durch den Sec61-Komplex zurück ins Cytosol, wo die schwere Kette durch das Proteasom abgebaut wird. Über einen bisher unbekannt Mechanismus arretiert das HCMV Protein US3 (blau) vollständig assemblierte MHC Klasse I-Moleküle im ER. US3 selbst verlässt das ER und wird lysosomal degradiert. Das Genprodukt von MCMV *m04/gp34* (pink) bindet im ER an vollständig assemblierte MHC

Klasse I-Moleküle, wird im Komplex mit MHC an die Zelloberfläche transportiert und verhindert dort die Erkennung bestimmter MHC Klasse I-Allele durch CD8⁺-CTL. Gp40, kodiert von MCMV *m152* (orange), führt zur Retention von MHC Klasse I-Komplexen im ER/cis Golgi intermediate compartment (ERGIC), während gp40 selbst im Lysosom degradiert wird. Das von MCMV *m06* (grün) kodierte Protein gp48 schließlich bindet im ER an MHC Klasse I-Komplexe und dirigiert sie über ein di-Leucin-Motiv zur Degradation in die Lysosomen. Diese unterschiedlichen Strategien von MCMV und HCMV führen letztlich alle zu dem gleichen Ergebnis, nämlich die Erkennung Virus-infizierter Zellen durch CTLs zu verhindern.

1.2.4 MCMV *m06/gp48*

Das für das Viruswachstum nicht essentielle MCMV-Glykoprotein gp48 wird durch das in der „early“ Phase der Infektion exprimierte Gen *m06* codiert und ist ein Typ I-Transmembranprotein (Reusch et al., 1999). *m06/gp48* bindet im endoplasmatischen Reticulum (ER) an neu synthetisierte β_2 m-assoziierte MHC Klasse I-Moleküle. Dieser Komplex verlässt das ER, gelangt durch den Golgi-Apparat zu den Lysosomen und wird dort abgebaut. Dadurch wird die Oberflächenexpression der MHC Klasse I-Moleküle stark herabgesetzt. Für *m06/gp48* konnte eine luminal MHC-bindende Domäne und im cytoplasmatischen Anteil ein für die lysosomale Lokalisation verantwortliches Di-Leucin-Motiv identifiziert werden. Durch Deletion oder Mutation dieses Motivs kommt es zu einer Wiederherstellung der MHC Klasse I-Oberflächenexpression, ohne dass die Assoziation mit gp48 beeinflusst wird. Die Bindung der MHC Klasse I-Moleküle ist allein von der membranverankerten luminalen Domäne des viralen Proteins abhängig.

Neben gp48 besitzt MCMV zwei weitere Gene, die mit MHC Klasse I-Molekülen interagieren können (Kleijnen et al., 1997; Kavanagh et al., 2001; Ziegler et al., 1997; Ziegler et al., 2000). Allerdings haben Studien gezeigt, dass *m06/gp48* bei der Regulation der Oberflächenexpression der MHC Klasse I-Moleküle den größten Effekt hat (Gutermann, 2001), was eine abundante Expression von *m06/gp48* bedingt. Dies führt dazu, dass *m06/gp48* nicht immer einen Interaktionspartner findet und freies gp48 ein anderes Schicksal als der Komplex aus gp48 und MHC Klasse I-Molekülen erfährt. Vorversuche haben gezeigt, dass überschüssiges gp48, welches nicht an MHC Klasse I Moleküle gebunden ist, nicht wie erwartet zu den Lysosomen dirigiert wird, sondern ins Cytosol transportiert und dort durch das Proteasom abgebaut wird (Hengel et al., 1999) (Reusch, 2000).

1.3 ER-assoziierte Degradation (ERAD)

Das endoplasmatische Reticulum stellt den Ausgangspunkt des Transportweges von Proteinen, die für Sekretion, den Transport zur Plasmamembran oder für sekretorische/endocytotische Organellen bestimmt sind, dar. Neusynthetisierte Proteine werden kotranslational über den hetero-trimeren Sec61 Komplex (Translocon) in das ER transportiert und dort gefaltet und modifiziert (Matlack et al., 1998; Walter and Johnson, 1994). Die korrekte Faltung der Proteine wird durch transiente Bindung an ER-residente Chaperone wie BiP („binding Protein“, GRP78), Calnexin, Calreticulin und

Proteindisulfidisomerase (PDI) katalysiert. BiP verhindert durch die direkte Bindung an hydrophobe Bereiche neusynthetisierter Peptidketten nach der Translokation den Rücktransport ins Cytosol und die Aggregation des Proteins im ER (Matlack et al., 1999). Weiterhin ermöglicht die Bindung von BiP die Freisetzung des neusynthetisierten Peptids aus dem Translocon. PDI katalysiert abhängig vom Redoxzustand die Bildung und Auflösung von Disulfidbindungen im Protein (Gilbert, 1997).

Neben der korrekten Faltung erhalten Glykoproteine im ER auch ihre Zuckerseitenketten. Bei der N-Glykosylierung von Glykoproteinen wird ein Kern-Oligosaccharid bestehend aus zwei N-Acetylglucosamin-, neun Mannose- und drei Glucoseresten auf die freie Aminogruppe einer Asparaginseitenkette übertragen. Die Bindung ER-residenter Lektine, wie Calnexin oder Calreticulin, an fast alle löslichen und membrangebundenen Glykoproteine im Zusammenspiel mit der UDP-Glukose:Glykoprotein-Glykosyltransferase (GT) und der Glukosidase II bildet ein Kontrollsystem für die korrekte Faltung der neusynthetisierten Proteine (Abb. 4A). Nur bei korrekter Faltung der Proteine kann die Protein-Chaperon-Bindung aufgelöst werden und das korrekt prozessierte Glykoprotein das ER verlassen, fehlerhafte Faltung dagegen wird durch die GT erkannt und führt zu erneuter Bindung des Chaperons und weiteren Faltungszyklen.

Fehlgefaltete, mutierte oder Proteine ohne Interaktionspartner werden im ER erkannt und der ER-assoziierten Degradation (ERAD) zugeführt werden, um so zu verhindern, dass funktionsunfähige Proteine auf den sekretorischen Weg gelangen (Brodsky and McCracken, 1997; Hammond and Helenius, 1995; Klausner and Sitia, 1990).

Die ERAD wird durch das cytoplasmatische Proteasom durchgeführt. Das 26S-Proteasom ist ein Multiprotein-Komplex, der sich aus dem proteolytischen Kernpartikel (20S, Core) und dem regulatorischen Komplex (19S, Cap) zusammensetzt (Voges et al., 1999). Der proteolytische "Core"-Komplex ist zylinderförmig und setzt sich aus jeweils zwei Kopien sieben verschiedener α - und β -Untereinheiten zusammen. Dieser 20S-Core-Komplex wird auf einer oder beiden Seiten vom regulatorischen 19S-Komplex flankiert. Der regulatorische Komplex arbeitet ATP-abhängig und ist für die Erkennung und Entfaltung der meist ubiquitinierten Substrate zuständig. Die Ubiquitinierung ist das bekannteste und am besten untersuchte Signal, um Zielproteine für den proteasomalen Abbau zu markieren. Die Ubiquitinmoleküle werden durch eine Enzymkaskade auf die Substrate übertragen (Hershko and Ciechanover, 1998). Zuerst wird das Ubiquitinmolekül durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) ATP-abhängig aktiviert und dann auf das ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) übertragen. E2 kann nun das aktivierte Ubiquitin direkt oder mit Hilfe der spezifischen Ubiquitin-Ligase (E3) auf ein Lysin des Substrates übertragen. Lysinreste des übertragenen Ubiquitins dienen dann als Donor für die Übertragung von weiteren aktivierten Ubiquitinmolekülen und zur Bildung einer Poly-Ubiquitinkette. Diese kann dann durch einen Rezeptor der 19S-Untereinheit des Proteasoms erkannt werden und so die Degradation des Substrats veranlassen. Neben den ubiquitinierten Substraten gibt es auch Beispiele für

ATP-abhängige, aber ubiquitin-unabhängige Proteolyse, z. B. bei der Ornithin-Decarboxylase (Elias et al., 1995; Murakami et al., 1992a).

Nach dem derzeitigen Erkenntnisstand kann die ER-assoziierte Degradation in mehrere Schritte eingeteilt werden (Abb. 4B). Sie beinhaltet die Erkennung der zum Abbau bestimmten Proteine im ER, den Rücktransport dieser Proteine über den Sec-61-Komplex ins Cytosol, gefolgt von der Deglykosylierung und Ubiquitinierung der Substrate und schließlich der Degradierung durch das Proteasom (Myung et al., 2001; Attaix et al., 2001). Dieses Modell resultiert in einem Proteasom-unabhängigen Transport der Substrate ins Cytosol. Wird das Proteasom inhibiert, kommt es zu einer Anreicherung von deglykosyliertem und ubiquitiniertem Substrat im Cytosol. Allerdings gibt es auch häufiger Beispiele für Substrate die proteasom-abhängig transportiert werden. Bei Hemmung des Proteasoms akkumuliert das glykosylierte Substrat im ER (Chillaron and Haas, 2000; Plemper et al., 1998; Yang et al., 1998).

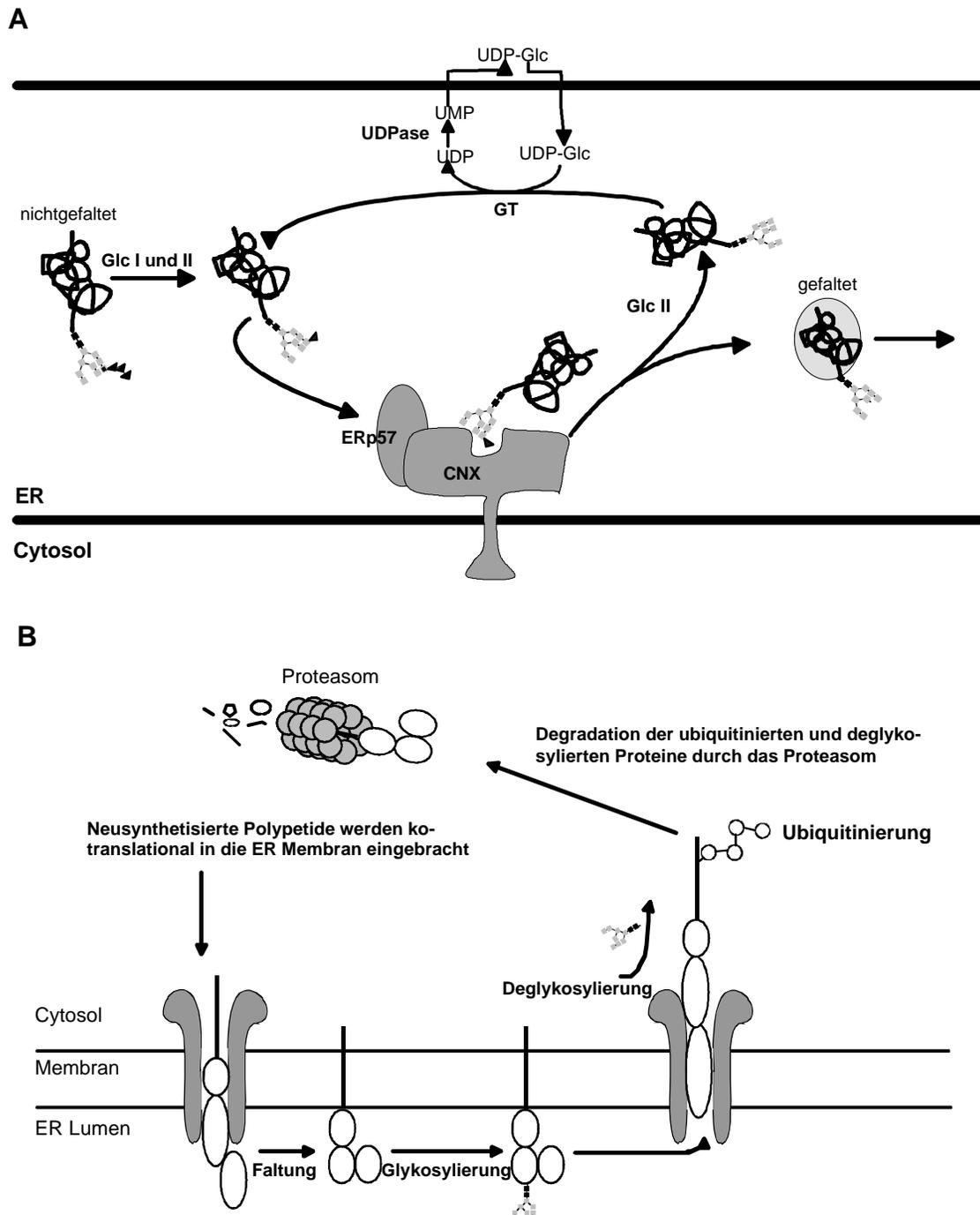


Abb. 4: Modelle für den Calnexinzyklus und die ER-assoziierte Degradation

A Modell über die Rolle von Calnexin (CNX) bei der Faltung und der Qualitätskontrolle neusynthetisierter Glykoproteine

Zwei der drei Glukosereste (schwarze Dreiecke) werden rasch durch Glukosidase I und II (Glc I und II) abgebaut. Das so gebildete monoglucosylierte Protein bindet entweder an Calnexin oder Calreticulin und wird dabei auch ER57p, einer Thioloxidoreduktase, ausgesetzt, die transient gemischte Disulfide überträgt. Der

verbliebene Glukoserest kann jetzt noch durch die Glc II abgespalten werden, was zur Dissoziation des Komplexes führt. Wenn das Protein korrekt gefaltet ist, kann es das ER verlassen und auf dem sekretorischen Weg zu seinem Bestimmungsort gelangen. Wenn das Protein jedoch nicht korrekt gefaltet ist, wird es von der UDP-Glukose:Glykoprotein-Glykosyltransferase (GT) erkannt und reglukosyliert, was die erneute Assoziation mit CNX ermöglicht. Dieser Zyklus wird so lange wiederholt bis das Protein korrekt gefaltet ist oder aber degradiert wird, da die Bindung an CNX das Protein daran hindert, das ER zu verlassen. Durch die enzymatische Leistung der Mannosidase I wird schließlich ein Mannosidase-Rest aus dem Zucker-"Core" abgespalten. Nach dieser Reaktion kann das Glykoprotein das ER verlassen. Wird jedoch die schnelle Freisetzung des Glykoproteins von CNX verhindert, kommt es abhängig von der Verweildauer im ER zum Transport ins Cytosol und zur Degradation durch das Proteasom. Die UDP-Glukose für die Wiederglukosylierung stammt aus dem Cytosol im Austausch gegen Uridin 5'-Phosphat. Dies wird durch das spezielle Enzym Uridindiphosphatase (UDPase) aus UDP generiert.

B Modell für die ER-assoziierte Degradation am Beispiel der schweren Kette von MHC Klasse I

Neusynthetisierte Polypeptidketten werden über das Sec61-Translocon in die ER-Membran transportiert. Im ER werden die Glykoproteine glykosyliert und es erfolgt durch die Hilfe von Chaperonen die korrekte Faltung der neusynthetisierten Proteine. Wenn die korrekte Faltung fehlschlägt, oder das Protein wie im Beispiel keinen Bindungspartner findet, wird das entsprechende Protein wieder in das Translocon inseriert und ins Cytosol zurücktransportiert. Dabei erfolgt die Deglykosylierung und die Ubiquitinierung und schließlich der Abbau des Proteins durch das Proteasom. Würde man die Funktion des Proteasoms hemmen, käme es zu einer Akkumulation deglykosylierter und ubiquitinerter Substrate im Cytosol.

1.3.1 Virale Interaktion mit dem Proteasom

Das Proteasom ist neben der Qualitätskontrolle im ER auch für die Prozessierung antigener Peptide zuständig und bietet einen Angriffspunkt für virale Proteine, um das Immunsystem des Wirts zu beeinflussen (Jarrousse et al., 1999). Ähnlich wie die Gene US2 und US11 aus HCMV (Wiertz et al., 1996b; Wiertz et al., 1996a) nutzt das Vpu-Gen vom humanen Immundefizienz-Virus (HIV) Typ 1 das Proteasom, indem es die Degradation des CD4-Glykoproteins durch das Proteasom induziert (Schubert et al., 1998). Das Tax-Gen des humanen T-Zell Leukämie-Virus (HTLV) induziert durch Bindung und Aktivierung des Proteasoms die Degradation der I kappa B Inhibitoren und bewirkt somit eine konstitutive Ausschüttung von funktionellem NF kappa B (Beraud and Greene, 1996; Hemelaar et al., 2001; McKinsey et al., 1996). Andere virale Proteine haben intrinsische Eigenschaften, die den Abbau durch das Proteasom beeinflussen können. So besitzt das EBNA-1-Protein von EBV eine Sequenz mehrerer Glycin-Alanin-Wiederholungen, die den Abbau des Proteins durch das Proteasom verhindert und somit keine EBNA-1-Antigenpräsentation erlaubt (Dantuma et al., 2000; Levitskaya et al., 1997). Das „infected cell protein 0“ (ICP-0) von HSV-1, ein Homolog der E3 Ubiquitin-Ligase mit einer charakteristischen RING-Domäne, interagiert mit dem Proteasom und kann die Degradation anderer Proteine während der viralen Infektion induzieren (Parkinson and Everett, 2000; Van-Sant et al., 2001). Das Protein X des Hepatitis B-Virus (HBV) ist ein Transaktivator und scheint für die Entstehung von Leberkrebs bei chronischer Infektion mitverantwortlich zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass HBV-X an eine Untereinheit des Proteasoms bindet und durch die Bindung die proteolytische Funktion des Proteasoms beeinträchtigt. So wird z.B. der „Turnover“ von c-Jun in der Zelle inhibiert (Seeger, 1997; Sirma et al., 1998; Zhang et al., 2000).

1.4 Ziel der Arbeit

Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Untersuchung und Charakterisierung der ER-assoziierten Degradation des nicht-essentiellen viralen Proteins gp48.

Das für die Virusvermehrung nicht-essentielle Glykoprotein gp48, welches durch das Gen *m06* des murinen CMV kodiert wird, interferiert mit dem MHC Klasse I-abhängigen Weg der Antigenpräsentation. Gp48 bindet im ER an korrekt gefaltete, β_2 -m-assoziierte MHC Klasse I-Moleküle und transportiert diese durch den Golgi-Apparat zu den Lysosomen, wo der gesamte Komplex degradiert wird (Reusch et al., 1999). Im Vergleich zu anderen MHC Klasse I-regulierenden Genen von MCMV ist *m06/gp48* während der viralen Infektion das effektivste (Gutermann, 2001). Um dieser Rolle gerecht zu werden, muss gp48 abundant exprimiert werden, um so viele MHC Klasse I-Moleküle wie möglich zu binden und der Degradation zuzuführen. In Situationen in denen gp48 nicht an seinen physiologischen Partner bindet, wird das überschüssige gp48 durch das cytosolische Proteasom degradiert. In dieser Arbeit wurde die Rolle der ER-assoziierten Degradation von gp48 in verschiedenen stabilen Zelllinien und in der Virusinfektion untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
[³⁵ S]-Cystein/Methionine (Promix)	Amersham, Freiburg
Acrylamid/Bisacrylamid (Protogel)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Agar	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Agarose	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, Richmond, USA
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
ATP	Sigma, München
Bacto Hefe-Extrakt	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Bacto Trypton	Difco Lab., Detroit, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Castanospermin	Sigma, München
Chloroquin	Sigma, München
Creatin-Phosphat	Calbiochem, Bad Soden
Creatin Phosphokinase	Calbiochem, Bad Soden
Deoxymannojirimycin	Sigma, München
Deoxynojirimycin	Sigma, München
„Dig DNA Labeling Kit“	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
di-Natriumhydrogenphosphat	Riedel-de Haen, Seelze
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
DNA-Größenstandards	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTPs	Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden
Dulbecco`s modified Eagle medium (DMEM)	Gibco, NY, USA
„ECL ^{Plus} Western blotting detection reagents-Kit“	Amersham, Freiburg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (EtOH)	Riedel-de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, München

Ethylendiamintetraacetat-Na-Salz (EDTA)	Roth, Karlsruhe
„Expand High Fidelity PCR System“ Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Filme (BioMax MR)	Kodak, Rochester, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Marburg
Geneticinsulfat (G418)	Sigma, München
GDP-Mannose	Calbiochem, Bad Soden
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Serva, Heidelberg
Isopropanol	Riedel-de Haen, Seelze
Kaliumacetat	Riedel-de Haen, Seelze
Klenow-Polymerase	NEB, USA
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Lactacystin	Biomol, Hamburg
Leupeptin	Sigma, München
L-Glutamin	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Methionin (Met)	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
MG-132 (ZL ₃ H)	Biomol, Hamburg
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden
Natriumacetat	Riedel-de Haen, Seelze
Natriumchlorid	Riedel-de Haen, Seelze
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	J.T. Baker B.V., Deventer, Holland
NCS (Serum aus neugeborenen Kälbern)	PAA, Marburg
Nonidet P-40 (NP40)	Sigma, München
Nucleobond (DNA-Isolierungskit)	Macherey & Nagel, Düren
Paraformaldehyd	J.T. Baker B.V., Deventer, Holland
Penicillin	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland

Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Phenolrot	Serva, Heidelberg
Phenylmethylsulfonfluorid (PMSF)	Sigma, München
Phosphonoessigsäure	Sigma, München
Protein A Sepharose CL-4B	Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden
Protein G-Sepharose Fast Flow	Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsezyme	Roche Diagnostics, Mannheim; NEB, USA
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Streptomycinsulfat	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Sucrose	Sigma, München
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
Tetracyclin	Sigma, München
Tris-hydroxymethylaminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Gibco/BRL, Life Lab., Paisley, Scotland
Tween 20	Merck, Darmstadt
ZL ₃ H (MG-132)	Biomol, Hamburg
Zeocin	Invitrogen, USA

2.2 Antikörper

Aus Kaninchen:

anti p58	(Saraste and Svensson, 1991)
GRP-78 (BiP)	Affinity Bioreagents, Golden Co
anti Mannosidase II	(Moremen et al., 1991)
anti-Calnexin-C, SPA860	Stressgen, Victoria, Canada
m06-2 gegen <i>m06/gp48</i>	(Reusch, 2000)

Aus Maus:

28-14-8S, anti H2-L ^a , L ^d , D ^b	ATCC HB27
Monoklonaler Antikörper CROMA 229	(Moremen et al., 1991; Reusch et al., 1999; Reusch, 2000)
gegen MCMV <i>m06/gp48</i>	

Aus Ratte:

Monoklonaler Antikörper 1D4B gegen Lamp-1	Developement studies hybridoma Bank
Monoklonaler Antikörper 3F10 gegen HA	Roche Diagnostics, Mannheim

2.2.1 Sekundärantikörper

FITC-konjugiert:

Esel anti-Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg
Esel anti-Maus IgG	Dianova, Hamburg
Esel anti-Ratte IgG	Dianova Hamburg

Texas-Red-konjugiert:

Esel anti-Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg
Esel anti-Maus IgG	Dianova, Hamburg
Esel anti-Ratte IgG	Dianova, Hamburg

Alkalische Phosphatase (AP)-konjugiert:

Ziege anti-Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG	Dianova, Hamburg

Peroxidase (Pox)-konjugiert:

Ziege anti-Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG	Dianova Hamburg

2.3 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

Die Methoden wurden in Anlehnung an Maniatis und Kollegen durchgeführt (Maniatis et al., 1989). Abweichungen vom Standardprotokoll wurden angegeben. Bei kommerziellen Kits wurde, falls nicht anders angegeben, das Standardprotokoll verwendet. Die genaue Zusammensetzung von Puffern, etc. findet sich in der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Kits.

2.3.1 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien im analytischen Maßstab (Minipräparation)

LB-Medium	10g Bacto-Tryptone 5g Hefeextrakt 5g NaCl 1 l H ₂ O
Lösung I	10 mM EDTA, 400 µg/ml RNase I 100 mM Tris-HCl, pH 7,5
Lösung II	0,2 M NaOH 1% SDS
Lösung III	2,5 M KOAc 2,5 M HOAc

Bakterien wurden in LB Medium oder LB Agar (1l LB Medium + 15 g Agar) unter Zusatz entsprechender Antibiotika zur Selektion auf enthaltene Plasmide bei 37 °C ÜN kultiviert. Bakterien, die Plasmide mit einem temperatur-sensitiven Replikationsursprung enthielten, wurden bei 30 °C kultiviert. Für die Isolierung von Plasmiden im analytischen Maßstab, wurde der GFX Micro Plasmid Prep Kit der Firma Amersham-Pharmacia verwendet. Jeweils 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz wurden mit einzelnen Bakterienkolonien überimpft und ÜN bei 37 °C inkubiert. 2 ml der Bakterienlösung wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen pelletiert und das Pellet anschließend in 300 µl Lösung I resuspendiert. Zur alkalischen Lyse wurden 300 µl von Lösung II zugegeben und danach SDS, chromosomale DNA und Proteinbestandteile durch Zugabe von Lösung III ausgefällt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge 5415C wurde der Überstand in Glasfibrermatrixsäulchen des GFX Micro Plasmid Prep Kits überführt. Danach wurden die Säulchen für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert und anschließend 400 µl Waschpuffer zugegeben und eine weitere Minute zentrifugiert. Zur Elution der an die Säulchen gebundenen Plasmid-DNA wurden 100 µl H₂O bidest. auf die Säulchen gegeben, eine Minute bei RT inkubiert und anschließend eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Für den analytischen Restriktionsverdau wurden in der Regel 5 µl der DNA-Präparation eingesetzt.

2.3.2 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien im quantitativen Maßstab (Maxipräparation)

Resuspensions-Puffer (P1)	50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Lyse-Puffer (P2)	1% (w/v) SDS 200 mM NaOH
Neutralisationspuffer (P3)	3M KOAc (pH 5,5) mit Eisessig
Equilibrierungspuffer (QBT)	750 mM NaCl 50 mM MOPS 15 % (v/v) EtOH 0,15 % (w/v) Triton X-100 pH 7,0
Wasch-Puffer (QC)	1 M NaCl 50 mM MOPS 15 % (v/v) EtOH pH 7,0
Elutionspuffer (QF)	50 mM Tris/HCl (pH 8,5) 1,25 M NaCl 15 % (v/v) EtOH
Ionenaustauschersäulen	QIAGEN-tip 500 (QIAGEN, Hilden)

Zur Isolierung von bis zu 500 µg Plasmid-DNA wurden 250 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz mit 5 ml einer ÜN-Kultur eines Bakterienklons angeimpft und ÜN bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden pelletiert (15 min; 6000 rpm; 4 °C; GS-3 Rotor, Sorvall) und anschließend in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Danach wurden 10 ml Puffer P2 zugegeben und nach Mischung 5 min bei RT lysiert. Nach der Neutralisation durch Zugabe von Puffer P3 und 20 min Inkubation auf Eis, wurden SDS, Proteine sowie chromosomale DNA durch Zentrifugation entfernt (30 min; 13000 rpm; 4°C; SS-34 Rotor, Sorvall). Die Ionenaustauschersäulen QIAGEN-tip 500 wurden mit

10 ml Puffer QBT äquilibriert und anschließend der klare Überstand aus der vorherigen Zentrifugation überführt. Nach zweimaligem Waschen der Säulen mit Puffer QC wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert und mit 10,5 ml Isopropanol präzipitiert und 30 min bei 4 °C und 11000 rpm in einem SS-34 Rotor zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und luftgetrocknet und schließlich in 500 µl H₂O bidest. gelöst.

2.3.3 BAC-DNA Isolierung aus Bakterien im analytischen Maßstab (BAC-Minipräparation)

Lösung I	25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Lösung II	0,2 M NaOH 1 % SDS
Lösung III	3M KOAc pH 4,8

Die CMV-BAC-DNA besitzt eine Größe von über 230 kbp. Um die DNA während der Isolation nicht zu scheren oder zu beschädigen wurde während des Präparationsvorgangs starkes Schütteln oder vortexen vermieden. 10 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ÜN bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterienlösung wurde in ein 15 ml-Falconreaktionsgefäß überführt und in der Heraeus-Zentrifuge pelletiert (5 min; 3500 rpm). Anschließend wurde das Pellet in 300 µl Lösung I resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Zur alkalischen Lyse wurden 300 µl Lösung II zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. SDS, chromosomale DNA und Proteinbestandteile wurden durch die Zugabe von 300 µl Lösung III und Inkubation auf Eis für 10 min ausgefällt. Nach Zentrifugation in der Eppendorfzentrifuge 5415C (14000 rpm; 10 min; 4°C) wurde der Überstand (ca. 1ml) vorsichtig abgenommen und mit 1ml Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und für 3 min zentrifugiert. Die DNA der oberen, wässrigen Phase wurde dann durch Zugabe von 1 ml Isopropanol gefällt und anschließend pelletiert (14000 rpm; 15 min; 4 °C). Nach dem Waschen mit 70 % Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst. Zur anschließenden Analyse im Restriktionsverdau wurden in der Regel 45 µl der isolierten DNA eingesetzt.

2.3.4 BAC-DNA-Isolierung aus Bakterien im quantitativen Maßstab (BAC-Maxipräparation)

Nucleobond 500 Kit	Macherey und Nagel
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl
	1 mM EDTA
	pH 8,0

Für die Isolierung de BAC-DNA im quantitaiven Maßstab wurde der Nucleobond-AX Kit der Firma Macherey und Nagel verwendet. 500 ml LB Medium wurden mit ca. 100 µl einer Bakterienvorkultur angeimpft und ÜN bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (6000 rpm; 15 min; GS 3 Rotor) pelletiert. Danach wurde die DNA-Isolierung nach dem speziellen, dem Kit beigelegten Protokoll zur Isolierung von „low-copy“-Plasmiden durchgeführt. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt und anschließend in 200 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch (Spektralphotometer, Beckmann) bestimmt. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen, wobei der Quotient der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorptionskoeffizienten Aufschluss über die Reinheit der DNA liefert. Dieser Quotient liegt im Idealfall zwischen 1,8 und 1,95.

2.4 Klonierung von DNA

2.4.1 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
10 x Spaltpuffer	New England Biolabs, Schwalbach

Die Spaltung von DNA wurde mit handelsüblichen Restriktionsendonukleasen und den vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen durchgeführt. In der Regel wurden die Spaltungen in einem Gesamtvolumen von 40 µl durchgeführt und dabei 1 µg DNA mit mindestens 3 Units des Restriktionsenzymes in den vorgegebenen Puffer für 1-2 Stunden bei der empfohlenen Temperatur inkubiert. Bei Restriktionsverdauen zur Analyse von BAC-DNA wurde 1 µg DNA mit 40 Units des Enzyms übernacht verdaut. Falls erforderlich wurde das Restriktionsenzym hitzeinaktiviert (meist 20 min bei 70 °C).

2.4.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um 5`-terminale Phosphatgruppen von DNA-Enden zu entfernen und somit die Rezirkularisation des Plasmidvektors zu verhindern, wurde die verdaute DNA anschließend mit alkalischer Phosphatase (SAP, „shrimp alkaline phosphatase“, NEB) behandelt. SAP (1 Unit/pmol DNA) wurde direkt zum Restriktionsenzymverdau-Ansatz gegeben und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Vor der Ligation wurde die SAP inaktiviert (20min bei 75 °C).

2.4.3 Behandlung mit Klenow-Polymerase

10 x Klenow-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 50 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT
10 mM dNTP-Stammlösung	2,5 mM dATP 2,5 mM dCTP 2,5 mM dGTP 2,5 mM dTTP (alle Pharmacia/LKB)

Um die Ligation von DNA-Fragmenten mit terminal nicht komplementären Überhängen zu ermöglichen, wurden die DNA-Enden mit Hilfe der Klenow-Polymerase (entspricht der großen Untereinheit der DNA-Polymerase I) zum Doppelstrang ergänzt oder abgedaut.

Für die Reaktion wurden 1 µg DNA in wässriger Lösung mit 1/10 Vol. 10 x Klenow-Puffer, 1/10 Vol. 10 mM dNTP-Stammlösung und 1 Unit Klenow-Polymerase für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Inkubation für 30 min bei 65 °C inaktiviert.

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose	Typ I, Sigma, München
1 x TAE (Elektrophoresepuffer)	40 mM Tris Acetat 1 mM EDTA
1 x TBE (Elektrophoresepuffer BAC-DNA)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 1 mM EDTA, pH 8,3

Ethidiumbromidstammlösung	10 mg/ml in TAE
5 x DNA Probenpuffer	40 % (w/v) Sucrose 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) SDS 1 mM EDTA, pH 8,0
DNA-Längenstandard	1 kb „ladder“, 1 µg/µl (GIBCO/BRL, Eggenstein)

Je nach der zu erwartenden Fragmentgröße wurde die DNA in 0,6-1% (w/v) (bei Bac-DNA immer 0,8% in 1 x TBE-Puffer) Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarose wurde mit einem entsprechenden Volumen 1 x TAE/TBE durch Erhitzen gelöst, auf 56 °C abgekühlt, 1µg/ml Ethidiumbromid aus der Stammlösung zugefügt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit 1 x TAE/TBE überschichtet und mit den mit Probenpuffer versetzten Proben sowie dem Längenstandard beladen. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 5 V/cm für ½ bis 1 Stunde. Für die Auftrennung der besonders großen BAC-DNA wurde eine Spannung von 70 mV für 14 bis 16 Stunden angelegt. Nach der Elektrophorese wurde die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer „Eagle-Eye“ Kamera fotografiert oder DNA-Fragmente isoliert.

2.4.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Gel-Extraktionssystem	GFX™ Purification Kit (Pharmacia)
-----------------------	-----------------------------------

Nach der enzymatischen Spalten der DNA wurde das erhaltene Gemisch aus DNA-Fragmenten in einem 1 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde durch Anfärben mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die gewünschten Banden wurden ausgeschnitten und mit Hilfe des „GFX™ Purification Kit“ (Pharmacia) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Die Konzentration der eluierten DNA wurde anschliessend photometrisch bestimmt, oder auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe des Markers abgeschätzt.

2.4.6 Ligation

DNA-Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 1:4 zwischen Vektor und des zu klonierenden Fragmentes mit Hilfe der T4-DNA-Ligase miteinander verknüpft. Das Gesamtvolumen

der Reaktion betrug 10 μ l, wobei 1 Unit der T4-Ligase (New England Biolabs), 1/10 Vol. des mitgelieferten 10 x Ligationspuffers und die DNA-Fragmente gemischt wurden und ÜN bei 15 °C (glatte Enden) oder 3 Stunden bei RT (überhängende Enden) inkubiert wurden.

2.4.7 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Glycerinlösungen	15% Glycerin (w/v) in H ₂ O
	10% Glycerin (w/v) in H ₂ O

Alle Präparationsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Zur Herstellung der elektrokompetenten Bakterien wurden 400 ml LB-Medium (ggf. mit entsprechenden Antibiotikum versetzt) mit 2 ml einer Vorkultur angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Nach 2 Stunden wurde die OD₆₀₀ der Bakterienkultur gemessen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 wurden die Bakterien für auf Eis gestellt und danach bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min pelletiert. Zur Entfernung der Salze, wurde das Pellet 2 mal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in 200 ml 15% Glycerol resuspendiert und erneut bei 4 °C und 5000 rpm pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 1,5 ml 10% Glycerol resuspendiert und in 60 μ l-Aliquots in Eppendorfreaktionsgefäße abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.4.8 Elektroporation von Bakterien

SOC-Medium	20 g/l Bacto Trypton
	5 g/l Bacto Hefeextrakt
	0,5 g/l NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM Mg ₂ Cl
	20 mM Glucose

Bei der Elektroporation wird die Permeabilität von Plasmamembranen durch kurze elektrische Impulse (10 μ s) hoher Feldstärke (12,5 kV pro cm) erhöht, so dass DNA-Moleküle in die Zelle gelangen können. Vor der Transformation wurden 5 μ l des Ligationsansatzes 45 min gegen H₂O bidest. dialysiert um störende Fremdionen zu entfernen. Anschließend wurde die dialysierte DNA-Lösung zu einem Aliquot der elektrokompetenten Bakterien gegeben und in eine vorgekühlte Transformationsküvette (2mm) überführt und mit 2,5 kV, 400 Ω und 25 μ F perforiert („Easyject Optima“, Equibio). Bei der Transformation von CMV-BAC-DNA in DH10B Bakterien wurde die Transformation bei 200 Ω durchgeführt. Nach sofortiger Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die Bakterien 1 Stunde bei der

permissiven Temperatur zur Ausbildung der entsprechenden Antibiotikaresistenz inkubiert und auf LB-Agar Platten mit Antibiotikazusatz ausgestrichen.

2.5 Analyse von DNA

2.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Oligonukleotide	Metabion, Deutschland
Template	10-100 ng Matrizen-DNA
Polymerase	“Expand High Fidelity PCR System” (Roche, Mannheim)
10 x Reaktionspuffer mit 15 mM MgCl ₂	“Expand High Fidelity PCR System” (Roche, Mannheim)
Desoxynukleotide	je 1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Pharmacia/LKB, Freiburg)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Sequenzen. Dabei wurde die zu amplifizierende DNA in einer Konzentration von 10-100 ng in einem 100 µl Ansatz unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Reaktionsansatz:

10-100 ng	Matrizen-DNA
je 300 nM	Oligonukleotid-Primer
je 200 µM	dNTP-Mix
0,1 Vol.	10 x Reaktionspuffer mit 15 mM MgCl ₂
10 Units	Polymerase
0,1 Vol.	DMSO (falls erforderlich)

Temperaturzyklen:

- einmalig 5 Min bei 94 °C
- 28 sich wiederholende Zyklen mit
 - 30 s bei 94 °C
 - 45 s bei entsprechender Hybridisierungstemperatur
 - 2 min Elongationszeit bei 68 °C
- 6 min bei 68 °C

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit dem Thermocycler T 2400 (Perkin Elmer) durchgeführt. Zur Berechnung der Hybridisierungstemperatur (T_H) eines Primers wurde folgende Formel angewandt:

$$T_H (°C) = 60 + [(G+C) \times 41 / N_{t_{\text{Anzahl}}}] - (600 / N_{t_{\text{Anzahl}}})$$

Hierbei entspricht G+C der Anzahl an Cytosinen und Guanidinen in der Primersequenz und $N_{t_{\text{Anzahl}}}$ der Länge des Oligonukleotid-Primers. Die letztlich gewählte T_H lag 2 °C unter der kleineren T_H der beiden Primer.

Zur Aufreinigung der so amplifizierte DNA wurde der gesamte PCR-Ansatz auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und die erwartete Bande ausgeschnitten und aufgereinigt.

2.6 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

2.6.1 Zellen und Zellkultur

Trypsinlösung (Gibco/BRL)	0,5 g/l Trypsin 0,2 g/l EDTA 0,85 g/l NaCl
DMEM-Medium (Dulbecco`s modified Eagle Medium) supplementiert	2 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycinsulfat 10 % (v/v) FCS bzw. NCS in DMEM

Zellen:

MEF	Murine embryonale Fibroblasten, (Wagner, 2000)
NIH 3T3 (ATCC CRL 1658)	Kontakt-inhibierte, embryonale Zelllinie aus der NIH Swiss-Maus

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Zellen in Kunststoffkulturgefäßen in einem Brutschrank bei 37 °C, 90 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Vermehrung und kontinuierlichen

Kultur wurden konfluente Zellkulturen durch kurzzeitige Behandlung mit geringen Mengen Trypsinlösung von der Kulturschale abgelöst und entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit und ihrer Verwendung zwischen 1:2 und 1:10 verdünnt und in neue Kulturschalen umgesetzt. Die stabil transfizierten Zelllinien NIH 3T3 m06 und NIH 3T3 ΔCT wurden in Gegenwart von 500 µg/ml Geneticinsulfat (G418) kultiviert.

2.6.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieremedium
10 % (v/v) DMSO
40 % (v/v) FCS
in DMEM-Medium

Zum Einfrieren wurden die Zellen durch Trypsinbehandlung von der Zellkulturschale gelöst, bei 300 x g für 5 min zentrifugiert und in einer Konzentration von 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde je 1ml in vorgekühlte CryotubesTM (Nalgene Nunc Ith., Dänemark) überführt, langsam auf -70 °C abgekühlt und nach einigen Tagen zur längerfristigen Lagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zellen wurden in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut und dann langsam 2 bis 3 ml des entsprechenden Mediums zugetropft um das toxische DMSO zu verdünnen. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in einer Kulturschale entsprechender Größe ausgesät.

2.6.3 Herstellung eines MCMV-Virusstocks

Zur Herstellung eines MCMV-Virusstocks wurden 30 % konfluente NIH 3T3-Zellen in 15 bis 30 14,5 cm Zellkulturschalen mit einer m.o.i von 0,1 infiziert. Für das erstmalige Herstellen eines Virusstocks wurden ca. 1,5 ml Virus-Überstand einer 10 cm Zellkulturschale mit infizierten Zellen verwendet. Nach 3-5 Tagen, sobald die Zellen einen kompletten cytopathischen Effekt zeigten, wurde der Zellüberstand geerntet und in einen sterilen 250 ml Zentrifugenbecher überführt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Um Zelltrümmer aus dem Überstand zu entfernen wurde 15 min bei 6000 rpm (Sorvall-Zentrifuge) zentrifugiert und der Überstand in ein neues, steriles Zentrifugengefäß überführt. Zur Pelletierung der Virionen wurde dann 3 Stunden bei 13000 rpm (Sorvall-Zentrifuge) zentrifugiert und das Virionenpellet in 1 bis 2 ml DMEM resuspendiert und in 50 µl Aliquots bei -70 °C gelagert.

2.6.4 Bestimmung des MCMV-Titers durch Endpunkttitration

Zur Titerbestimmung einer MCMV-Suspension wurden 96 well-Kulturplatten mit NIH 3T3-Zellen ausgesät und bis zu 50 % Konfluenz kultiviert. Von der Virussuspension wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-3} bis 10^{-8} angelegt und jeweils 12 wells mit einer Verdünnungsstufe infiziert. Die Kulturen wurden für 5 Tage inkubiert und anschließend die lysierten „wells“ ausgezählt. Mit Hilfe eine Tabelle (entwickelt von Margarita Del Val) konnten so die Titer der jeweiligen Suspension bestimmt werden.

2.6.5 Experimentelle Infektion mit MCMV

Zu 50 % konfluenten NIH 3T3 Zellen wurde eine der gewünschten m.o.i entsprechende Menge an MCMV-Suspension zugegeben. Diese Kulturen wurden für 1 Stunde inkubiert und anschließend das Medium abgenommen, 2 x mit PBS gewaschen und mit neuem Medium inkubiert.

2.7 Radio-Immunpräzipitation

Cys/Meth-freies Medium :	RPMI ohne Cystein und Methionin (Gibco/BRL)
Chase-Medium:	Vollmedium mit 5 mM Methionin
[³⁵ S]-Cystein und MethioninPromix:	L-[³⁵ S]-in vitro Cell labeling mix 14,3 mCi/ml (Amersham, Freiburg)
Lysepuffer:	20 mM Tris pH 7,6 140 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 1% NP-40
Proteaseinhibitor (100 x)	500 µM AEBSF 500 µM EDTA 1 µM E-64 1 µM Leupeptin 1 µg/ml Aprotinin
Protein A-Sepharose	CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) 50 % Suspension, in Waschpuffer B gewaschen

Puffer B: 1 mM Tris pH 7,6
150 mM NaCl
2 mM EDTA
0,2 % NP-40

Puffer C: 1 mM Tris pH 7,6
500 mM NaCl
2 mM EDTA
0,2 % NP-40

Puffer D: 10 mM Tris pH 8,0

Bei Verwendung MCMV infizierter Zellen für die Immunpräzipitation, wurden die Zellen (6 cm Zellkulturschalen) mit einer m.o.i von 1 infiziert und ca. 16 Stunden p. i. metabolisch markiert. Bei stabil transfizierten Zellen wurden 80-90 % konfluente Zellkulturschalen (6 cm) verwendet. Für die metabolische Markierung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und 1 ml „Label“-Medium (RPMI ohne Cys/Met) zugegeben. Zur Metabolisierung des endogenen Cysteins und Methionins wurden die Zellen für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Während dieses Zeitraums wurden die verwendeten Inhibitoren, wie vermerkt, mitinkubiert. Erst dann wurden 200-300µCi [³⁵S]Cys/Met zugegeben und je nach experimentellen Erfordernissen für mehrere Stunden oder nur für 40min („Pulse“) inkubiert und dann für festgelegte Zeiten mit Cys/Met-haltigem Medium weiter inkubiert („Chase“). Nach Beendigung der metabolischen Markierung wurden die Zellen 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Lysepuffer versetzt mit 100 µl Proteaseinhibitor-Cocktail für 10 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 15 min mit 12000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 3 µl Präserum für mindestens 1 Stunde und zweimal 50 µl ProteinA/G-Sepharose bei 4°C in einem Rotor inkubiert, um unspezifische Bindungen zu adsorbieren. Die Inkubation der Lysate mit dem spezifischen Antikörper (Ascites 3-5 µl, Serum 10 µl) erfolgte ebenfalls für mindestens 1 Stunde oder ÜN bei 4°C in einem Rotor. Die Immunkomplexe wurden mit 50 µl ProteinA/G-Sepharose präzipitiert und dreimal mit Puffer B, zweimal mit Puffer C und einmal mit Puffer D gewaschen. Durch Zugabe von 50 µl 1 x SB und kochen bei 95 °C (5 min) wurden die präzipitierten Proteine eluiert und anschließend in der SDS-PAGE aufgetrennt.

2.7.1 Endo H-Verdau

β -ME/SDS für Endo H	0,1 M β -Mercaptoethanol 0,1 % (w/v) SDS
Endo H-Puffer (für 4 Reaktionen)	20 μ l 0,5 M Natriumcitrat, pH 5,5 5 μ l 10 % (w/v) PMSF in Isopropanol 70 μ l H ₂ O 5 μ l Endoglycosidase H (5 mU/ μ l) (Roche Diagnostics, Mannheim)

Für den Verdau von Glykoproteinen mit Endoglycosidase H (Endo H) wurde das Immunpräzipitat in 50 μ l 0,1M β -Mercaptoethanol/1%SDS aufgenommen und für 5min bei 95°C gekocht. Die Hälfte (25 μ l) wurde zu 25 μ l Endo H-Puffer gegeben, der 10 mU Endo H enthielt. Die restlichen 25 μ l Präzipitat wurden zu 25 μ l Puffer ohne Enzym gegeben. Verdaut wurde über Nacht bei 37 °C. Abgestoppt wurde der Verdau durch Zugabe von 16 μ l 4 x SB. Die Proben wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt und dann mittels 10-13 %iger SDS-PAGE aufgetrennt.

2.7.2 Behandlung mit Proteinase K (Prot K)

Zell-Puffer	140 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 20 mM Tris pH 7,6
-------------	--

Konfluente Zellen wurden wie beschrieben radioaktiv markiert und mit 0,1 mM EDTA von der Kulturschale abgelöst und durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen und dann in Zellpuffer aufgenommen. Die Zellen wurden mit einem Zellhomogenisator (EMBL, Heidelberg) auf Eis homogenisiert und die Plasmamembran und Zellkerne durch Zentrifugation bei 4000 x g entfernt. Jeweils gleiche Probenmengen wurden für 30 min mit 200 μ g/ml ProtK, oder 200 μ g/ml ProtK+ 1% NP-40 oder ohne inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF (1%) abgestoppt und einem Protease Inhibitor Cocktail (Biomol) abgestoppt. Zur Lyse wurde 1% NP-40 zugefügt und anschließend entsprechende Proteine aus dem Lysat präzipitiert. Zum Prot K Verdau isolierter Mikrosomen, wurde anstelle von 2 μ g/ml Prot K verwendet.

2.7.3 SDS-PAGE

Acrylamid-Lösung	29,2 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid
4 x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
4 x Trenngelpuffer	2 M Tris/HCl (pH 8,8)
SDS-Lösung	20 % (w/v) SDS in H ₂ O
Sucrose-Lösung	60 % (w/v) Sucrose in H ₂ O
APS-Lösung	10 % (w/v) APS (Ammoniumpersulfat) in H ₂ O
N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	(Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden)
1 x SDS-Probenpuffer	200 mM Tris/HCl (pH 8,8) 34 % (w/v) Sucrose 5 mM EDTA 0,01 % (w/v) Bromphenolblau 3,07 % (w/v) SDS (frisch zugesetzt) 38,5 mM DTT (frisch zugesetzt)
4 x SDS-Probenpuffer	800 mM Tris/HCl (pH 8,8) 40 % (w/v) Sucrose 20 mM EDTA 0,04 % (w/v) Bromphenolblau 12,28 % (w/v) SDS (frisch zugesetzt) 154 mM DTT (frisch zugesetzt)
Elektrophoresepuffer	50 mM Tris 0,4 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS (frisch zugesetzt)

Molekulargewichtsmarker	[¹⁴ C]-methylierte Proteine (14,3 kDa - 200 kDa) 0,37-3,7 Mbq/mg (10 -100 µCi/mg) Protein 1,85 kBq/ml (5 µCi/ml) (Amersham, Freiburg)
-------------------------	---

Fixierlösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure in H ₂ O
--------------	---

Für die Auftrennung der Proteine wurden aus einer gebrauchsfertigen, gasstabilisierten, wäßrigen Acrylamidstammlösung mit Bisacrylamid 10-13 %ige denaturierende Polyacrylamidgele (SDS-PAGE) mit Hilfe eines LKB-Gradientenmischers gegossen. Alle Gele wurden mit 4 x Lower-Tris pH 8,8 im Trenngel und 4 x Upper-Tris pH 6,8 im Sammelgel mit je 0,1 % SDS hergestellt. Nach der vollständigen Polymerisation des Tren- und des Sammelgels, wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Proteinproben wurden in maximal 50 µl 1 x SB (SDS-Probenpuffer) aufgenommen oder mit ¼ Volumen 4 x SB versetzt und vor dem Auftragen für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte ÜN bei einer konstanten Stromstärke von 20 bis 25 mA. Nach dem Lauf wurden die Gele für 1 Stunde auf dem Taumler fixiert, und anschliessend 2 Stunden bei 80 °C unter Vakuum auf einem Geltdrockner getrocknet. Das getrocknete Gel wurde ÜN oder für mehrere Tage gegen einen Röntgenfilm exponiert, der dann in einer Entwicklermaschine entwickelt und fixiert wurde.

2.8 Western Blot

Blotting-Puffer	25 mM Tris 190 mM Glycin 20 % Methanol
TBST	150 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 0,02 % Tween 20

Detektions-Kit	ECL ^{PLUS} Western-Blot Detection System (Amersham Buchler, Braunschweig) Western-Blue (Bio-Rad, Richmond, USA)
----------------	--

Für den Western Blot wurde das Lysat von ca. 2×10^5 eukaryontischen Zellen bzw. entsprechende Mengen der isolierten Mikrosomen eingesetzt und in einer 12 % SDS-PAGE in Minigel-System (Bio-Rad, Richmond, USA) aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde zum Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Hybond-P: PVDF-Membran (Amersham Life Science) das Gel auf die mit Methanol aktivierte und mit Blotting-Puffer äquilibrierte Membran gelegt und darunter und darüber wurden 3 Lagen Whatman-Papier (mit Blotting-Puffer befeuchtet) geschichtet. Das Blotting erfolgte mittels einer „Semidry-Blotting“-Apparatur (BioRad, Richmond, USA), bei der das Gel/Membran-Sandwich zwischen zwei Graphit-Platten, für 30 min (18 V, 2 A) geblottet wurde. Für die immunologische Detektion wurde die PVDF-Membran mit 5% Magermilchpulver/TBST für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Der erste Antikörper wurde in TBST mindestens 1 Stunde oder über Nacht zugegeben. Nach 8 maligem Waschen (je 10 min) mit TBST wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Bei der Detektion der Proteine über Chemilumineszenz (ECL^{Plus}, Amersham Buchler, Braunschweig) wurde ein Peroxidase-konjugierter sekundärer Antikörper (1:7500 in TBST) eingesetzt. Für den Nachweis mittels Farbreaktion wurde ein mit Alkalischer Phosphatase-konjugierter Antikörper (1:3000 in TBST) verwendet. Nach 60 min Inkubation wurde der Blot 8 x für 10 min mit TBST gewaschen. Die Chemilumineszenzreaktion wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Nach 1 min Inkubationszeit wurde die Membran zwischen zwei Plastikfolien gelegt, das überschüssige Reagenz entfernt und für 30 s bis maximal 1h ein Röntgenfilm exponiert. Der Film wurde in einer Entwicklermaschine (Amersham) entwickelt. Bei der Verwendung eines Alkalische Phosphatase-konjugierten sekundären Antikörpers erfolgte die Farbreaktion mittels Western Blue (Bio-Rad, Richmond, USA) nach dem Protokoll des Herstellers. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Waschen des Blots in H₂O abgestoppt. Anschließend wurde die Folie luftgetrocknet.

2.9 Konfokale Laserscanmikroskopie

PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,5
-----	--

Fixierungslösung	3 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS (frisch angesetzt oder aufgetaut)
Quench-Lösung	50 mM NH ₄ Cl 20 mM Glycin in PBS
Permeabilisierungs-Puffer	0,1 % (w/v) Triton X-100 in PBS
Blocking-Puffer	0,2% Teleostier-Gelatine (Sigma, München) in PBS
Eindeckmittel	Histosafe (Camon, Wiesbaden)

Um die intrazelluläre Lokalisation von gp48 unter Einfluss verschiedener Inhibitoren zu präzisieren wurden Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt und am konfokalen Laserscanmikroskop untersucht. Hierfür wurden *m06*-Transfektanten auf Deckgläser umgesetzt und über Nacht inkubiert, damit die Zellen auf den Plättchen adhären. Die entsprechenden Inhibitoren wurden für sechs Stunden zugegeben. Die Zellen wurden anschließend fünfmal mit PBS gewaschen und danach für 20 min mit 3 % Paraformaldehyd/PBS fixiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 10 min mit einer Ammoniumchlorid/Glycin-Lösung gequenchet. Die Zellen wurden fünfmal mit PBS gewaschen und anschließend 10 min in 0,2 % Triton X-100/PBS permeabilisiert. Die Zellen wurden fünfmal mit PBS gewaschen, 10 min mit Teleostier-Gelatine stabilisiert und schließlich für 45 min mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurde der FITC- bzw. Texas Red-konjugierte sekundäre Antikörper in einer 1:50 bis 1:100 Verdünnung in 0,2 % Gelatine/PBS für 30min im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurden die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen, mit „Histosafe“ (Cammon) auf einem Objektträger eingebettet und am Laserscanmikroskop (Leica) untersucht.

2.10 Herstellung von Mikrosomen

Zellpuffer	0,5 M Sucrose 10 mM Tris pH 7,4 5 mM EDTA
Sucroselösungen	2,5; 1,2; 1,0 und 0,5 M Sucrose in 10 mM Tris, pH 7,4

Für die Isolation mikrosomaler Membranen aus ER und Golgi wurden $0,9-1,8 \times 10^8$ Zellen mit einem Zellkratzer geerntet und in Zellpuffer überführt. Die Zellen wurden dann auf Eis mit einem Zellhomogenisator (EMBL, Heidelberg) homogenisiert. Um nicht zerstörte Zellen, Kerne und große Zellpartikel zu entfernen, wurde das Homogenisat für 10 min bei $4000 \times g$ zentrifugiert. Für die Präparation von Mikrosomen im „flow up“ Gradienten wurde der Sucrosegehalt des Homogenisats mit einer 2,5 M Sucroselösung auf einen Sucrosegehalt von 1,2 M eingestellt. Die Gradienten wurden in einem SW41 Rotor (Beckmann) durchgeführt und das Homogenisat je nach Präparationsmethode mit Sucroselösungen von 1,2 bis 0,5 M überschichtet („flow up“) oder auf einen solchen Gradienten aufgebracht („flow down“). Die Proben wurden für 2 h bei $100000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Die angereicherte Golgi-Fraktion war als milchige Bande bei 0,8 M Sucrose zuerkennen, angereichertes ER bei 1,05 M Sucrose. Die Fraktionen wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig aus dem Gradienten abgezogen und als Aliquots bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Dieses Protokoll ist eine Adaption an bereits bekannte Protokolle zur Anreicherung des ER (Tabas and Kornfeld, 1979).

2.10.1 In vitro Versuche mit ATP bzw. ATP-regenerierendem System

ATP regenerierendes System (50 x)	50 mM ATP
	2,5 mM GDP-Mannose
	2 mM Creatin-Phosphat
	10 mg/ml Creatin-Phosphokinase

Die *in vitro* Versuche zur Degradation wurden in insgesamt 50 μl Ansätzen durchgeführt. 25 μl Mikrosomen wurden mit der entsprechenden Menge ATP regenerierendes System versetzt und Proteasom oder entsprechende Inhibitoren zugesetzt. Als Puffer diente 10 mM TEA. Alternativ zu dem ATP regenerierenden System wurde alle 30 min ATP (1 mM Endkonzentration in TEA) zugegeben. Die Proben wurden über die angegebenen Zeiträume bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

3 Ergebnisse

3.1 Das Schicksal von gp48 in stabil transfizierten Zelllinien

Gp48 ist ein nicht-essentielles Glykoprotein, das vom MCMV Gen *m06* kodiert wird. Dieses virale Protein bindet MHC Klasse I-Moleküle, um diesen Komplex zur Degradation in die Lysosomen umzuleiten (Reusch et al., 1999). Die Degradation des gp48/MHC Klasse I-Komplexes kann durch lysosomale Inhibitoren wie das lysosomotrope Amin NH_4Cl oder den Serin/Cystein Proteaseinhibitor Leupeptin verhindert werden. Der Einsatz dieser Inhibitoren resultiert in der Anreicherung von Komplexen aus MHC Klasse I-Molekülen und gp48-Molekülen, die gegen die Behandlung mit Endoglykosidase H resistent sind (Hengel et al., 1999; Reusch et al., 1999; Reusch, 2000). Endoglykosidase H (Endo H) bewirkt die hydrolytische Abspaltung mannose-reicher Oligosaccharidketten von Glykoproteinen, die sich im sekretorischen Transportweg im ER oder ER cis-Golgi „intermediate“ Kompartiment (ERGIC) vor dem medialen Golgi befinden (Tarentino and Plummer, 1994). Resistente Moleküle haben im Transportweg den medialen Golgi schon hinter sich gelassen. Im Gegensatz zu den lysosomalen Inhibitoren können in Gegenwart des proteasomenspezifischen Inhibitors Lactacystin (Fenteany et al., 1994) keine MHC Klasse I-Moleküle stabilisiert werden, was mit dem Ergebnis einhergeht, dass der gp48/MHC Klasse I-Komplex in den Lysosomen degradiert wird. Interessanterweise kann durch den Einsatz von Lactacystin eine Endo H-sensitive Subfraktion von gp48 stabilisiert werden. Der Befund, dass proteasomale Inhibitoren die Degradation einer Endo H-sensitiven gp48-Fraktion, nicht aber die von MHC Klasse I-Molekülen hemmen können, deutet an, dass nicht komplexierte gp48-Moleküle vor dem medialen Golgi zurückgehalten und proteasomen-abhängig degradiert werden. Um diese Hypothese weiter zu überprüfen, wurde die humane Colonicarcinomzelllinie DLD-1, die kein β_2 -Mikroglobulin ($\beta_2\text{m}$)-Protein exprimiert und dadurch keinen Bindungspartner für gp48 zur Verfügung stellt, verwendet. DLD-1 Zellen wurden mit dem Vektor B45 oder mit *m06* in B45 stabil transfiziert und in „pulse-chase“-Experimenten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach einer „chase“-Periode von 6 h die gp48 Moleküle zum größten Teil abgebaut worden waren. Eine Behandlung der Zellen mit endosomalen bzw. lysosomalen Inhibitoren konnte diesen Abbau nicht verhindern. Proteasomenspezifische Inhibitoren wie Lactacystin und ZL₃H (MG132) schützten jedoch einen Großteil der gp48 Moleküle vor dem Abbau, so dass nach 6 h eine Endo H-sensitiv Fraktion von gp48 stabilisiert worden war (Reusch, 2000).

Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass gp48, welches nicht an MHC Klasse I-Moleküle bindet, im ER zurückgehalten wird und im Cytosol durch das Proteasom abgebaut wird. Dieser Abbauprozess steht offensichtlich nicht im Zusammenhang mit der MHC Klasse I-spezifischen Funktion von gp48

und wurde in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht, um Einblicke in die bisher nicht im Detail verstandene ER-assoziierte Degradation viraler Glykoproteine zu gewinnen.

Vorversuche zeigten, dass gp48, welches nicht an MHC Klasse I-Moleküle bindet, abhängig von einem funktionsfähigen Proteasom degradiert wird.

3.2 Vergleich des polyklonalen Kaninchen-Antiserums m06-2 und des monoklonalen Mausantikörpers CROMA229

Um das Schicksal von freiem gp48 weiter zu untersuchen, wurden stabil transfizierte NIH 3T3-Zellen verwendet (zur Verfügung gestellt von Uwe Reusch). Zum Nachweis von *m06/gp48* wurden zwei verschiedene immunologische Reagenzien verglichen, um eventuell vorhandene Unterschiede in den Präzipitationseigenschaften zu analysieren. Dabei handelt es sich zum einen um CROMA229, einen monoklonalen Mausantikörper, der vor allem für die Studien über das Schicksal von MHC Klasse I-gebundenem gp48 verwendet wurde und der den C-terminalen Bereich des Proteins bindet (Reusch et al., 1999)(Abb. 5A, graue Box). Das polyklonale Kaninchenantiserum m06-2 ist gegen ein Peptid gerichtet, welches sich im luminalen Teil des Proteins befindet (Abb. 5A, gestreifte Box).

Die Präzipitation von gp48 aus metabolisch radioaktiv markierten Zellen mit verschiedenen Antikörpern zeigte, dass CROMA229 und das Antiserum m06-2 in der Lage sind, zwischen verschiedenen Subpopulationen von gp48 zu unterscheiden (Abb. 5B). CROMA229 präzipitierte sowohl den Komplex aus gp48 mit einem Molekulargewicht von 48 kDa und der MHC Klasse I schweren Kette sowie der leichten Kette (β_2m), als auch freies gp48. Die Behandlung mit Endo H ergab eine Veränderung der elektrophoretischen Mobilität von gp48 und auch der MHC Klasse I-schweren Kette. Endo H-sensitives gp48 lief nach dem Verdau bei ca. 35 kDa, die MHC Klasse I-schwere Kette bei ca. 40 kDa. Im Gegensatz zu CROMA229 präzipitierte das Antiserum m06-2 nur freies, Endo H-sensitives gp48, was sich durch das Fehlen kopräzipitierender MHC Klasse I-schwerer und -leichter Kette äußert. Diese Tatsache ermöglicht es, mit dem Antiserum m06-2 selektiv das Schicksal von nicht assembliertem gp48 in stabil transfizierten Zelllinien zu verfolgen.

Das Antiserum m06-2 erkennt ausschließlich gp48, welches nicht mit MHC Klasse I-Molekülen assembliert ist, und ermöglicht das selektive Studium dieser Subpopulation des viralen Proteins.

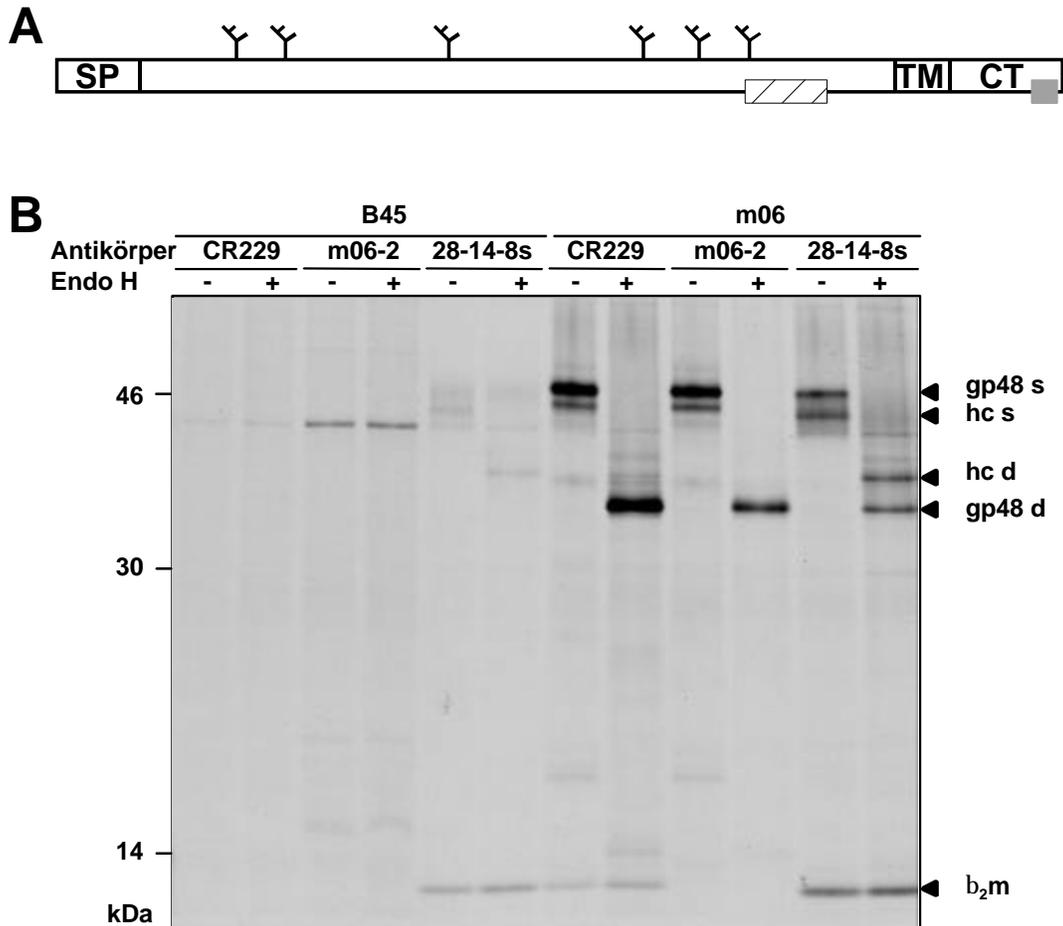


Abb. 5: Vergleich zwischen dem monoklonalen Antikörper CROMA229 und dem polyklonalen Antiserum m06-2

A Schematische Darstellung von MCMV *m06/gp48*

Dargestellt ist das Signalpeptid (SP), die luminale Domäne mit den Konsensussequenzen für die N-verbundene Glykosylierung (verzweigte Symbole), die Transmembranregion (TM) und der cytoplasmatische Anteil (CT). Die gestreifte Box zeigt die Peptidsequenz, die für die Herstellung des Antiserums m06-2 verwendet wurde. Die graue Box markiert die Bindungsstelle des monoklonalen Antikörpers CROMA229 (CR229).

B Vergleich der Proteinpräzipitate des Antikörpers CROMA229 und des Antiserums m06-2.

NIH 3T3-Zellen, die stabil mit dem MCMV Gen *m06* oder mit dem Vektor alleine (B45) transfiziert worden waren, wurden für 40 min radioaktiv markiert und anschließend lysiert. Gp48 wurde entweder mit CROMA229 oder mit m06-2 präzipitiert, H-2 L^q Moleküle wurden mit dem Mausantikörper 28-14-8s präzipitiert. Danach wurden die so gewonnenen Präzipitate mit Endo H oder ohne für 24 h verdaut und in einer SDS-PAGE analysiert. hc, MHC Klasse I schwere Kette; s Endo H-sensitiv; d, Endo H-verdaut.

3.3 Untersuchung der Abbaukinetik von gp48 unter Einfluss des spezifischen proteasomalen Inhibitors Lactacystin

Das Schicksal von freiem gp48 wurde in einem „pulse-chase“-Experiment untersucht. Dabei wurden stabil transfizierte NIH 3T3-Zellen metabolisch radioaktiv markiert und anschließend zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Aus diesen Lysaten wurde gp48 mit dem Antiserum m06-2 präzipitiert (Abb. 6A). Parallel wurden Zellen mit dem spezifischen proteasomalen Inhibitor Lactacystin behandelt, der durch irreversible Bindung an das katalytische Zentrum des Proteasoms die Hemmung der Proteaseaktivität des Multienzymkomplexes herbeiführt. Nach der Präzipitation fanden sich drei spezifische Banden mit einem apparentem Molekulargewicht von 48, 46 und 44 kDa, die wahrscheinlich verschiedene Glykosylierungsformen von gp48 repräsentieren. Die Behandlung mit Lactacystin verdoppelte die Halbwertszeit von gp48. In Gegenwart von funktionsfähigem Proteasom besaß das freie gp48 eine Halbwertszeit von ungefähr 90 min, was auf eine langsame Degradation durch das Proteasom schließen lässt. Bei einer Behandlung der Zellen mit Lactacystin wurde die Halbwertszeit auf 3 h verlängert (Abb. 6B).

Neben den drei dominanten Proteinspezies, die höchstwahrscheinlich verschiedene Glykosylierungsformen von gp48 repräsentieren, fanden sich nach 2 h Inkubation unter Einfluss von Lactacystin noch 2 weitere Banden. Eine dieser Banden war auf der Höhe von ca. 35 kDa und könnte somit die deglykosylierte Form von gp48 darstellen. Die andere Form befand sich bei ca. 20 kDa. Um weiteren Aufschluss über die unterschiedlichen Formen von gp48 und ihre Lokalisation während der Inhibition durch Lactacystin zu bekommen, wurde ein „pulse-chase“-Experiment, mit anschließendem Endoglykosidase H-Verdau durchgeführt. Wie bereits erwähnt, ermöglicht es die Analyse von Glykoproteinen mit Endo H, eine Aussage über den Glykosylierungszustand und die Lokalisation eines Glykoproteins zu treffen. Dieses Experiment bestätigte, dass es sich bei den durch Lactacystin stabilisierten gp48 Molekülen um Endo H-sensitive Formen handelt (Abb. 6C). Nach der Behandlung mit Endo H verringerte sich das Molekulargewicht von gp48 von 48 auf 35 kDa. Weiterhin zeigte dieses Experiment, dass es sich bei dem unter Lactacystin auftretenden 35 kDa großen Protein tatsächlich um die deglykosylierte Form von gp48 handelt, da es sich auf exakt der gleichen Höhe befand wie das deglykosylierte gp48 nach Endo H-Behandlung. Die 20 kDa große Form von gp48 war nicht glykosyliert, denn auch nach Behandlung mit Endo H ließ sich keine Veränderung im Laufverhalten feststellen. Beide Intermediate traten nur in Gegenwart der hier und Versuch 9B verwendeten niedrigen Lactacystinkonzentration von 2 μ M auf und lassen auf eine nicht vollständige Inhibition des Proteasoms schließen. In allen weiteren Versuchen wurde die Inhibitorkonzentration verdoppelt, was zum Verschwinden der Intermediate führte. Allerdings bleibt hier zu bedenken, dass Lactacystin in sehr hohen Konzentrationen auch andere zelluläre Proteasen beeinflusst (Kozłowski et al., 2001)

Die Behandlung mit Lactacystin verdoppelt die Halbwertszeit von freiem gp48 und führt zur Stabilisierung einer Endo H-sensitiven Form.

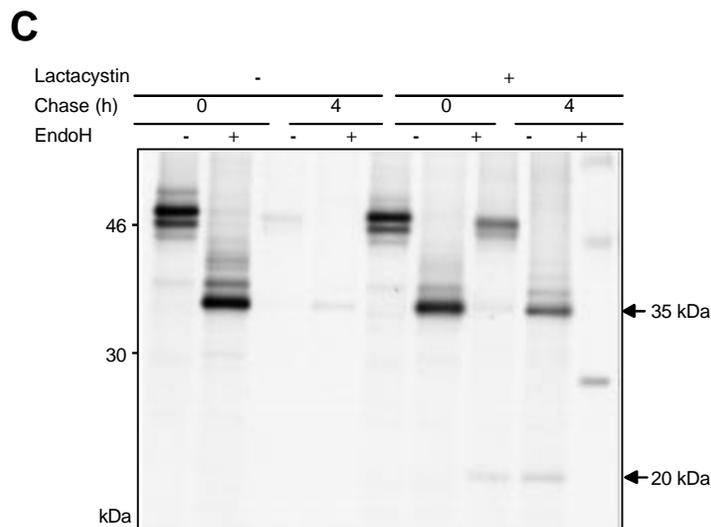
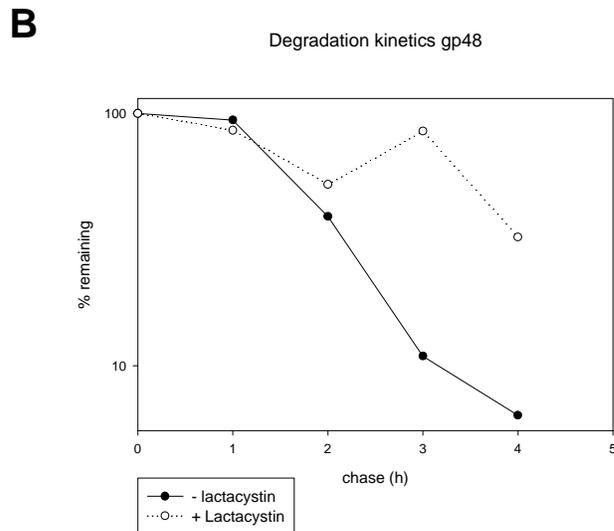
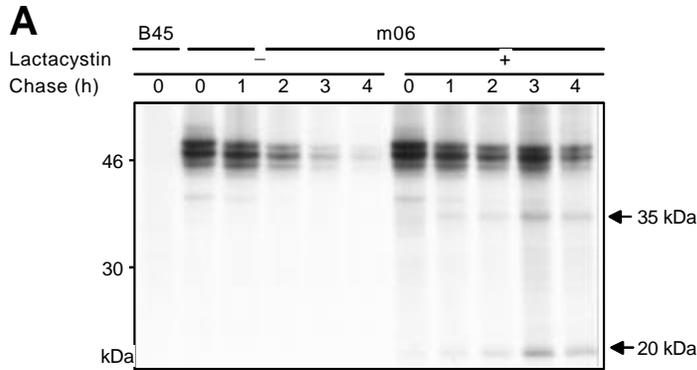


Abb. 6: Degradations-kinetik von m06/gp48

A "Pulse-Chase"- Kinetik in NIH 3T3 m06.

NIH 3T3-Zellen, die stabil mit *m06/gp48* oder dem Vektor alleine transfiziert worden waren, wurden radioaktiv markiert und für die angegebenen Zeiträume in Gegenwart von Lactacystin oder ohne inkubiert. Gp48 wurde mit m06-2 Serum aus NP-40-Lysaten präzipitiert. Anschließend wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt.

B Quantifizierung der Banden aus A

Die Bandenstärken wurden durch densitometrische Messungen quantifiziert. In der Darstellung wurde der Nullstundenwert als 100% definiert und die restlichen Werte als prozentualer Anteil davon gezeigt.

C Endo H Verdau

NIH 3T3 Zellen, die stabil *m06/gp48* exprimieren, wurden radioaktiv markiert und über die angegebenen Zeiträume inkubiert und dann lysiert, schließlich mit dem Antiserum m06-2 präzipitiert. Anschließend wurden die erhaltenen Präzipitate aufgeteilt, für 12 h mit oder ohne Endo H behandelt und dann über SDS-PAGE analysiert.

3.4 Wirkung verschiedener proteasomaler Inhibitoren auf gp48

Neben Lactacystin gibt es noch weitere mehr oder weniger spezifische Inhibitoren des Proteasoms. Um Lactacystin-spezifische Effekte auszuschließen, wurde die Wirkung anderer proteasomaler Inhibitoren auf freies gp48 in einem „pulse-chase“-Experiment getestet. Zum einen wurde der weniger spezifische Caspase I-Inhibitor ALLN verwendet, sowie der spezifische Peptidinhibitor ZL₃H (MG132) und zum Vergleich der lysosomale und endosomale Inhibitor Leupeptin (Abb. 7). Die mit den verschiedenen Inhibitoren behandelten Zellen wurden lysiert und freies gp48 mit dem Antiserum m06-2 präzipitiert. Dieses Experiment zeigt, dass die Anreicherung von Endo H-sensitivem gp48 nach Inhibition des Proteasoms nicht von dem verwendeten Inhibitor abhing. Während nach einer Inkubationszeit von 4h ohne Inhibitor oder bei Zugabe von Leupeptin kaum mehr freies gp48 vorhanden war, wurden bei Zugabe von Lactacystin, ALLN oder MG-132 vergleichbare Mengen von Endo H-sensitivem gp48 stabilisiert. Dies zeigt, dass freies gp48 tatsächlich durch das Proteasom abgebaut wird und die beobachteten Effekt nicht auf Artefakte bestimmter Inhibitoren zurückzuführen sind.

Verschiedene proteasomale Inhibitoren stabilisieren freies gp48 und führen zu dem Schluss, dass das Proteasom für die Degradation von freiem gp48 verantwortlich ist.

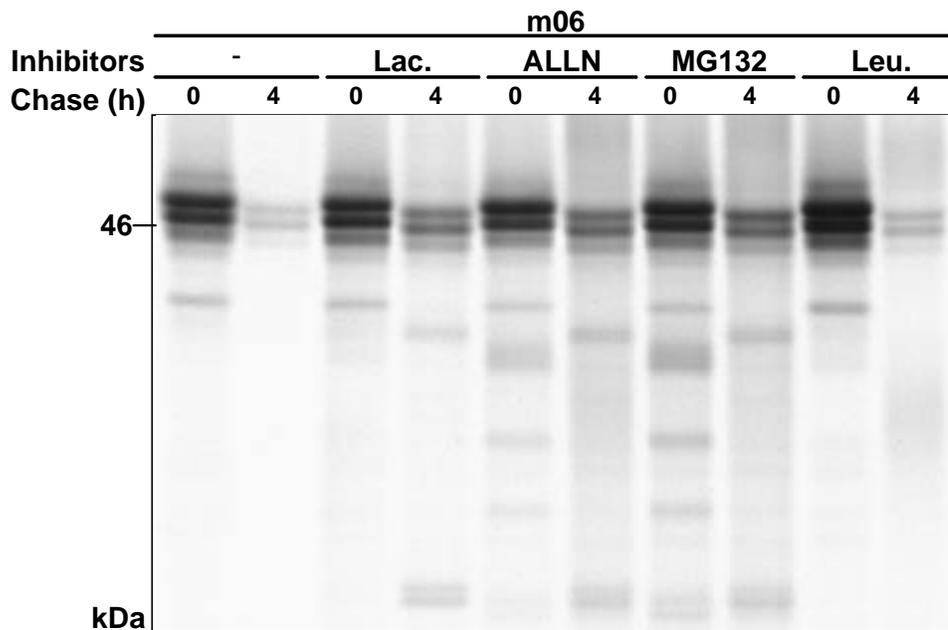


Abb. 7: Vergleich verschiedener Inhibitoren zur Stabilisation von gp48

NIH 3T3 Zellen, die mit *m06/gp48* stabil transfiziert worden waren, wurden mit verschiedenen Inhibitoren für eine Stunde vorinkubiert. Dabei wurde der lysosomale Inhibitor Leupeptin mit einer Endkonzentration von 200 μM , eingesetzt. ALLN (100 μM), Lactacystin (4 μM) und MG-132 (20 μM) wurden als proteasomalen Inhibitoren verwendet. Anschließend wurden die Zellen radioaktiv markiert und für weitere 4 h inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert und gp48 mit dem Antiserum m06-2 präzipitiert. Die Proben wurden dann in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

3.5 Stabilisation von freiem gp48 in einem Prä-Golgi-Kompartiment in einer membranassoziierten Form

Das gängige Modell für die ER-assoziierte Degradation geht davon aus, dass Proteine, die für die Degradation durch das Proteasom bestimmt sind, zuerst vom ER in das Cytosol transportiert werden. Dabei erfolgt die Deglykosylierung und schließlich die Degradation der Proteine durch das Proteasom (Hughes et al., 1997; Wiertz et al., 1996b; Wiertz et al., 1996a). Eine Inhibition des Proteasoms führt zur Akkumulation deglykosylierter Proteine im Cytosol. Da der Großteil von gp48 aber in einer Endo H-sensitiven, glykosylierten Form stabilisiert wird, stellt sich die Frage, ob auch das virale Glykoprotein in Gegenwart eines funktionsunfähigen Proteasoms aus dem ER transportiert wird. Um zu überprüfen, ob durch Lactacystin stabilisiertes gp48 immer noch mit der ER-Membran assoziiert ist, wurden *m06*-exprimierende Zellen nach einem „pulse-chase“ Experiment in eine Membranfraktion und eine löslich Fraktion unterteilt (Abb. 8A). Nach 4 stündigem „chase“ in Gegenwart von Lactacystin konnte *m06/gp48* ausschließlich in einer Endo H-sensitiven Form in der Membranfraktion detektiert werden. Dagegen fand sich gp48 weder direkt nach dem „Pulse“ noch nach dem „Chase“ in der solublen Fraktion.

Die Tatsache, dass gp48 in der Membranfraktion stabilisiert wurde, ist ein erster Hinweis darauf, dass gp48 in Gegenwart eines nicht funktionsfähigen Proteasoms nicht aus dem ER transportiert wird. Dieses Experiment allein lässt jedoch keine Aussagen über die topologische Orientierung von stabilisiertem, membranassoziiertem gp48 zu. Um zu überprüfen welche topologische Orientierung das virale Protein aufweist, wurden wiederum Zellen homogenisiert und dann einer Proteinase K Behandlung unterzogen. Proteinase K (Prot K) ist eine Protease, die in der Lage ist Polypeptide abzubauen, ohne dabei bestimmte Schnittstellen im Protein zu benutzen. Proteindomänen sind nur dann vor dem Abbau durch Prot K geschützt wenn sie sich entweder in einer Membran befinden oder aber innerhalb eines durch Membranen abgeschlossenen Raumes, z.B. das Lumen des ERs (Abb. 8B). Um die topologische Orientierung von freiem gp48 in Gegenwart von Lactacystin zu ermitteln, wurde metabolisch radioaktiv markiertes Zelllysate aus *m06/gp48* exprimierenden Zellen einer Behandlung mit Prot K unterzogen. Die anschließende Präzipitation von *m06/gp48* mit m06-2-Serum zeigte, dass die Behandlung mit Prot K zu einem Protein führt, dessen elektrophoretische Mobilität sich von gp48 um 3 kDa unterschied (Abb. 8C, Sterne). Dies entspricht exakt der Größe des cytoplasmatischen Anteils von *m06/gp48*. Prot K degradierte also den durch Membranen nicht geschützten cytoplasmatischen Anteil von *m06/gp48*, die

Transmembrandomäne und der luminal Teil blieben jedoch intakt. Auch nach Behandlung mit Lactacystin und 4h Inkubation veränderte sich das Laufverhalten von gp48 bei der Behandlung mit Prot K in der Elektrophorese um exakt 3 kDa. Der luminal Anteil und die Transmembrandomäne waren also wiederum durch den Abbau von Prot K geschützt. Wurden die im Homogenat enthaltenen Membranen durch das Detergenz NP-40 destabilisiert, wurde das gesamte virale Protein durch Prot K degradiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die durch Lactacystin stabilisierten gp48 Moleküle in der ER Membran inseriert sind und nicht wie im Modell der ERAD ins Cytosol transportiert werden und sich dort anreichern. Ohne intaktes Proteasom findet also im Fall von gp48 kein Transport des Substrats aus dem ER statt.

Freies gp48 wird bei Hemmung des Proteasoms in einer membranassoziierten, Endo H-sensitiven Form stabilisiert.

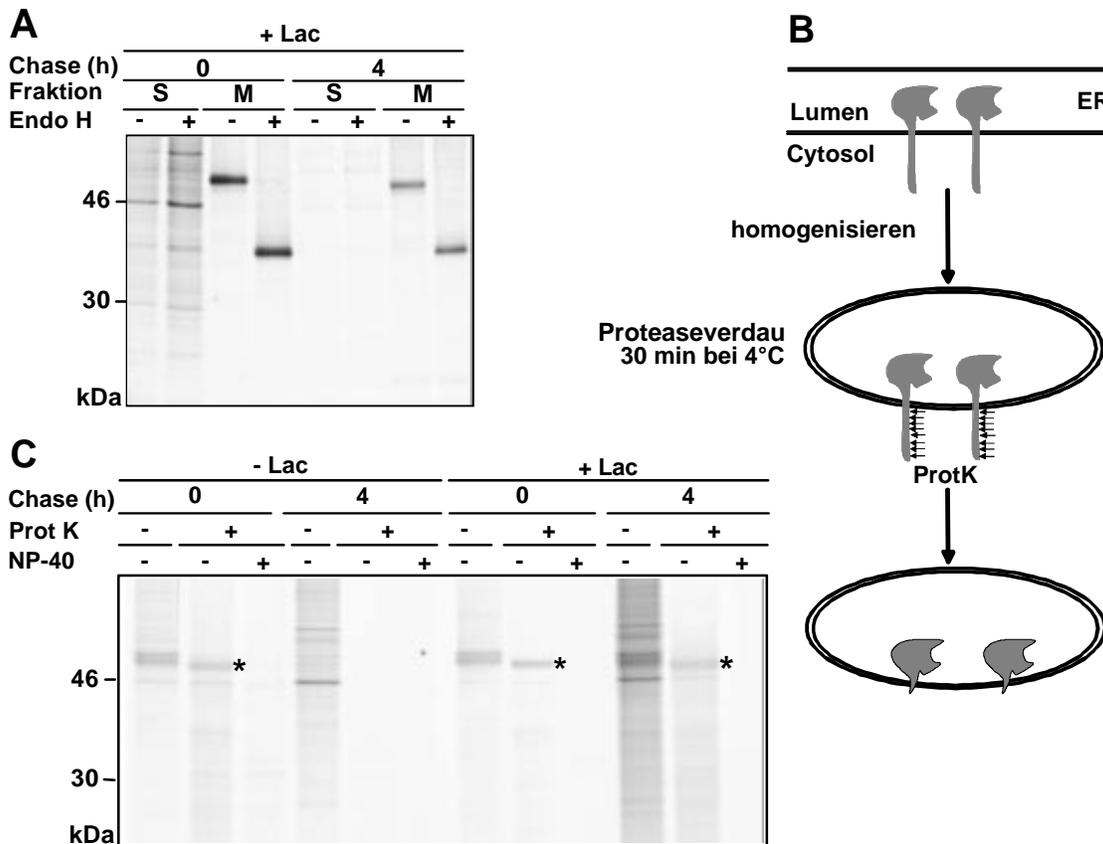


Abb. 8: Gp48 wird in einer Endo H sensitiven Form in der Membranfraktion stabilisiert**A Membranfraktionierung und Lokalisation von gp48**

NIH 3T3 Transfektanten wurden radioaktiv markiert und für 4 Stunden in Gegenwart von Lactacystin inkubiert. Die Zellen wurden homogenisiert und durch Ultrazentrifugation (1 h; 100.000 x g) in eine lösliche (S) und eine Membranfraktion (M) aufgetrennt. gp48 wurde mit dem Antiserum m06-2 präzipitiert und vor der Auftrennung in der SDS-PAGE zum Teil mit Endo H behandelt.

B Prinzip des Prot K-Verdaus

Mit Hilfe des Prot K-Verdaus kann die Positionierung von Transmembranproteinen in der Membran ermittelt werden. Die Zellen werden homogenisiert, was zur Bildung von abgeschlossenen Membrankompartimenten, den sogenannten Mikrosomen, führt. Wird die Protease Prot K zugegeben, so kann diese nur Proteinteile angreifen, die sich außerhalb der Mikrosomen befinden (markiert durch Pfeile). Dies führt dann zu verkürzten Proteinen, falls diese noch membranverankert waren, oder aber zum völligen Abbau des Proteins falls diese aus der Membran transportiert worden waren.

C Prot K Verdau von homogenisierten Zellen

NIH 3T3-Zellen, die gp48 exprimieren, wurden radioaktiv markiert, über die angegebenen Zeiträume inkubiert und anschließend homogenisiert. Die Fraktionen wurden für 30 min bei 4 °C entweder mit 200 µg/ml Prot K oder 200 µg/ml Prot K und 1% NP-40 oder ohne beides inkubiert. gp48 wurde mit dem Antiserum m06-2 präzipitiert.

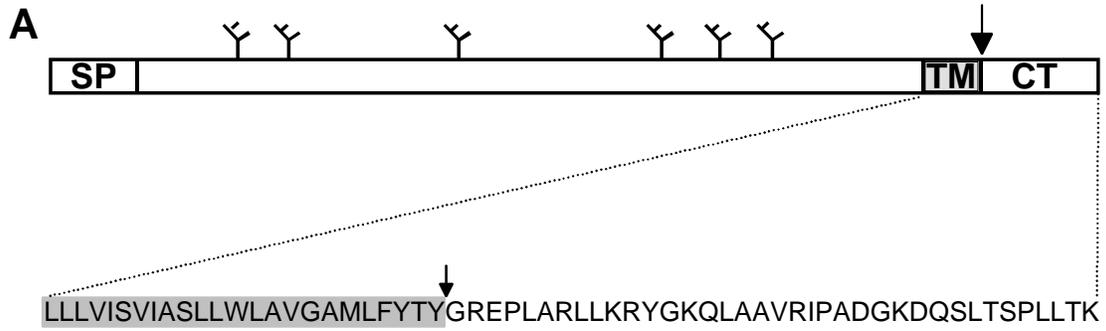
3.6 Abbaukinetik und Membranassoziation der Mutante gp48 Δ CT

Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass der Transport von gp48 in das Cytosol von einem funktionellen Proteasom abhängig ist. Mayer und Kollegen haben gezeigt, dass das Proteasom selbst an der Extraktion eines Sec62 Derivates aus der Lipid-Doppelschicht beteiligt sein kann (Mayer et al., 1998). In diesem Fall konnte eine direkte Interaktion des Proteasoms mit dem cytosolischen Anteil des Substrats beobachtet werden. Um zu testen, ob auch im Fall von *m06/gp48* der cytoplasmatische Anteil des Proteins den Angriffspunkt für das cytosolische Proteasom darstellt, wurde die Mutante gp48 Δ CT verwendet. Bei dieser Mutante wurde der komplette cytoplasmatische Teil des Proteins deletiert, so dass kein potentieller Angriffspunkt für das Proteasom mehr vorhanden ist (Reusch et al., 1999) (Abb. 9A). Diese Mutante kann noch immer MHC Klasse I-Moleküle binden, aber deren Transport zur Zelloberfläche nicht mehr beeinflussen. Mit NIH 3T3-Zellen, die stabil mit dem *m06/gp48 Δ CT*-Konstrukt transfiziert worden waren (bereitgestellt von Uwe Reusch), wurde die Abbaukinetik von gp48 Δ CT mit und ohne Lactacystin verfolgt (Abb. 9B). Nach der Immunpräzipitation mit dem Antiserum m06-2 fanden sich 3 spezifische Proteinbanden mit einem errechneten Molekulargewicht von 45, 43 und 41 kDa, die verschiedene Glykosylierungsformen von gp48 Δ CT zeigen. Die errechneten Molekulargewichte stimmten mit dem Molekulargewicht überein, das von der Mutante erwartet wurde, da der cytoplasmatische Teil von 3 kDa entfernt worden war. Die Halbwertszeit von gp48 Δ CT von 90 min ist vergleichbar mit der des Gesamtproteins (Abb. 9C). Eine Inhibition des Proteasoms durch Lactacystin führte auch bei gp48 Δ CT zu einer Verdoppelung der Halbwertszeit. Dies zeigt deutlich, dass auch freies gp48 Δ CT durch das Proteasom mit einer vergleichbaren Kinetik degradiert wird. Auch hier traten nach 2 h in der Gegenwart von Lactacystin 2 Intermediate bei 32 und 17 kDa auf. Der Endo H-

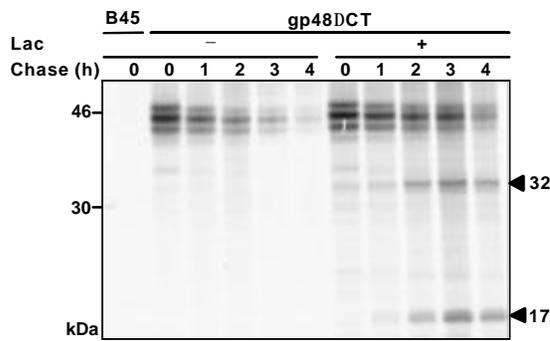
Verdau ergab, dass es sich bei der 32 kDa Form um deglykosyliertes gp48 Δ CT handelte (Abb. 9D). Die kleinere Form zeigte wiederum keine Sensitivität gegenüber der Endo H Behandlung. Da sich die gp48 Δ CT-Intermediärprodukte in ihrer Größe um genau 3 kDa von denen des Gesamtproteins unterscheiden, kann der Schluss gezogen werden, dass es sich hierbei um N-terminale Fragmente des viralen Proteins handelt.

Die Membranfraktionierung resultierte auch für gp48 Δ CT in einer Anreicherung von Proteinen in der Membranfraktion und nicht in der löslichen Fraktion (Abb. 9E). Die Analyse mit Prot K ergab, dass die Mutante gp48 Δ CT in Gegenwart eines nicht funktionellen Proteasoms in der Membran inseriert verbleibt (Abb. 9F). Durch die Zugabe von Prot K zum Homogenat kam es zu keiner Änderung in der elektrophoretischen Mobilität von gp48 Δ CT, da der c-terminale Bereich, der den einzigen Angriffspunkt für Prot K bei korrekt inserierten Proteinen darstellt, nicht mehr vorhanden war. Allerdings resultiert auch hier die Behandlung mit NP-40 und Prot K im vollständigen Abbau des Proteins. Diese Versuche zeigen eindeutig, dass die Mutante gp48 Δ CT ebenfalls durch das Proteasom abgebaut wird und eine dem Gesamtprotein vergleichbare Kinetik aufweist. Daraus kann geschlossen werden, dass der cytosolische Teil von gp48 kein Angriffspunkt für das cytosolische Proteasom ist.

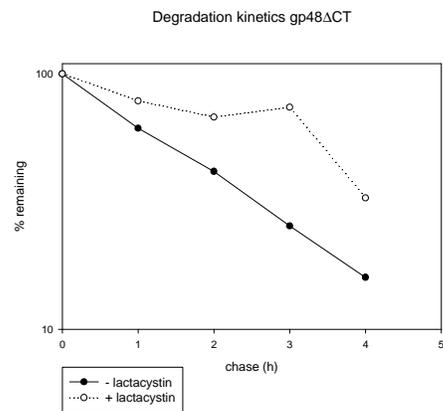
Die Mutante gp48DCT wird durch das Proteasom mit einer dem gp48 vergleichbaren Kinetik degradiert. Lactacystin stabilisiert gp48DCT in einer membranassoziierten, Endo H-sensitiven Form.



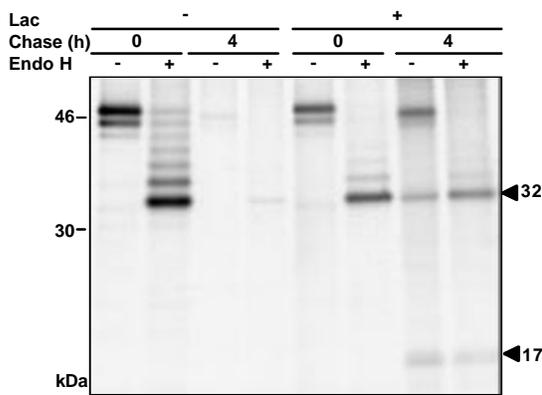
B



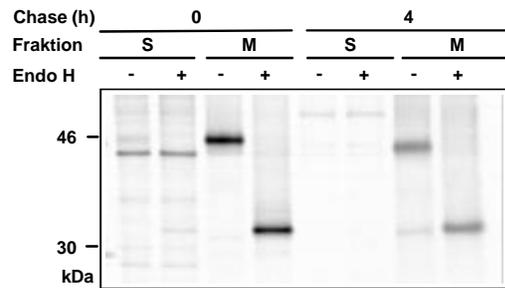
C



D



E



F

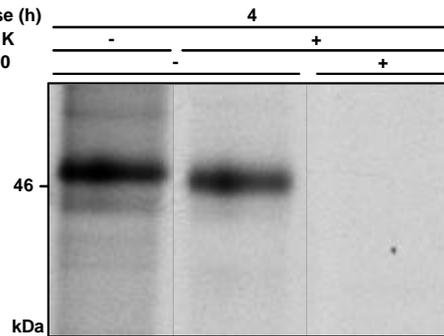


Abb. 9: Analyse der Mutante gp48 Δ CT**A** Schematische Darstellung der Mutante gp48 Δ CT

Aus der schematischen Darstellung von gp48 wurde die Sequenz der Transmembrandomäne (grau) und des cytoplasmatischen Anteils (CT) vergrößert. Der schwarze Pfeil markiert die letzte Aminosäure der Mutante gp48 Δ CT. Details zur Herstellung dieser Mutante wurden bereits von Reusch und Kollegen beschrieben (Reusch et al., 1999; Reusch, 2000).

B „pulse-chase“-Kinetik der Mutante gp48 Δ CT

NIH 3T3 Zellen, die *m06/gp48 Δ CT* stabil exprimieren oder Kontrollzellen mit dem Vektor alleine transfiziert, wurden radioaktiv markiert. Sie wurden dann mit oder ohne Lactacystin über die bezeichneten Zeiträume inkubiert, lysiert und gp48 Δ CT mit dem Antiserum m06-2 präzipitiert. Die Analyse der Proben fand über die SDS-PAGE statt.

C Quantifizierung der Banden aus B

Die Bandenstärken wurden durch densitometrische Messungen quantifiziert. In der Darstellung wurde dann der Nullstundenwert als 100 % definiert und die restlichen Werte als prozentualer Anteil davon angezeigt.

D Endo H Verdau

NIH 3T3-Zellen, die stabil *m06/gp48 Δ CT* exprimierten, wurden radioaktiv markiert, lysiert und mit dem Antiserum m06-2 präzipitiert. Anschließend wurden die erhaltenen Präzipitate aufgeteilt, mit oder ohne Endo H behandelt und dann über SDS-PAGE analysiert.

E Membranfraktionierung

NIH 3T3 *m06/gp48 Δ CT*-Transfektanten wurden radioaktiv markiert und für weitere 4 h in Gegenwart von Lactacystin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen homogenisiert und durch Ultrazentrifugation (100000 x g; 1 h) in eine lösliche (S) und eine Membranfraktion (M) aufgetrennt. gp48 Δ CT wurde mit dem Antiserum m06-2 präzipitiert und vor der Auftrennung in der SDS-PAGE mit oder ohne Endo H behandelt.

F Prot K Verdau der Membranfraktion

NIH 3T3 Zellen, die gp48 Δ CT exprimierten, wurden radioaktiv markiert und anschließend homogenisiert. Die Fraktionen wurden für 30 min bei 4 °C entweder mit Prot K oder Prot K und NP-40 oder ohne beides inkubiert. gp48 Δ CT wurde mit dem Antiserum m06-2 präzipitiert und die Proben mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt.

3.7 Die Rolle der Ubiquitinierung bei der proteasomalen Degradation von gp48

Die Ubiquitinierung freier Aminogruppen von Lysin dient in vielen Fällen zur Substraterkennung bei der ER-assoziierten Degradation. Allerdings gibt es auch Beispiele für Substrate, die durch das Proteasom degradiert werden, ohne durch Ubiquitinierung markiert worden zu sein (Elias et al., 1995; Murakami et al., 1992b). Ubiquitin Moleküle werden durch eine im Cytosol angesiedelte Enzymkaskade an das Zielprotein angeheftet. Dabei muss das Protein polyubiquitiniert werden, um zur Degradation durch das Proteasom erkannt zu werden. Mit der Deletion des cytoplasmatischen Anteils von gp48 in der Mutante gp48 Δ CT wurden alle potentiellen cytoplasmatischen Ubiquitinierungsstellen des Proteins entfernt. Der cytoplasmatische Anteil von gp48 kann in dieser Mutante nicht mehr als Ziel für die Ubiquitinierung dienen. Die vorhergehenden Experimente mit gp48 Δ CT hatten gezeigt, dass die proteasomale Degradation von gp48 nicht durch die Entfernung des cytoplasmatischen Anteils beeinträchtigt wurde, was den Schluss zulässt, dass auch die Ubiquitinierung desselbigen kein Degradationssignal für den proteasomalen Abbau von gp48 darstellt. Um dennoch zu überprüfen, ob gp48 ubiquitiniert wird oder nicht, wurde eine Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen Ubiquitin durchgeführt (Abb. 10). Wie die starken Signale in den Spuren 1-4 zeigen, fanden sich in den Lysaten große Mengen ubiquitiniertes Protein. Dabei kam es bei der Behandlung mit Lactacystin zu keiner erkennbaren Anreicherung ubiquitiniertes Protein. Die Spuren 4-8 zeigen, dass nach

Präzipitation von gp48 aus den Lysaten und der anschließenden Färbung mit dem Antikörper gegen Ubiquitin, keine für ubiquitiniertes gp48 spezifische Banden detektiert werden konnten. Vielmehr findet sich eine unspezifische Hintergrundfärbung, die sich in den Kontrollzellen und den *m06* exprimierenden Zellen nicht unterscheidet. Die Gegenfärbung mit dem Antiserum m06-2 zur Kontrolle der Präzipitation mit CROMA229, zeigt eindeutig, dass in dem Präzipitat große Mengen des viralen Proteins vorhanden waren. Die Färbung mit Ubiquitinantikörper konnte kein ubiquitiniertes gp48 nachweisen. Die schwache Färbung in den Spuren 12 und 13 ist auf übergelaufene Proben zurückzuführen.

Für den proteasomalen Abbau von gp48 dient die Ubiquitinierung des Substrats nicht als Erkennungssignal für das Proteasom.

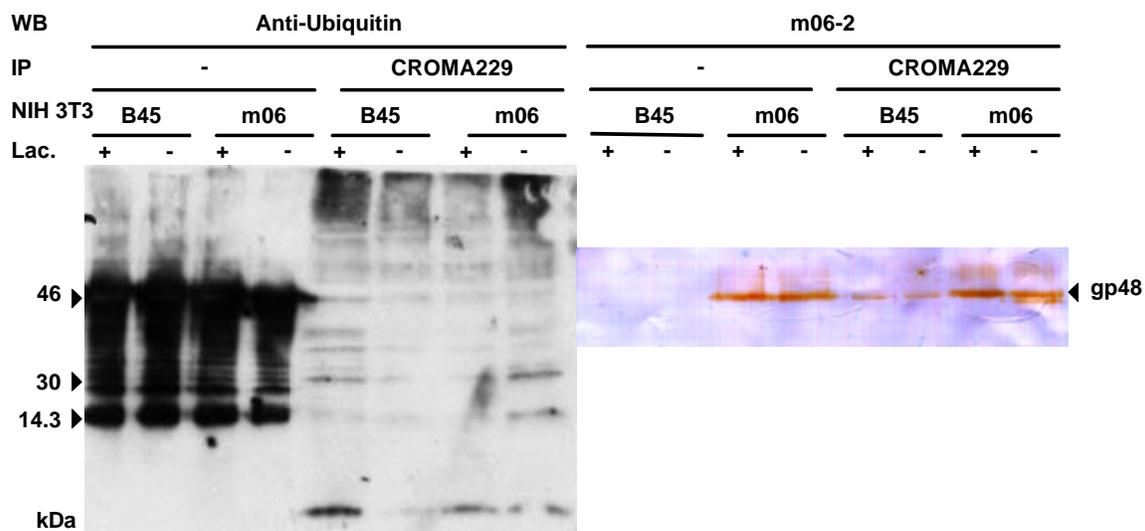


Abb. 10: Ubiquitinierung von gp48

Um zu testen ob freies gp48, das durch das Proteasom degradiert wird, ubiquitiniert ist, wurden NIH 3T3-Zellen, die *m06/gp48* oder den Kontrollvektor (B45) exprimierten, in Gegenwart von Lactacystin inkubiert und lysiert. Die gewonnenen Lysate wurden aufgeteilt. Aus einem Teil wurde gp48 mit dem monoklonalen Mausantikörper CROMA229 präzipitiert und das Präzipitat in der SDS-PAGE analysiert. Der andere Teil der Lysate wurde direkt in der SDS-Page aufgetrennt. Anschließend wurden die in den Gelen aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet (Western Blot, WB). Die ubiquitinierten Proteine wurden mit Hilfe eines Kaninchenantiseraums und über Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Nach dieser Färbung wurde die Membran „gestrippt“, d. h. die sekundären Antikörper der Chemilumineszenz Färbung wurden entfernt. Danach wurde mit dem Kaninchenantiserum m06-2 über eine Farbreaktion gp48 angefärbt.

3.8 Die Rolle der Glykosylierung von gp48 bei der proteasomalen Degradation

Neben der Ubiquitinierung können bei Glykoproteinen die N-verbundenen Oligosaccharide als Signal für die Degradation durch das Proteasom dienen. Die homologen ER-residenten Chaperone Calnexin und Calreticulin binden an fast alle löslichen und membrangebundenen Glykoproteine (Rodan et al., 1996; Trombetta and Helenius, 1998; Zapun et al., 1999). Die Bindung ist vom Prozessierungszustand der Oligosaccharidseitenketten der jeweiligen Proteine abhängig und markiert den Faltungszustand des jeweiligen Proteins. Die Zuckerprozessierung im ER ist daher eng mit der Faltung der Glykoproteine und der Degradation fehlgefalteter Proteine verbunden. Die Inhibition ER-residenter, zuckerprozessierender Enzyme kann den proteasomalen Abbau verhindern, wie z.B. für eine Untereinheit des T-Zellrezeptors gezeigt wurde (Yang et al., 1998). Die Enzyme, die für die Zuckerprozessierung im ER verantwortlich sind, sind die Glukosidase I und II, sowie die Mannosidase I, die in einer Kaskade verschiedene Zuckerreste aus dem „Core“-Glykan abspalten (Abb. 11A). Jeder dieser Zuckerprozessierungsschritte kann durch spezifische Inhibitoren verhindert werden. Mit Hilfe dieser Inhibitoren sollte nun auch für gp48 getestet werden, ob die Zuckerprozessierung im ER den Abbau durch das Proteasom beeinflusst. Dazu wurden *m06/gp48*-exprimierende Zellen mit Castanospermin (Inhibitor von Glukosidase I), mit Deoxynojirimycin (DNJ, Inhibitor von Glukosidase I und II) und mit Deoxymannojirimycin (DMJ, Inhibitor von Mannosidase I) über die angegebenen Zeiträume behandelt. Nach der Lyse wurde gp48 mit m06-2 präzipitiert (Abb. 11B). Da durch die Behandlung mit diesen Inhibitoren die Abspaltung verschiedener Zuckereinheiten aus dem Zucker-„Core“ verhindert wird, verändert sich die elektrophoretische Mobilität von *m06/gp48*. Der Vergleich der vorhandenen Menge von *m06/gp48* nach 4 h Inkubation unter Einfluss der Inhibitoren zeigte, dass die Behandlung mit Castanospermin und DNJ keinen Einfluss auf die Stabilität von gp48 nahm, das heißt das virale Protein wurde nicht angereichert. Dies ist nicht auf die veränderte Glykosylierung von gp48 unter dem Einfluss der Inhibitoren zurückzuführen, da die Zugabe von ALLN zu diesem Ansatz zeigt, dass auch Substrate mit verändertem Zucker-„Core“ durch das Proteasom abgebaut werden können. Bei der Behandlung der Zellen mit DMJ, dem Inhibitor der Mannosidase I, zeigte sich, dass gp48 nach 4 h angereichert worden war. Dieser Effekt kann durch zusätzliche Inhibition des Proteasoms sogar noch verstärkt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Funktion der ER-residenten Mannosidase I eine entscheidende Rolle im proteasomalen Abbau des Glykoproteins gp48 spielt, während andere zuckerprozessierende Enzyme keinen Einfluss auf die proteasomale Degradation von gp48 nehmen.

Die enzymatische Leistung der Mannosidase I kann den Abbau von gp48 durch das Proteasom beeinflussen.

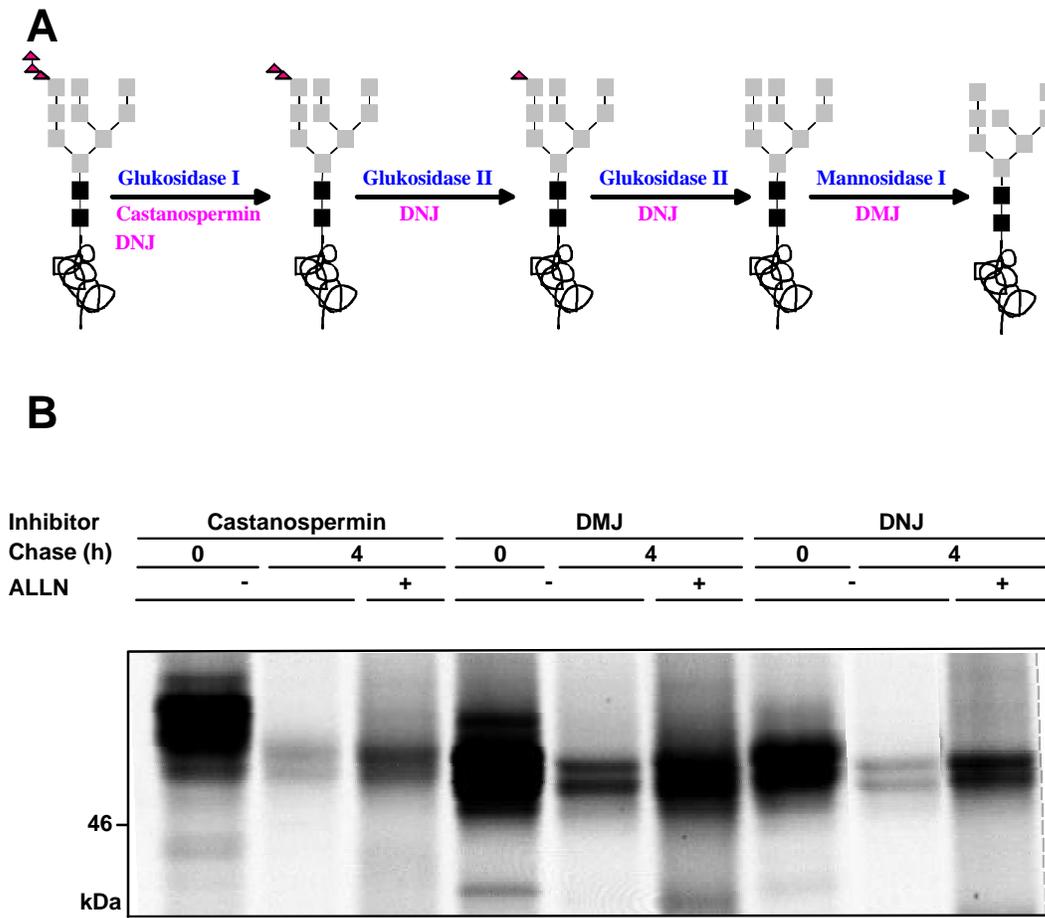


Abb. 11 Einfluss der Oligosaccharidseitenketten auf die proteosomale Degradation von gp48

A Schematische Darstellung der Prozessierung der Oligosaccharidseitenketten im ER und „ER-cis-Golgi intermediate Compartment“ (ERGIC)

Die „Core“-Glykosylierung besteht aus 2 N-Acetylglucosaminresten (schwarze Quadrate), 9 Mannoseeinheiten (graue Quadrate) und 3 Glukoseresten (rosa Dreiecke). Bei der Prozessierung der N-verbundenen Oligosaccharide von Glykoproteinen im ER wird zuerst durch die enzymatische Leistung der Glukosidase I (Glc I) ein Glukoserest abgespalten, dann durch die Glukosidase II (Glc II) die beiden restlichen Glukoseeinheiten. Schließlich spaltet die Mannosidase I (Man I) eine Mannoseeinheit ab. Nach dieser Spaltung verlässt das prozessierte Glykoprotein normalerweise das ER und die „Core“-Glykosylierung wird auf dem Weg durch den Golgi weiter prozessiert und modifiziert. Die zuckerprozessierenden Enzyme des ER können durch die spezifischen Inhibitoren Castanospermin, Deoxynojirimycin (DNJ) und Deoxymannojirimycin (DMJ) inhibiert werden.

B Der Einfluss verschiedener Inhibitoren der Zuckerprozessierung auf die Degradation von gp48

NIH 3T3-Zellen, die stabil mit *m06* transfiziert worden waren, wurden in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren (Castanospermin 50 mM; Deoxynojirimycin 60 mM; Deoxymannojirimycin 50 mM) für 2 h vorinkubiert. Danach wurden die Ansätze radioaktiv markiert und teilweise mit dem proteosomalen Inhibitor ALLN inkubiert. Die Lysate der so behandelten Zellen wurde mit *m06-2* präzipitiert und die Präzipitate in der SDS-PAGE analysiert.

3.9 Lokalisation der proteasomalen Degradation von gp48

Die Degradationskinetik von gp48 ist im Vergleich zu anderen Proteinen, die durch die ERAD abgebaut werden, langsam (Wiertz et al., 1996b; Wiertz et al., 1996a). Außerdem ist der proteasomale Abbau von gp48 abhängig von der Mannosidase I, einem Enzym, das am Ende der Zuckerprozessierungskaskade im ER steht und auch im „ER-Golgi Intermediate Compartment“ (ERGIC) angesiedelt ist. Diese Tatsachen führen zu der Frage, ob gp48 tatsächlich im ER stabilisiert wird oder auf dem Exportweg weitergeleitet wird und an einer anderen Stelle der proteasomalen Degradation zugeführt wird. Um dies zu testen, wurde die intrazelluläre Verteilung von gp48 in Anwesenheit von Lactacystin oder Leupeptin analysiert. Um gp48 in der Immunfluoreszenz sichtbar zu machen, musste der monoklonale Antikörper CROMA229 als primärer Antikörper verwendet werden, da das für freies gp48 spezifische Antiserum m06-2 bei dieser Detektionsmethode unspezifische Signale aufwies. Aus diesem Grunde werden in den folgenden Experimenten nicht wie bisher nur freie gp48 Moleküle sondern auch die Molekülkomplexe gp48/MHC Klasse I detektiert. Nach 4 h Inkubation mit oder ohne Lactacystin wurde gp48 in retikulären und vesikulären Verteilung nahe des Kerns gefunden. Zur genaueren Definition dieser Strukturen wurde die Kolokalisation verschiedener zellulärer Markerproteine mit m06/gp48 überprüft. Die Lokalisation von m06/gp48 nach Inkubation mit Lactacystin unterschied sich klar von m06/gp48 in der Gegenwart von Leupeptin. Während m06/gp48 in der Gegenwart des lysosomalen Inhibitors Leupeptin in den Lysosomen akkumuliert (Reusch et al., 1999), erkennbar durch die Kolokalisation mit dem „Lysosome associated membrane protein“ Lamp-1 (Abb. 12F), konnte für m06/gp48 nach Behandlung mit Lactacystin keine Kolokalisation mit Lamp-1 nachgewiesen werden (Abb. 12E). m06/gp48 akkumulierte bei Hemmung des Proteasoms durch Lactacystin, vor allem im ERGIC (Abb. 12C) und nicht wie zu erwarten im ER (Abb. 12A). Zwar zeigte sich auch eine schwache Kolokalisation mit dem ER-Marker Calnexin, hauptsächlich akkumulierte m06/gp48 in Gegenwart von Lactacystin jedoch im ERGIC. m06/gp48 kolokalisierte unter Einfluss von Leupeptin weder mit Calnexin noch mit dem ERGIC-Marker pp58 (Abb. 12B+D). Diese Ergebnisse zeigen, dass gp48 bei der Inhibition des Proteasoms nicht im ER verbleibt, sondern im sekretorischen Weg fortschreitet und im ERGIC stabilisiert wird.

Weiterhin wird deutlich, dass sich das Schicksal von gp48 im Komplex mit MHC Klasse I-Molekülen und freiem gp48 klar unterscheidet. Während das lysosomale Signal im C-Terminus von gp48 den Komplex mit MHC Klasse I zu den Lysosomen dirigiert, kann freies gp48 diese Information nicht nutzen und wird im ER/ERGIC zur Degradation zurückgehalten.

Freies gp48 befindet sich nach Inhibition des Proteasoms im ER/ERGIC Kompartiment der Zelle. MHC Klasse I-Komplexe gebunden an gp48 finden sich im Gegensatz dazu im lysosomalen Kompartiment.

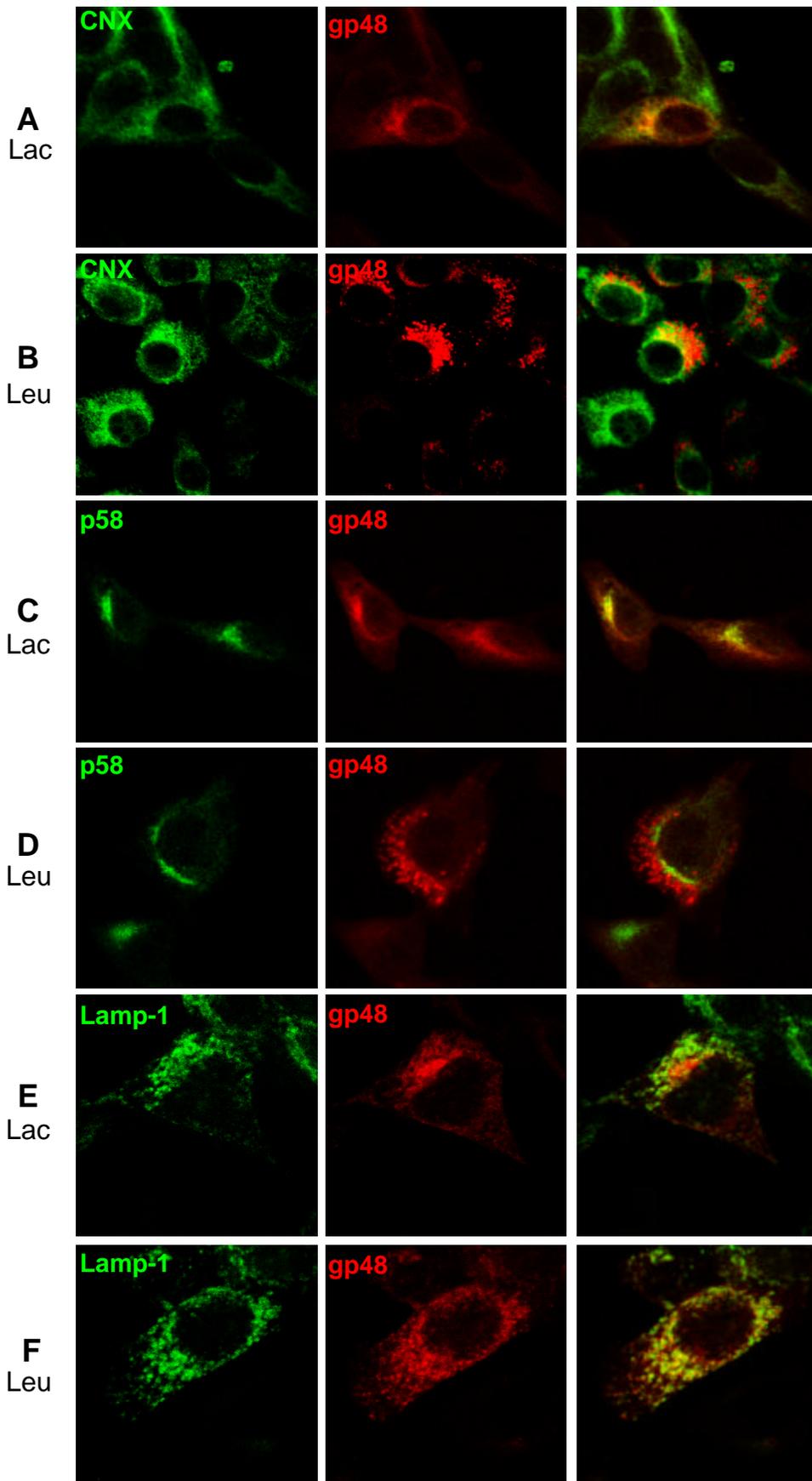


Abb. 12: Immunfluoreszenz zur Lokalisation von *m06/gp48* in der Zelle

NIH 3T3-Zellen, die stabil *m06/gp48* exprimieren, wurden mit Hilfe der konfokalen Laserscanmethode analysiert. Vor der Fixierung und der Färbung wurden die Zellen für 6 h mit Lactacystin oder Leupeptin inkubiert. Es wurden Doppelfärbungen durchgeführt, wobei in der Darstellung eine Reihe auf eine Färbung bezogen ist. Die ersten beiden linken Bilder zeigen dabei jeweils die beiden Einzelfärbungen, das dritte Bild in der Reihe ist die Überlagerung der beiden Bilder.

(A+B) Die Doppelfärbung der Zellen mit dem ER-Marker Calnexin (CNX, grün) und gp48 (rot) zeigt in der Gegenwart von Leupeptin keine Überlagerung, eine schwache Überlagerung in der Gegenwart von Lactacystin.

(C+D) Die Doppelfärbung mit dem ERGIC-Marker p58 (grün) und gp48 (rot) zeigt eine deutliche Überlagerung der Färbungen in Gegenwart von Lactacystin. Dagegen zeigen Zellen, die mit Leupeptin behandelt wurden, keine Übereinstimmung der Färbungen.

(E+F) Die Doppelfärbung mit dem lysosomalen Marker Lamp-1 (grün) und gp48 (rot) zeigt eine Überlagerung der Färbungen in der Gegenwart von Leupeptin nicht aber in der Gegenwart von Lactacystin.

3.10 Entwicklung eines *in vitro* Systems zur proteasomalen Degradation von gp48

Die vorhergehenden Experimente haben gezeigt, dass nicht nur der Abbau von freiem gp48, sondern auch der Transport des Proteins aus dem ER von einem funktionsfähigen Proteasom abhängig ist. Um die Komponenten der ER-assoziierten Degradation von *m06/gp48* genauer untersuchen zu können und auch den Transportmechanismus zu betrachten, wurde ein *in vitro* System entwickelt. Dieser Ansatz besteht aus Mikrosomen, die aus *m06/gp48*- oder *m06/gp48ΔCT*-exprimierenden Zellen gewonnen wurden, isoliertem aktivem 20S und 26S Proteasom und ATP.

3.10.1 Isolation der Mikrosomen aus NIH 3T3-Zellen

Da von den vorausgegangenen Experimenten bereits bekannt war, dass gp48 bei Inhibition des Proteasoms in ER und ERGIC akkumuliert, wurden Mikrosomen aus dem ER/ERGIC angereichert. *m06/gp48* enthaltende Mikrosomen aus dem Homogenisat *m06/gp48*-exprimierender Zellen wurden über einen Sucrosegradienten von 0,5 M bis 1,2 M isoliert. Dabei bilden sich nach der Ultrazentrifugation in einem „Swing-out“-Rotor zwei milchige Banden im Gradienten, wobei die Bande bei ca. 0,8 M die angereicherte Golgi-Fraktion darstellt, die Bande bei ca. 1,05 M die angereicherte ER-Fraktion. Die Western Blot Analyse mit Kompartiment-spezifischen Markern zeigte, dass es in diesem Gradienten zu keiner vollständigen Trennung von ER und Golgi kommt, jedoch zu einer eindeutigen Anreicherung von Mikrosomen aus dem einen oder anderen Kompartiment. Bei Sucrosegradienten bestehen verschiedene Möglichkeiten, die Probe aufzutragen. Man kann den Gradienten mit der Probe überschichten, was zur Folge hat, dass die gesamte Probe im Laufe der Zentrifugation durch den „flow-down“-Gradienten wandert. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, die Probe dem höchsten Sucrosewert im Gradienten anzupassen und somit die Probe mit dem Gradienten zu überschichten. Dies bietet den Vorteil, dass während der Zentrifugation nicht die gesamte Probe den Gradienten durchquert, sondern nur Proteine geringerer Dichte durch den Gradienten aufsteigen („flow-up“). Da für die nachfolgenden Degradationsexperimente möglichst definierte und saubere Mikrosomenisolationen

benötigt wurden, wurden Mikrosomen nach beiden Methoden isoliert und anschließend auf Stabilität von *m06/gp48* getestet. Wie viele andere enzymatische Vorgänge in der Zelle ist die proteasomale Degradation ATP abhängig. Um der Reaktion permanent ATP zur Verfügung zu stellen, wurde ein ATP-regenerierendes System eingesetzt, um die geringe Stabilität von ATP *in vitro* auszugleichen. Leider kam es bei der Verwendung dieses Systems zu einer Kreuzreaktion im Western Blot mit dem Antiserum *m06-2* (Abb. 13). Um diese Reaktion zu vermeiden, wurde in den folgenden Versuchen auf dieses System verzichtet und stattdessen alle 30 min neues ATP zugefügt. Zuerst wurde die Stabilität von *gp48* über 4 h bei 37 °C in den durch „flow-up“- oder „flow-down“-Gradienten isolierten Mikrosomen in Gegenwart von ATP getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass *m06/gp48* nur in Mikrosomen aus dem „flow-up“-Gradienten in Gegenwart von ATP stabil bleibt. In Mikrosomen die im „flow-down“-Gradienten präpariert wurden, waren noch funktionsfähige Proteasen vorhanden, die durch ATP Zugabe aktiviert wurden, was zur Degradation von *gp48* führte. Aus diesem Grunde wurde für die folgenden Experimente die Präparation aus dem „flow-up“-Gradienten verwendet.

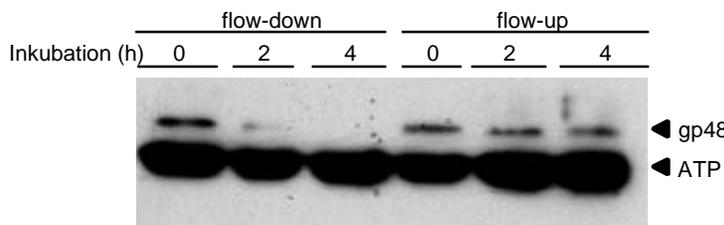


Abb. 13 Vergleich "flow up"- und "flow down"-Gradient

Mikrosomen, die *m06/gp48* enthielten wurden über die angegebenen Zeiträume mit einem ATP regenerierenden System (ATP) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot sichtbar gemacht.

3.10.2 Degradation von *m06/gp48* und *m06/gp48DCT* *in vitro*

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob der Abbau von *m06/gp48* durch das Proteasom in isolierten Mikrosomen durch die Zugabe von gereinigtem 20S und 26S Proteasom rekonstituiert werden kann. Wie bereits gezeigt, blieb *m06/gp48* auch unter Zugabe von ATP in Mikrosomen aus dem „flow up“-Gradienten über 4 h stabil. Interessanterweise konnte durch Zugabe von einer Mischung aus 20S und 26S Proteasom, die Degradation von *m06/gp48* und *m06/gp48ΔCT* wiederhergestellt werden (Abb. 14). Die Abbaugeschwindigkeit von *m06/gp48* unterschied sich in diesem *in vitro* System von der Abbaugeschwindigkeit von *m06/gp48* durch das Proteasom in Zellkultur. Dies ist durch die nicht-physiologischen Bedingungen und die Isolation von Proteasomen zu erklären, da isoliertes Proteasom schnell an Aktivität verliert. Um die Reinheit der proteasomalen Präparation zu testen und um Verunreinigungen mit anderen Proteasen weitgehend auszuschließen, wurde der gesamte Ansatz mit dem spezifischen proteasomalen Inhibitor MG132 behandelt, da Lactacystin im *in vitro* System nicht in

seine enzymatisch aktive Form umgewandelt werden kann. Die Behandlung mit dem proteasomalen Inhibitor stabilisierte *m06/gp48* über einen Zeitraum von 4 h und zeigte, dass der beobachtete Abbau nach Zugabe von Proteasom tatsächlich auf dessen Funktion beruht. Um weiterhin zu testen, ob die hergestellten Mikrosomen auch tatsächlich stabil sind und gp48 nicht etwa deshalb degradiert wird, weil es nicht mehr in seiner korrekten Topologie in der ER Membran inseriert ist, wurde zur Kontrolle das ER-residente Chaperon Calnexin angefärbt, welches normalerweise nicht durch das Proteasom degradiert wird. Die Zugabe von funktionsfähigem Proteasom zu den Mikrosomen beeinflusste die Stabilität von Calnexin nicht. Schließlich wurden Mikrosomen aus *m06/gp48 Δ CT*-exprimierenden Zellen hergestellt, um zu überprüfen ob auch der proteasomale Abbau dieser Mutante *in vitro* rekonstituiert werden kann (Abb. 14). Wie die Degradationskinetik von gp48 Δ CT *in vitro* zeigt, verhielt sich die Mutante wie das Gesamtprotein und wurde nach Zugabe von Proteasom, wenn auch langsamer als im Zellkontext, degradiert.

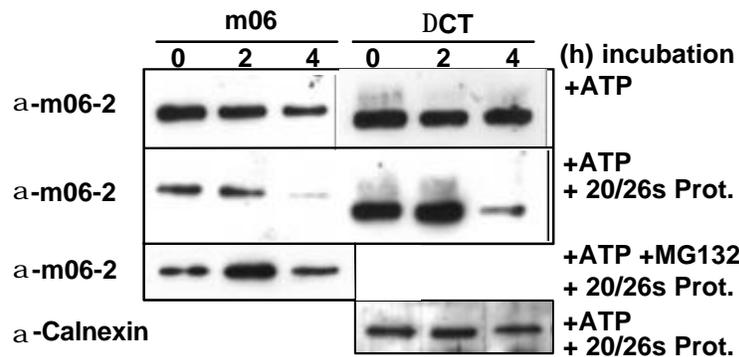


Abb. 13: *In vitro* Abbau von *m06/gp48* und *m06/gp48 Δ CT*

Mikrosomen von NIH 3T3-Zellen, die entweder *m06/gp48* oder *m06/gp48 Δ CT* exprimieren, wurden mit 50 μ M ATP, 20 μ M MG132 und einer Mischung aus aufgereinigtem 20S und 26S Proteasom versetzt. Die Proben wurden bei 37 °C über die angegebenen Zeiträume inkubiert und dann durch eine 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden durch die angegebenen Antikörper angefärbt.

3.10.3 Transport von *m06/gp48* aus den Mikrosomen

Das *in vitro* System zeigte, dass die Degradation von gp48 und gp48 Δ CT eindeutig ein aktives Proteasom benötigt. Weiterhin demonstrieren diese Ergebnisse, dass ER/ERGIC Membranen, ATP und 20S/26S Proteasomen genügen, um die Degradation des viralen Proteins zu rekonstituieren. Um vom Proteasom degradiert zu werden, muss *m06/gp48* und *m06/gp48 Δ CT* das Mikrosom verlassen, da das Proteasom nicht in der Lage ist membranständige luminal Proteine zu degradieren. Um auszuschließen, dass der Export von *m06/gp48* und *m06/gp48 Δ CT* bereits durch die Zugabe von ATP zu den Mikrosomen ausgelöst wird, wurden die mikrosomalen Membranen erst für 4 h mit ATP inkubiert und anschließend einem Prot K-Verdau unterzogen (Abb. 15). Falls der Export des Substrates allein durch Zugabe von ATP zum System erfolgt, sollten die exportierten Proteine durch die Proteinase K verdaut werden. Der

Versuch zeigte jedoch, dass Prot K *m06/gp48* tatsächlich nur durch Destabilisierung der Membranen durch NP-40 degradiert. Ansonsten kann Prot K auch nach einer Inkubation von 4 h mit ATP nur den cytoplasmatischen Teil von *m06/gp48* angreifen, was sich in einer Änderung der elektrophoretischen Mobilität um 3 kDa zeigt. Dies beweist, dass gp48 während der Behandlung mit ATP in den mikrosomalen Membranen inseriert bleibt und das Proteasom selbst den Transport des Substrates aus der Membran auslöst.

Das entwickelte *in vitro* System ermöglicht es, die Komponenten der proteasomalen Degradation von *m06/gp48* und *m06/gp48DCT* zu definieren und zu testen. Isolierte Mikrosomen aus ER/ERGIC, ATP und gereinigtes Proteasom sind diejenigen Komponenten, die für die proteasomale Degradation von *m06/gp48* und *m06/gp48DCT* erforderlich sind. Auch im *in vitro* System werden *m06/gp48* und *m06/gp48DCT* durch ein aktives Proteasom degradiert, das auch den Transport aus der Membran vermittelt.

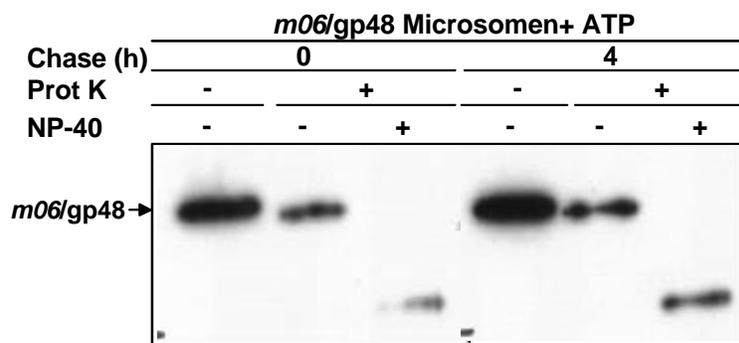


Abb. 15: Prot K-Behandlung der Mikrosomen

Zur Behandlung mit Prot K wurden *m06/gp48* Mikrosomen mit 50 μ M TEA abgepufferten ATP über die angegebenen Zeiträume inkubiert. Die Proben wurden aufgeteilt und für 30 min bei 4 °C entweder mit oder ohne Prot K bzw. Prot K und 1% NP-40 inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF gestoppt und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot wurde gp48 mit dem Antiserum *m06-2* angefärbt.

3.11 Das Schicksal von gp48 während der Virusinfektion

Alle bisherigen Versuche zur Untersuchung der proteasomalen Degradation von gp48 wurden in stabil transfizierten Mauszelllinien am isoliert exprimierten Protein durchgeführt. Um die biologische Relevanz der gemachten Beobachtungen zu testen, wurde untersucht, ob Lactacystin auch während der MCMV Infektion in der Lage ist, freies gp48 anzureichern. Dazu wurden murine NIH 3T3-Zellen mit dem Virus MW 97.01, das aus dem Wildtyp BAC pC3X rekonstituiert wurde (Wagner et al., 1999), und der Virusmutante *m06-HA* (zur Verfügung gestellt von Markus Wagner) mit einer „multiplicity of infection“

(m.o.i.) von 0,5 infiziert. Die Mutante m06-HA enthält des *m06* Gen in einer am C-Terminus mit einem Peptid des Hämagglutininproteins (HA) des Influenzavirus markierten Version und ermöglicht dadurch das *m06* Genprodukt mit dem kommerziellen HA-Antikörper 3F10 zu präzipitieren. Durch die Verwendung der HA-Mutante kann ein neutraler Antikörper zur Präzipitation benutzt werden, der an den MHC Klasse I-Komplex gebundenes und freies *m06*/gp48 erkennen kann. Das m06-HA Virus hat in Bezug auf Funktion und Verhalten von gp48 Wildtypeigenschaften (persönliche Auskunft Markus Wagner). 16 h nach Infektion wurden die Zellen radioaktiv markiert und über 4 h entweder mit Lactacystin oder Leupeptin behandelt. Unmittelbar nach der Markierung ist gp48 in einer Endo H-sensitiven Form zu finden (Abb. 16). Nach 4 Stunden Inkubation in Gegenwart von Leupeptin wurde gp48 in seiner Endo H-resistenten Form stabilisiert, assoziiert mit MHC Klasse I Molekülen (Abb.16, Pfeile). Lactacystin dagegen stabilisiert gp48 in seiner Endo H-sensitiven Form, die sich nur während der Inhibition des Proteasoms, nicht aber bei Behandlung mit Leupeptin oder Inkubation ohne Inhibitor anreichte (Abb. 16, Sterne). Allerdings fanden sich in diesen Spuren auch MHC Klasse I-schwere und -leichte Kette. Diese Moleküle wurden jedoch nicht durch Lactacystin stabilisiert, da die Menge an MHC-Molekülen derjenigen entsprach, die nach 4 h Inkubation ohne Lactacystin vorhanden war (Abb. 16, gefüllte Pfeilspitzen). Dieser Effekt kann auf präformiert, markierte MHC Klasse I-Moleküle zurückgeführt werden, die einen Komplex mit gp48 Molekülen bildeten, welche unter „chase“-Bedingungen synthetisiert wurden. Aus diesem Experiment lässt sich eindeutig schließen, dass *m06*/gp48 auch während der viralen Infektion in so großen Mengen synthetisiert wird, und dass überschüssiges Protein, welches keine Interaktionspartner findet, durch das Proteasom abgebaut wird.

Freies gp48 wird auch während der Infektion durch das Proteasom degradiert. Die Beobachtungen zur proteasomalen Degradation von freiem gp48 sind keine Überexpressionsartefakte in stabilen Zelllinien.

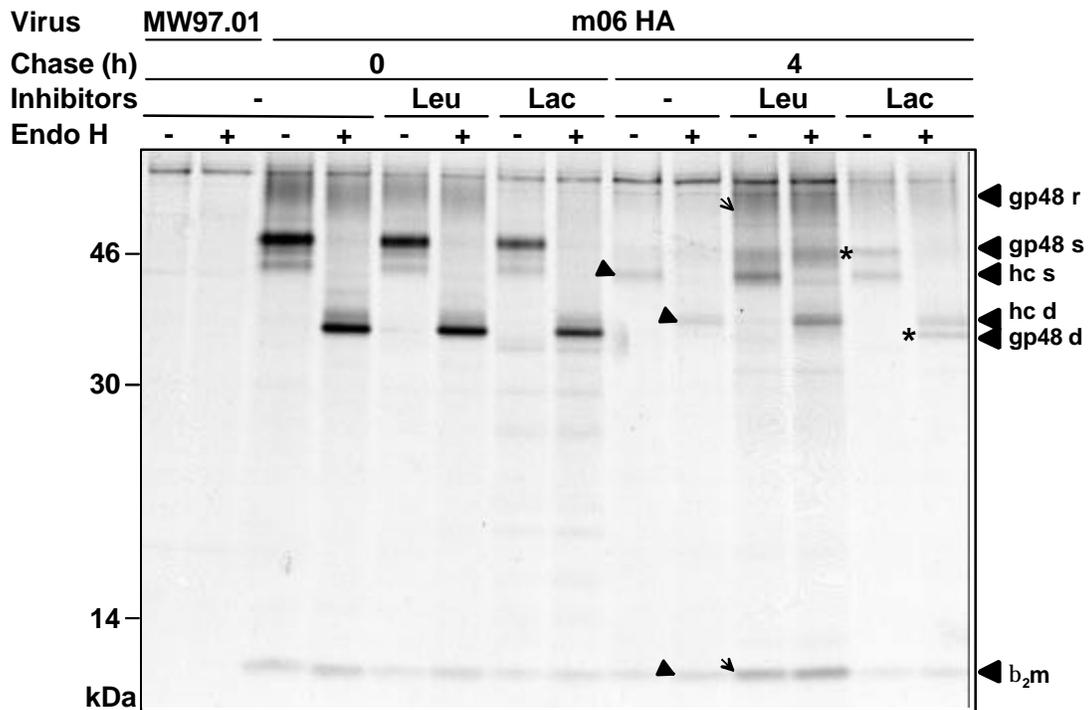


Abb. 16: Das Schicksal von gp48 während der Infektion

NIH 3T3-Zellen wurden mit MCMV-Wildtypvirus (MW 97.01) oder der Mutante MCMV m06 HA mit einer m.o.i von 0,5 infiziert und anschließend 30 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. 16 h nach der Infektion wurden die Zellen radioaktiv markiert und für 4 h inkubiert. Während der Markierung wurden lysosomale und proteasomale Inhibitoren zugefügt. Nach der Inkubation von weiteren 4 h wurden die Zellen lysiert und gp48 wurde mit dem Anti-HA Antikörper 3F10 präzipitiert. Die Proben wurden dann mit oder ohne Endo H behandelt und in der SDS-PAGE aufgetrennt. hc, MHC Klasse I schwere Kette; r, Endo H-resistent; s, Endo H-sensitiv; d, Endo H-verdaut.

4 Diskussion

4.1 Das Glykoprotein gp48 von MCMV kann zwei verschiedene Abbauwege durchlaufen

Das MCMV-Glykoprotein gp48 wird in der frühen („early“) Phase der Infektion vom Gen *m06* exprimiert. Gp48 ist ein Typ I Transmembranprotein, welches im ER an neu-synthetisierte β_2m -assoziierte MHC Klasse I-Moleküle bindet und diese durch ein Motiv im cytoplasmatischen Anteil von *m06/gp48* dann zur Degradation in die Lysosomen umleitet (Reusch et al., 1999). Die durch *m06/gp48* induzierte Degradation der MHC Klasse I-Moleküle im Lysosom verhindert die Präsentation antigener Peptide gegenüber CD8⁺ cytotoxischen T-Zellen an der Zelloberfläche. Dadurch wird die Elimination des Virus durch das Immunsystem verhindert. Neben *m06* gibt es in MCMV zwei weitere Gene, deren Produkte mit MHC Klasse I-Molekülen interagieren. *m152/gp40* blockiert den Transport der MHC Klasse I-Moleküle an die Zelloberfläche (Ziegler et al., 1997). Der genaue molekulare Mechanismus von *m152/gp40* ist bisher nicht geklärt. Es wird vermutet, dass die transiente Interaktion zwischen *m152/gp40* und MHC Klasse I-Molekülen zu einer Akkumulation derselben im ERGIC führt (Ziegler et al., 2000). Das MCMV Gen *m04/gp34* bildet mit MHC Klasse I-Molekülen einen Komplex und wird zusammen mit diesen an die Zelloberfläche transportiert (Kleijnen et al., 1997). Dort verhindert *m04/gp34* bei MHC Klasse I-Allelen des Haplotyps K^b die Erkennung durch CD8⁺ cytotoxische T-Lymphozyten (Kavanagh et al., 2001). Weitere Untersuchungen zur Kooperation von *m06/gp48*, *m152/gp40* und *m04/gp34* im Viruskontext haben gezeigt, dass für die Reduktion der Oberflächenexpression von MHC Klasse I Molekülen hauptsächlich *m06/gp48* und *m152/gp40* verantwortlich sind (Gutermann, 2001). Dabei hat *m06/gp48* in der Regel einen stärkeren Effekt als *m152/gp40* und ist somit hauptsächlich für die Reduktion von MHC Klasse I-Molekülen an der Zelloberfläche während der MCMV Infektion verantwortlich. Um diesen Zweck zu erfüllen, wird *m06* während der Infektion abundant exprimiert (Reusch, 2000). Dadurch kommt es zu der Situation, dass gp48 im Vergleich zu den MHC Klasse I-Molekülen im Überschuss vorhanden ist. Freies gp48 verweilt für einen bestimmten Zeitraum im ER und gelangt nicht zu den Lysosomen, sondern wird ins Cytosol transportiert und dort durch das Proteasom degradiert. Der Mechanismus der proteasomalen Degradation von freiem gp48 wurde in dieser Arbeit näher untersucht (Abb. 17).

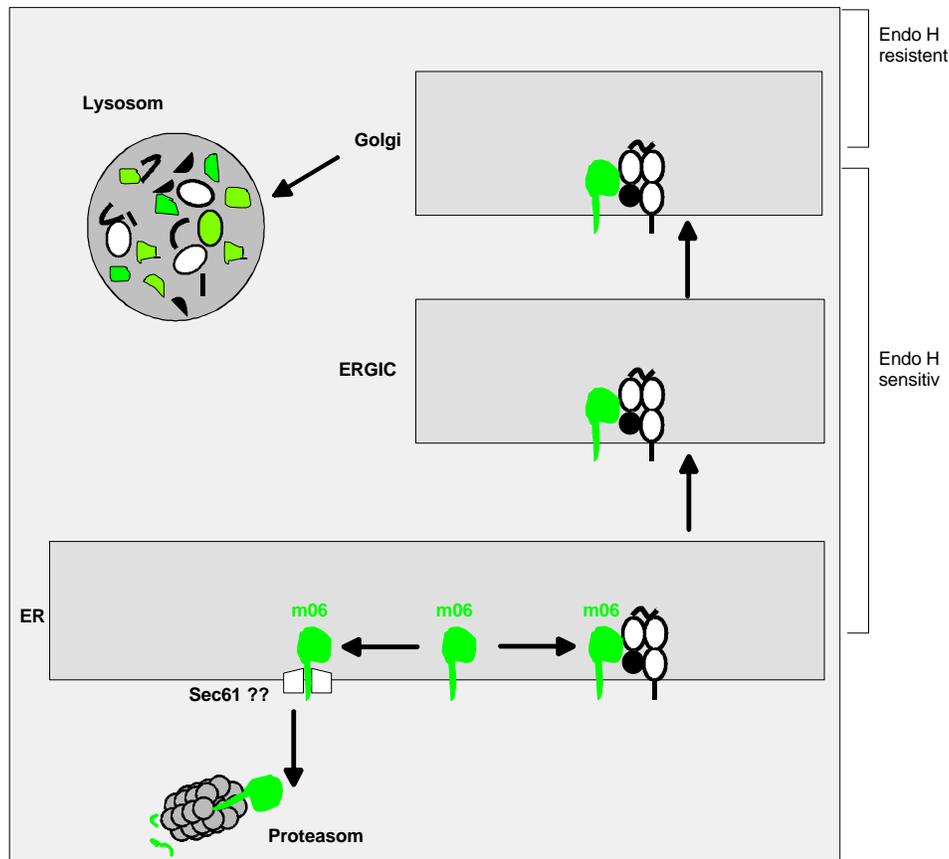


Abb. 17: Schematische Darstellung des Schicksals von freiem und MHC Klasse I-assoziiertem gp48

m06/gp48 (grün) wird kotranslational in das ER inseriert, gefaltet und glykosyliert. Im ER kann gp48 an β_2m -assoziierte und mit Peptid beladene MHC Klasse I-Moleküle binden. Dieser Komplex wird über ein Transportsignal im cytoplasmatischen Anteil von gp48 in die Lysosomen geleitet und dort rasch degradiert. Freies gp48 hingegen verweilt eine gewisse Zeit im ER bis es anschließend durch das cytosolische Proteasom degradiert wird. Sowohl in stabil transfizierten Zelllinien, als auch während der MCMV Infektion kann klar zwischen diesen Populationen von gp48 unterschieden werden.

4.2 Gp48 akkumuliert bei der Inhibition des Proteasoms in einer membranassoziierten und Endo H-sensitiven Form

Die ER-assoziierte Degradation (ERAD) durch das cytosolische Proteasom von fehlgefalteten Proteinen, überschüssigen sekretorischen Proteinen und von Proteinen ohne Bindungspartner stellt einen wichtigen Kontrollmechanismus der Zelle dar. Dieser verhindert, dass nicht funktionsfähige oder überzählige Proteine über den sekretorischen Transportweg in der Zelle verteilt werden (Attaix et al., 2001; Myung et al., 2001). Das zur Zeit gültige Modell zur ER-assoziierten Degradation geht davon aus, dass die Substrate des Proteasoms aus dem ER über das Sec61 Translocon ins Cytosol zurücktransportiert werden. Während dieses Transports erfolgt die Ubiquitinierung und die

Deglykosylierung der Substrate und schließlich ihre Degradation durch das Proteasom (Pilon et al., 1997; Plemper et al., 1997; Wiertz et al., 1996b). Der Transport des Substrates aus dem ER ist unabhängig von einem funktionellen Proteasom, wie verschiedene Beispiele aus dem Hefesystem und Säugetierzellen inzwischen belegen (Hiller et al., 1996; Hughes et al., 1997; Wiertz et al., 1996b; Wiertz et al., 1996a; Yu et al., 1997). Entgegen diesem bislang favorisierten Modell zur proteasomalen Degradation gibt es Veröffentlichungen die zeigen, dass der Transport der Substrate aus dem ER vom Proteasom abhängig sein kann (Chillaron and Haas, 2000; Plemper et al., 1998). Yang und Kollegen konnten zeigen, dass verschiedene Untereinheiten des T-Zellrezeptors über unterschiedliche Mechanismen der proteasomalen Degradation zugeführt werden (Yang et al., 1998). Die Untersuchung der proteasomalen Degradation von freiem gp48 ergab, dass auch das virale Glykoprotein abhängig vom Proteasom degradiert wird. Die Behandlung *m06*/gp48 exprimierender Mauszelllinien mit dem spezifischen proteasomalen Inhibitor Lactacystin verdoppelte die Halbwertszeit von freiem gp48 von 90 min auf 3 h (Abb. 6). In Gegenwart von Lactacystin wurde gp48 allerdings nicht, wie nach dem gängigen Modell zu erwarten wäre, als deglykosylierte Form im Cytosol stabilisiert, sondern membranassoziiert in einer Endo H-sensitiven Form. Die Behandlung von stabilisiertem gp48 mit Proteinase K zeigte, dass gp48 in der Gegenwart eines nicht funktionellen Proteasoms korrekt inseriert in der mikrosomalen Membran verankert bleibt (Abb. 8). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sowohl der Transport als auch die Degradation von freiem gp48 von einem funktionsfähigen Proteasom abhängig sind. Freies gp48 wird in Gegenwart proteasomaler Inhibitoren in seiner Endo H-sensitiven Form angereichert. Daraus lässt sich schließen, dass der proteasomale Abbau von gp48 in einem zellulären Kompartiment vor dem medialen Golgi erfolgt, wahrscheinlich im ER oder ERGIC. Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Modell der ERAD ist der proteasomale Abbau von freiem gp48 und der Transport des membraninserierten Substrats abhängig von einem funktionsfähigem Proteasom.

4.3 ERAD von gp48 erfolgt im ER/ERGIC Kompartiment der Zelle

Studien von freiem gp48 in Gegenwart von Lactacystin und dem lysosomalen Inhibitor Leupeptin verdeutlichen, dass gp48 je nach Assoziationsstatus in verschiedenen Kompartimenten der Zelle angereichert wird. Wie von Reusch und Kollegen beschrieben, ist der Transport des gp48/MHC Klasse I-Komplexes in die Lysosomen abhängig von einem Di-Leucin-Motiv im C-terminalen Bereich des Proteins (Reusch et al., 1999; Reusch, 2000). Di-Leucin-Motive dienen verschiedenen zellulären und viralen Proteinen als Signal für den Transport in Endosomen bzw. Lysosomen (Le Borgne and Hoflack, 1998). Das Transportsignal des Di-Leucin Motivs im cytoplasmatischen Anteil von gp48 kann auch auf andere Proteine übertragen werden. Eine Chimäre aus dem N-terminalen Anteil des viralen Proteins *m04*/gp34 und der cytoplasmatischen Domäne von gp48 wird in die Lysosomen umgelenkt (Reusch, 2000). Allerdings scheint das Di-Leucin-Motiv im cytoplasmatischen Anteil von gp48 nur im

Zusammenhang mit dem cytoplasmatischen Anteil von MHC Klasse I-Molekülen zu funktionieren. Die Übertragung des cytoplasmatischen Anteils von gp48 auf CD4, welches nicht wie *m04/gp34* oder *m06/gp48* in der Lage ist MHC Klasse I-Moleküle zu binden, führt nicht zu einem Transport in die Lysosomen (Reusch, 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass bei ohne Bindung von MHC Klasse I-Molekülen an gp48 das Transportsignal des Di-Leucin-Motivs nicht funktionell ist und freie gp48-Moleküle stattdessen im ER verweilen und der Degradation durch das Proteasom anheim fallen. Die Retention von gp48 im ER könnte auf Signalmotiven im Transmembranbereich des Proteins beruhen. Bei solchen Signalen handelt es sich um polare Seitengruppen im Bereich der hydrophoben Transmembrandomäne, die erst bei der Bindung eines anderen Moleküls den Transport aus dem ER erlauben. Beispiele für die durch polare Seitengruppen vermittelte ER Retention sind die TCR α Kette, die selektiv degradiert wird, wenn die restlichen Untereinheiten des T-Zellrezeptors nicht zur Verfügung stehen (Bonifacino et al., 1990) und die bei Abwesenheit der leichten Kette ER-retentierete Ig μ Kette (Stevens et al., 1994). gp48 enthält 6 polare Aminosäuren in seiner Transmembrandomäne, die durch die Bindung der MHC Klasse I-Moleküle maskiert werden könnten und so den Transport des Komplexes ins Lysosom, signalisiert durch das Di-Leucin-Motiv im cytoplasmatischen Anteil von gp48, zulassen. Findet jedoch keine Bindung an MHC Klasse I-Moleküle im ER statt, kann gp48 das ER nicht verlassen und wird schließlich durch das cytosolische Proteasom degradiert. Die Hypothese, dass freies gp48 über einen längeren Zeitraum im ER retentiert wird, wird experimentell durch die Tatsache gestützt, dass die Degradation von gp48 durch das Proteasom im Vergleich zu anderen Substraten langsam ist. Die durch die HCMV Proteine US2 und US11 induzierte Degradation der schweren Kette von MHC Klasse I findet innerhalb von Minuten statt und bewirkt einen sofortigen Rücktransport der neusynthetisierten Proteine über das Translocon aus dem ER (Wiertz et al., 1996b; Wiertz et al., 1996a). Diese schnelle Degradation wäre im Falle von gp48 nicht von Nutzen, da das Protein erst im ER eine gewisse Zeit verweilen muss um seine potentiellen Partner zu finden. Auch die δ -Untereinheit des T-Zellrezeptors zeigt bei der proteasomalen Degradation eine zu gp48 vergleichbare Kinetik (Yang et al., 1998), da auch dieses Protein erst degradiert wird, wenn kein entsprechender Interaktionspartner im ER vorhanden ist.

Die Analyse der Lokalisation von freiem gp48 in Gegenwart von Lactacystin hat weiterhin gezeigt, dass der Hauptteil des stabilisierten Proteins im ER-Golgi „intermediate compartment“ (ERGIC) zu finden ist und nicht im ER (Abb. 12). Hier scheint auch die proteasomale Degradation von gp48 stattzufinden. Diese Beobachtung geht einher mit den Ergebnissen von Raposo und Kollegen (Raposo et al., 1995). Die Untersuchung der Lokalisation von MHC Klasse I -Molekülen die zur Degradation bestimmt waren weil kein β_2m in den Zellen vorhanden war oder aber die Peptidbeladung der MHC Klasse I-Komplexe unterbunden wurde, ergab die Lokalisation dieser Moleküle im ERGIC. Die zum Abbau bestimmten MHC Klasse I-Moleküle waren in Membranvesikel inseriert, die mit Teilen des Ubiquitin-Proteasom-

Systems der Zelle assoziiert waren. Interessanterweise ist das für den Transport der proteasomalen Substrate aus dem ER zuständige Sec61 Translocon nicht nur, wie angenommen im ER, sondern auch im ERGIC lokalisiert und hier für den Rücktransport von für die proteasomale Degradation bestimmter Substrate verfügbar (Greenfield and High, 1999). Allerdings kommt es bei der durch Lactacystin bedingten Akkumulation von gp48 im ERGIC nicht zur Bildung der für eine Mutante des CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) beschriebenen Aggresomen (Johnston et al., 1998). Diese Akkumulation fehlgefalteter Proteine in Kernnähe ist nicht membranassoziiert, allerdings sind die akkumulierten Proteine durch ihre Struktur gegen den Abbau von Trypsin teilweise geschützt. Kürzlich konnte auch mit Aggresomen assoziiertes funktionelles Proteasom nachgewiesen werden (Wigley et al., 1999). Die Daten zu gp48 zusammen mit den vorher beschriebenen Beobachtungen zur Lokalisation von MHC Klasse I-Molekülen und des Sec61 Translocons führen zu dem Schluss, dass auch das ERGIC ein Zellkompartiment repräsentiert, von dem aus Glykoproteine der proteasomalen Degradation zugeführt werden können. Vielleicht bestimmen unterschiedliche Degradationskinetiken den Ort in der Zelle, von dem aus das jeweilige Substrat der proteasomalen Degradation zugeführt wird.

4.4 Die Rolle des cytoplasmatischen Anteils von gp48 als Angriffspunkt für das Proteasom und die Ubiquitinierung

Versuche in der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass bei freiem gp48 nicht nur die Degradation, sondern auch der Transport aus dem ER/ERGIC-Kompartiment abhängig ist von einem funktionsfähigen Proteasom. Um zu testen, ob der cytoplasmatische Anteil von gp48 direkt als Angriffspunkt für das cytosolische Proteasom dient oder indirekt durch Ubiquitinierung für den Membrantransport notwendig ist, wurde die ERAD der Mutante gp48 Δ CT untersucht. Überraschenderweise verhielt sich diese Mutante in Bezug auf die Degradationskinetik und die Stabilisation des Proteins in Gegenwart von Lactacystin wie das Gesamtprotein. gp48 Δ CT wird genauso schnell und effektiv abgebaut wie *m06/gp48* und verbleibt in Gegenwart eines nicht funktionsfähigen Proteasoms in seiner Endo H-sensitiven Form in der Membran inseriert (Abb. 9). Dies zeigt, dass der cytoplasmatische Teil von gp48 nicht, wie für ein synthetisches Modellsubstrat basierend auf *sec62* in Hefe beschrieben, als direkter Angriffspunkt für das Proteasom dient (Mayer et al., 1998). Für dieses Substrat konnte klar gezeigt werden, dass die Extraktion und Degradation direkt an der Membran stattfindet und der Transport des Substrats aus der Membran von der proteolytischen Aktivität des Proteasoms abhängt. Als Angriffspunkt für das Proteasom dient in diesem Fall der cytoplasmatische Anteil des Modellsubstrates. Auch der Transport der durch die HCMV Gene US2 und US11 zur proteasomalen Degradation bestimmten MHC Klasse I-Moleküle ist vom cytoplasmatischen Anteil der MHC Klasse I-Moleküle abhängig (Story et al., 1999). Entfernt man diesen Teil des Moleküls, so wird das Substrat trotz Bindung an US2 oder US11 nicht mehr aus dem ER transportiert. Während in diesen

Beispielen die Substraterkennung und der Transport des Substrats vom cytoplasmatischen Anteil des jeweiligen Proteins abhängig sind, spielt dieser Bereich bei der proteasomalen Degradation von gp48 keine erkennbare Rolle.

Der Transport für zur proteasomalen Degradation bestimmter Moleküle kann auch von der Ubiquitinierung abhängig sein. Die Retranslokation einer verkürzten Variante von Ribophorin I und auch die der CPY* Mutante aus der Hefe ist abhängig von einem funktionierenden Ubiquitinsystem (de Virgilio et al., 1998; Biederer et al., 1997). Allerdings handelt es sich hierbei um luminaire Proteine. Obwohl diese in ubiquitiniertes Form im Cytosol nachgewiesen werden konnten, ist nicht bekannt, ob für die Initiation des Transportes aus dem ER die direkte Ubiquitinierung des Substrats notwendig ist. Mit der Entfernung des cytoplasmatischen Anteils von gp48 wurde der im Cytosol lokalisierten Ubiquitinierungskaskade der potentielle Angriffspunkt auf gp48 genommen. Weiterhin konnte mit spezifischen Antikörpern gegen Ubiquitin kein ubiquitiniertes gp48 präzipitiert werden (Abb. 10). Obwohl die Ubiquitinierung als wichtiges Signal für die proteasomen-abhängige Degradation gilt (Ciechanover, 1998), gibt es inzwischen immer mehr Hinweise darauf, dass die Degradation bestimmter Substrate nicht unbedingt von einer direkten Ubiquitinierung abhängt (Chillaron and Haas, 2000; Yu and Kopito, 1999). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse schließen eine direkte Ubiquitinierung des viralen Proteins gp48 als Signal zur proteasomalen Degradation aus.

4.5 Die Rolle der Oligosaccharidseitenketten des Glykoproteins gp48 bei der proteasomalen Degradation.

Neben der Ubiquitinierung als Signal zur ERAD können auch N-gebundene Glykane und deren Prozessierung bei der proteasomalen Degradation eine Signalfunktion haben (Cacan and Verbert, 1999). Eine Schlüsselrolle in diesem Prozess spielt das ER-residente Chaperon Calnexin, welches monoglukosylierte Zuckeruntereinheiten der Glykoproteine erkennt (Ivessa et al., 1999). Nach der Bindung von Calnexin an ein monoglukosyliertes Substrat wird dieses wieder freigesetzt und kann, falls korrekt gefaltet, das ER verlassen. Wenn das von Calnexin freigesetzte Glykoprotein allerdings nicht korrekt gefaltet ist, kommt es zur erneuten Glukosylierung durch die UDP-Glc:Glykoprotein Glukosyltransferase und zur erneuten Bindung an Calnexin. Dieser Calnexin-Zyklus wird bis zu einer korrekten Faltung des Proteins durchgeführt oder endet in der proteasomalen Degradation. Liu und Kollegen haben gezeigt, dass die enzymatische Reaktion der Mannosidase I im Beispiel einer α -Antitrypsin-Mutante (AAT) das Bindeglied zwischen dem Calnexin-Zyklus und der ERAD des fehlgefalteten Proteins darstellt (Liu et al., 1999). In dieser Studie wurde auch festgestellt, dass die Dissoziation des neusynthetisierten AAT von Calnexin in der Gegenwart von Lactacystin gehemmt ist, was auf eine Signalrolle von Calnexin in der proteasomalen Degradation hinweist. Für eine Mutante von Ribophorin I konnte gezeigt werden, dass die Bindung an Calnexin die Degradationsrate des Substrats

durch das Proteasom heruntersetzt und so zu einer verlangsamten Degradation durch das Proteasom führt (de Virgilio et al., 1999). Wird die Bindung an Calnexin verhindert, z.B. durch den Inhibitor der Glukosidase I Castanospermin, wird die Degradationskinetik des Substrates nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse spiegeln sich in den Beobachtungen zur proteasomalen Degradation von gp48 wieder. Es konnte gezeigt werden, dass auch gp48 an Calnexin bindet (Reusch et al., 1999; Reusch, 2000). Weiterhin konnten bei der Verwendung spezifischer Inhibitoren gegen die zuckertrimmenden Enzyme im rauen ER die oben beschriebenen Beobachtungen bestätigt werden. Während die Behandlung mit Castanospermin (Inhibitor der Glukosidase I) oder Deoxynorjirimycin (Inhibitor der Glukosidase II) die Bindung von Calnexin an gp48 verhindert und somit keine Auswirkung auf die Degradationskinetik von gp48 zeigt, wird das virale Protein in Gegenwart von Deoxymannojirimycin (Inhibitor der Mannosidase I) stabilisiert (Abb. 11). Durch die fehlende Reaktion der Mannosidase I wird die Freisetzung des Substrates von Calnexin verhindert und somit die Degradationskinetik von gp48 verringert. Dieser Effekt kann durch die zusätzliche Inhibition des Proteasoms noch gesteigert werden. Leider konnte bis jetzt die Rolle von Calnexin und den Oligosacchariden in der Signalkette zur ERAD, noch nicht abschließend geklärt werden. Auch die Beobachtungen bei gp48 zeigen, dass diesem System eine bedeutsame Rolle zukommt.

4.6 In vitro System zur proteasomalen Degradation von gp48

Um zu überprüfen, ob die Degradation von freiem gp48 wirklich ausschließlich auf das Proteasom zurückzuführen ist, wurde ein System entwickelt, das es ermöglichen sollte, die proteasomale Degradation von gp48 mit definierten Komponenten *in vitro* nachzuvollziehen. Die bisher bekannten *in vitro* Systeme zur ERAD arbeiten entweder mit permeabilisierten Zellen oder geben als Proteasomenenthaltende Komponente Retikulozytenlysate zu (Qu et al., 1996b; Shinkman et al., 1997). In beiden Fällen bleibt die Problematik, dass entweder der Zustand nach Permeabilisierung der Zellen oder die Zusammensetzung des Retikulozytenlysates nicht eindeutig definiert werden kann und mit der Versuchsanordnung variiert. Die Zusammenarbeit mit der Gruppe von Peter Kloetzel in Berlin ermöglichte es, für die proteasomale Degradation von gp48 ein System zu entwickeln, das diese Schwierigkeiten minimiert. Aus Zelllinien, die stabil *m06* exprimierten, wurden Mikrosomen aus ER und Golgi aufgereinigt. Weiterhin wurden von Dr. Marion Schmidt aufgereinigtes 20S und 26S Proteasom zur Verfügung gestellt, das seine enzymatische Aktivität auch nach Präparation weitgehend bewahrt (Sijts et al., 2000). Durch Inkubation dieser Komponenten zusammen mit ATP konnte gezeigt werden, dass die Degradation von gp48 ausschließlich von einem funktionsfähigen Proteasom abhängig ist und keine weiteren Komponenten notwendig waren, um das in den Mikrosomen enthaltene freie gp48 abzubauen (Abb. 14). Die Degradationskinetik *in vitro* unterscheidet sich natürlich von der in Zellkultur, da in diesem System nur geringe Mengen an Proteasom zugegeben wurden, welches vorher in

aufwendigen Prozeduren aufgereinigt wurde. Dies spiegelt die quantitativen Verhältnisse in der Zelle nicht korrekt wieder.

Dieses System ermöglichte zudem den Beweis, dass der Transport von gp48 aus der Membran nur von der Gegenwart eines funktionsfähigen Proteasoms abhängt (Abb. 18). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass es neben gp48 ein weiteres Protein im ER geben muss, das als Signalvermittler zwischen Substrat und cytosolischem Proteasom dient. Auch die proteasomale Degradation der TCR- α -Untereinheit des T-Zellrezeptors scheint ein solches in *trans* agierendes Protein zu beinhalten. Yu und Kopito konnten zeigen, dass die Degradation von TCR- α zwar abhängig war von einem funktionierenden Ubiquitinierungssystem, allerdings fanden sie keine Hinweise auf die direkte Ubiquitinierung des Substrates (Yu et al., 1997; Yu and Kopito, 1999). Vielmehr führten ihre Ergebnisse zu dem Schluss, dass die Ubiquitinierung eines oder mehrerer mit dem Translocon assoziierter Proteine einen indirekten Effekt auf die Degradation des Substrates haben könnten, vielleicht durch die Rekrutierung von funktionellem Proteasom an das ER und die Öffnung des Transportkanals für das Substrat (Hamman et al., 1998). Ein guter Kandidat für ein solches in *trans* agierendes Protein ist das bereits zuvor beschriebene ER-residente Chaperon Calnexin, das während der Degradation einer luminalen Mutante von α 1-Antitrypsin ubiquitiniert wird (Qu et al., 1996a). Neben Calnexin beeinflusst auch die Bindung an das durch Stress induzierte Protein BiP die proteasomale Degradation verschiedener Substrate (Chillaron and Haas, 2000; de Virgilio et al., 1999). Hier bestimmt die Assoziation des Substrates mit BiP die Verweildauer des Substrates im ER. Die Dissoziation des Substrates von BiP und der Transport aus dem ER ist direkt mit der Funktion des Proteasoms gekoppelt. Im Hefesystem wurden die ER residenten Proteine HRD1p/Der3p identifiziert, die für den Rücktransport der für die ERAD markierten Substrate in das Cytosol essentiell sind (Bordallo et al., 1998; Bordallo and Wolf, 1999). Allerdings gibt es bis jetzt in höheren Eukaryonten keine identifizierten Homologe zu diesen Proteinen. Es bleibt also weiterhin zu prüfen, ob Calnexin oder auch BiP in der ERAD von gp48 eine Rolle in *trans* spielen.

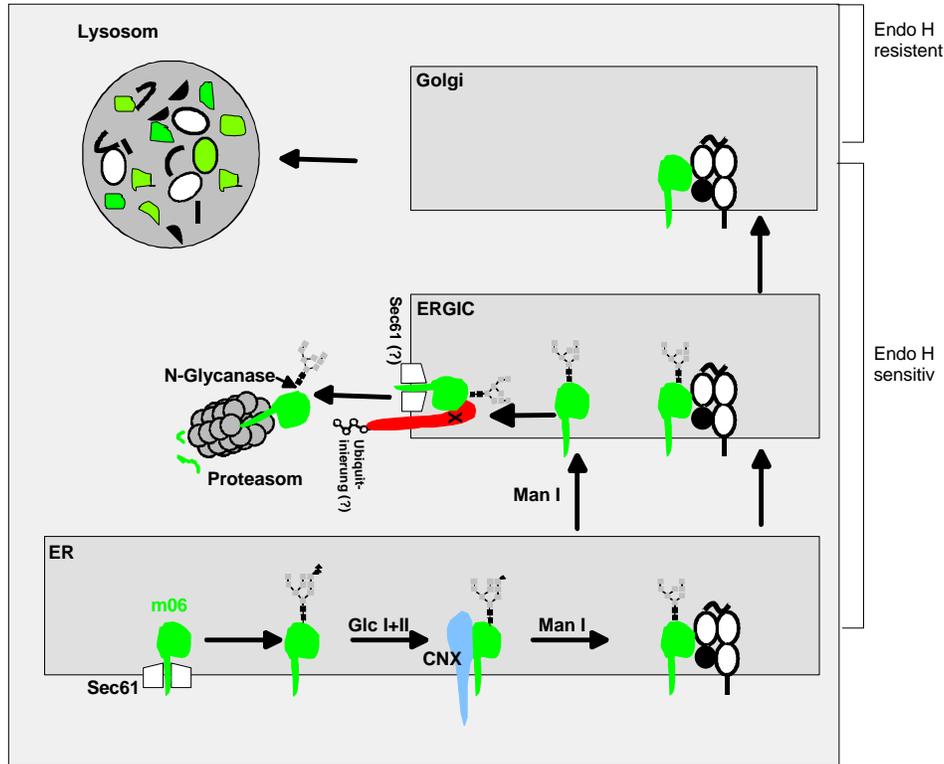


Abb. 18: Hypothetisches Modell zur proteasomalen Degradation von freiem gp48

gp48 (grün) wird kotranslational über das Sec61 Translocon in die ER-Membran inseriert und glykosyliert. Anschließend wird das angehängte Zucker-„Core“ durch die Glukosidase I+II (Glc I+II) prozessiert. Jetzt kann das Chaperon Calnexin (CNX, blau) binden und es kommt zur korrekten Faltung des Proteins im Calnexinzyklus. Normalerweise verlassen korrekt gefaltete Proteine nach der Freisetzung von Calnexin und der weiteren Prozessierung durch Mannosidase I (Man I) das ER/ERGIC Kompartiment. Wahrscheinlich bedingt durch ein Signal in der Transmembrandomäne verbleibt freies gp48 jedoch im ERGIC und wird der proteasomalen Degradation zugeführt. Signalgebend ist die Bindung an ein bisher unbekanntes Protein X (rot), welches abhängig von einem funktionsfähigen Proteasom den Rücktransport von gp48 ins Cytosol veranlasst. Dort wird das deglykosylierte Protein, dann durch das Proteasom degradiert. Es ist möglich, dass die signalgebende Funktion von X auf die Ubiquitinierung desselbigen zurückzuführen ist.

4.7 Die proteasomale Degradation von gp48 während der Infektion

Die Analysen zur proteasomalen Degradation von freiem gp48 wurden hauptsächlich in isolierter Expression in stabilen Zelllinien durchgeführt. Dieses System ist besonders dazu geeignet, die Funktion verschiedener Proteindomänen und die Wechselwirkung viraler Proteine mit zellulären Proteinen zu testen. Für die detaillierte Untersuchung der ERAD von freiem gp48 wurde daher die isolierte Expression des viralen Proteins gewählt. Allerdings spiegelt der Zustand in stabil-transfizierten Zelllinien nicht den physiologischen Zustand, der während der MCMV-Infektion der Zelle vorliegt, wieder. Man könnte annehmen, dass die beobachteten Vorgänge auf die Überexpression von gp48 in stabilen Zelllinien zurückzuführen sind und deshalb außer als Modell für die ERAD keine biologische Relevanz haben. Um zu testen, ob freies gp48 auch unter physiologischen Infektionsbedingungen, durch das

Proteasom degradiert wird, wurden NIH 3T3-Zellen mit MCMV infiziert und die Wirkung des proteasomalen Inhibitors Lactacystin getestet. Tatsächlich konnte festgestellt werden, dass gp48, welches nicht an MHC Klasse I-Moleküle gebunden ist, durch das Proteasom degradiert wird (Abb. 16). Aufgrund der entscheidenden Rolle von gp48 für die Oberflächenexpression von MHC Klasse I-Molekülen ist es verständlich, dass das Protein abundant und in großen Mengen exprimiert wird, um seine entscheidende Rolle mit Sicherheit zu gewährleisten. Die ERAD von überschüssigem gp48 ist also eine physiologische Reaktion der Zelle, um die Anhäufung von funktionsunfähigen Proteinen im ER zu verhindern. Allerdings interferieren Viren, wie bereits in der Einleitung erwähnt, über verschiedene Taktiken mit dem Proteasom und nutzen entweder dessen Proteaseaktivität für ihr Zwecke oder blockieren die Aktivität des Proteasoms um die Generierung antigener Peptide zu unterbinden (Jarrousse et al., 1999). So bindet das HBV-X Protein von HBV an die funktionellen Untereinheiten des Proteasoms und beeinträchtigt dadurch die Proteaseaktivität des Multienzymkomplexes (Seeger, 1997; Sirma et al., 1998; Zhang et al., 2000). Vielleicht ist auch die proteasomale Degradation von gp48 ein nützlicher Nebeneffekt für MCMV, da so die proteasomale Aktivität an einem irrelevanten Objekt gebunden wird und so die Generation viraler Antigene herabgesetzt wird. Dieser Sachverhalt muss allerdings noch überprüft werden, z.B. indem man die proteasomale Degradation von gp48 durch Einfügen eines Glycin-Alanin Motivs verhindert (Levitskaya et al., 1997) und den Effekt auf das Viruswachstum in der Zelle zu überprüfen.

5 Zusammenfassung

Die Cytomegalieviren haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um die Immunantwort des Wirtes zu umgehen. Eine Strategie ist, die MHC Klasse I-assoziierte Antigenpräsentation auf der Oberfläche infizierter Zellen zu verhindern. Neben *m152/gp40* und *m04/gp34* spielt das Genprodukt des *m06*-Gens des murinen Cytomegalievirus (MCMV) bei diesem Prozess eine entscheidende Rolle. *m06/gp48* ist ein Typ I-Transmembranglykoprotein und bindet im endoplasmatischen Retikulum (ER) an neusynthetisierte, β_2 -Mikroglobulin-assoziierte MHC Klasse I-Moleküle. Dieser Komplex wird nach dem Verlassen des ERs in die Lysosomen transportiert und dort rasch abgebaut. In Gegenwart endosomaler und lysosomaler Inhibitoren kommt es zu einer Akkumulation von MHC Klasse I- und *gp48*-Molekülen, die gegenüber Endoglykosidase H (Endo H)-resistent sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht an MHC Klasse I-Moleküle gebundenes *m06/gp48* durch das Proteasom abgebaut wird. Der proteasomale Abbau von freiem *m06/gp48* wurde im Detail untersucht. In Gegenwart spezifischer proteasomaler Inhibitoren wird *m06/gp48* in seiner Endo H-sensitiven Form stabilisiert, nicht aber MHC Klasse I-Moleküle. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Degradation von freiem *gp48* hauptsächlich im ER/“ER-cis-Golgi intermediate Compartment“ (ERGIC) der Zelle stattfindet und nicht, wie für andere Beispiele dokumentiert, direkt im ER. Durch die Kombination isolierter Mikrosomen aus *gp48*-exprimierenden Zellen mit aufgereinigtem Proteasom wurde ein *in vitro*-Modellsystem zur proteasomalen Degradation entwickelt. In diesem System konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der Transport von freiem *gp48* aus der Membran abhängig ist von einem funktionellen Proteasom. Die Untersuchung einer Deletionsmutante von *gp48* (*gp48 Δ CT*) ergab, dass die proteasomale Degradation von freiem *gp48* unabhängig vom cytoplasmatischen Anteil des Substrats erfolgt. Die Degradationskinetik, Lokalisation und das Verhalten der verkürzten Variante von *gp48* im *in vitro*-System war mit dem Gesamtprotein vergleichbar. Auch konnte die direkte Ubiquitinierung von *m06/gp48* als Signal für die proteasomale Degradation ausgeschlossen werden. Die Degradation von freiem *gp48* durch das Proteasom wird von der Zuckerprozessierung des Glykoproteins im ER beeinflusst. Versuche mit verschiedenen Inhibitoren der zuckerprozessierenden Enzyme im ER/ERGIC zeigten, dass die Degradation von freiem *gp48* von der enzymatischen Leistung der Mannosidase I abhängig ist. Wird diese durch einen spezifischen Inhibitor blockiert, ist der Abbau von freiem *gp48* verhindert. Die spezifische Inhibition anderer zuckerprozessierender Enzyme zeigt keinen Einfluss auf die Degradation von freiem *gp48*. Die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen

entstanden hauptsächlich in einem System mit stabil transfizierten Zelllinien. Die Resultate konnten jedoch auch in der Infektion von Zellen mit MCMV verifiziert werden.

Alle Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein weiteres ER/ERGIC-residentes Protein als Signalvermittler für den proteasomenabhängigen Transport von gp48 ins Cytosol dient. Mit dem beschriebenen *in vitro*-System besteht jetzt die Möglichkeit, weitere Komponenten der ER-assoziierten Degradation in höheren Eukaryonten zu identifizieren, da erstmals mit definierten Komponenten ein Modellsystem zur proteasomalen Degradation geschaffen wurde.

6 Literatur

Ahn,K., Angulo,A., Ghazal,P., Peterson,P.A., Yang,Y., and Fruh,K. (1996). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 10990-10995.

Ahn,K., Gruhler,A., Galocha,B., Jones,T.R., Wiertz,E.J., Ploegh,H.L., Peterson,P.A., Yang,Y., and Fruh,K. (1997). The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* *6*, 613-621.

Albrecht,T., Nachtigal,M., St-Jeor,S.C., and Rapp,F. (1976). Induction of cellular DNA synthesis and increased mitotic activity in syrian hamster embryo cells abortively infected with human cytomegalovirus. *J Gen Virol* *30*, 167-177.

Alcami,A. and Koszinowski,U.H. (2000). Viral mechanisms of immune evasion. *Trends Microbiol* *8*, 410-418.

Attaix,D., Combaret,L., Pouch,M.N., and Taillandier,D. (2001). Regulation of proteolysis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* *4*, 45-49.

Beraud,C. and Greene,W.C. (1996). Interaction of HTLV-I Tax with the human proteasome: implications for NF-kappa B induction. *J Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum Retrovirol.* *13 Suppl 1S76-84*, -84.

Biederer,T., Volkwein,C., and Sommer,T. (1997). Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* *278*, 1806-1809.

Bjorkman,P.J., Saper,M.A., Samraoui,B., Bennett,W.S., Strominger,J.L., and Wiley,D.C. (1987). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* *329*, 512-518.

Bonifacino,J.S., Cosson,P., and Klausner,R.D. (1990). Colocalized transmembrane determinants for ER degradation and subunit assembly explain the intracellular fate of TCR chains. *Cell* *63*, 503-513.

Boppana,S.B., Pass,R.F., Britt,W.J., Stagno,S., and Alford,C.A. (1992). Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J* *11*, 93-99.

- Bordallo,J., Plemper,R.K., Finger,A., and Wolf,D.H. (1998). Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded lumenal and integral membrane proteins. *Mol Biol Cell* 9, 209-222.
- Bordallo,J. and Wolf,D.H. (1999). A RING-H2 finger motif is essential for the function of Der3/Hrd1 in endoplasmic reticulum associated protein degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 448, 244-248.
- Borst,E.M., Hahn,G., Koszinowski,U.H., and Messerle,M. (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol* 73, 8320-8329.
- Britt,W.J. and Alford,C.A. (1996). Cytomegalovirus. In *Fields Virology*, B.N.Fields, D.M.Knipe, and P.M.Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers), pp. 2493-2523.
- Brodsky,J.L. and McCracken,A.A. (1997). ER-associated and proteasome-mediated protein degradation: How two topologically restricted events came together. *Trends-in-Cell-Biology*. 7, 151-156.
- Brody,A.R. and Craighead,J.E. (1974). Pathogenesis of pulmonary cytomegalovirus infection in immunosuppressed mice. *J Infect Dis* 129, 677-689.
- Brune,W., Menard,C., Hobom,U., Odenbreit,S., Messerle,M., and Koszinowski,U.H. (1999). Rapid identification of essential and nonessential herpesvirus genes by direct transposon mutagenesis [see comments]. *Nat Biotechnol*. 17, 360-364.
- Brune,W., Messerle,M., and Koszinowski,U.H. (2000). Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet* 16, 254-259.
- Burgert,H.G. and Kvist,S. (1985). An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens. *Cell* 41, 987-997.
- Burgert,H.G. and Kvist,S. (1987). The E3/19K protein of adenovirus type 2 binds to the domains of histocompatibility antigens required for CTL recognition. *EMBO J* 6, 2019-2026.
- Cacan,R. and Verbert,A. (1999). Free and N-linked oligomannosides as markers of the quality control of newly synthesized glycoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 1-5.

Chee,M.S., Bankier,A.T., Beck,S., Bohni,R., Brown,C.M., Cerny,R., Horsnell,T., Hutchison,C.A., Kouzarides,T., Martignetti,J.A., and et,a. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* 154, 125-169.

Chillaron,J. and Haas,I.G. (2000). Dissociation from BiP and retrotranslocation of unassembled immunoglobulin light chains are tightly coupled to proteasome activity. *Mol Biol Cell* 11, 217-226.

Chong,K.T. and Mims,C.A. (1981). Murine cytomegalovirus particle types in relation to sources of virus and pathogenicity. *J Gen Virol* 57, 415-419.

Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17, 7151-7160.

Coux,O., Tanaka,K., and Goldberg,A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65801-47, -47.

Dantuma,N.P., Heessen,S., Lindsten,K., Jellne,M., and Masucci,M.G. (2000). Inhibition of proteasomal degradation by the gly-Ala repeat of Epstein-Barr virus is influenced by the length of the repeat and the strength of the degradation signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 8381-8385.

de-Jong,M.D., Galasso,G.J., Gazzard,B., Griffiths,P.D., Jabs,D.A., Kern,E.R., and Spector,S.A. (1998). Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res* 39, 141-162.

de Virgilio,M., Kitzmuller,C., Schwaiger,E., Klein,M., Kreibich,G., and Ivessa,N.E. (1999). Degradation of a short-lived glycoprotein from the lumen of the endoplasmic reticulum: the role of N-linked glycans and the unfolded protein response. *Mol. Biol. Cell* 10, 4059-4073.

de Virgilio,M., Weninger,H., and Ivessa,N.E. (1998). Ubiquitination is required for the retrotranslocation of a short-lived luminal endoplasmic reticulum glycoprotein to the cytosol for degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 273, 9734-9743.

Degen,E. and Williams,D.B. (1991). Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *J. Cell Biol.* 112, 1099-1115.

- Elias,S., Bercovich,B., Kahana,C., Coffino,P., Fischer,M., Hilt,W., Wolf,D.H., and Ciechanover,A. (1995). Degradation of ornithine decarboxylase by the mammalian and yeast 26S proteasome complexes requires all the components of the protease. *Eur J Biochem* 229, 276-283.
- Enquist,L.W., Husak,P.J., Banfield,B.W., and Smith,G.A. (1998). Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv. Virus Res.* 51237-347, -347.
- Enright,H., Haake,R., Weisdorf,D., Ramsay,N., McGlave,P., Kersey,J., Thomas,W., McKenzie,D., and Miller,W. (1993). Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation. Risk factors and response to therapy. *Transplantation* 55, 1339-1346.
- Fenteany,G., Standaert,R.F., Reichard,G.A., Corey,E.J., and Schreiber,S.L. (1994). A beta-lactone related to lactacystin induces neurite outgrowth in a neuroblastoma cell line and inhibits cell cycle progression in an osteosarcoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 3358-3362.
- Gershon,A.A., Sherman,D.L., Zhu,Z., Gabel,C.A., Ambron,R.T., and Gershon,M.D. (1994). Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network. *J Virol* 68, 6372-6390.
- Gilbert,H.F. (1997). Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J Biol Chem* 272, 29399-29402.
- Granzow,H., Weiland,F., Jons,A., Klupp,B.G., Karger,A., and Mettenleiter,T.C. (1997). Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J Virol* 71, 2072-2082.
- Greenfield,J.J. and High,S. (1999). The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment. *J. Cell Sci.* 112, -86.
- Gutermann, A. MCMV interferiert mit der MHC Klasse I-Antigenpräsentation: Untersuchungen zur Speziespezifität und zur Interaktion der viralen Effektormoleküle während der Virusinfektion. 2001. Dissertation
- Hahn,G., Jores,R., and Mocarski,E.S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3937-3942.
- Hamilton,J.D. and Seaworth,B.J. (1985). Transmission of latent cytomegalovirus in a murine kidney tissue transplantation model. *Transplantation* 39, 290-296.

- Hamman,B.D., Hendershot,L.M., and Johnson,A.E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92, 747-758.
- Hammond,C. and Helenius,A. (1995). Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 523-529.
- Hanshaw,J.B. and Dudgeon,J.A. (1978a). Congenital cytomegalovirus. *Major. Probl. Clin Pediatr* 1797-152, -152.
- Hanshaw,J.B. and Dudgeon,J.A. (1978b). Viral diseases of the fetus and newborn. Introduction. *Major. Probl. Clin Pediatr* 171-9, -9.
- Hemelaar,J., Bex,F., Booth,B., Cerundolo,V., McMichael,A., and Daenke,S. (2001). Human t-cell leukemia virus type 1 tax protein binds to assembled nuclear proteasomes and enhances their proteolytic activity. *J Virol* 75, 11106-11115.
- Hengel,H., Koopmann,J.O., Flohr,T., Muranyi,W., Goulmy,E., Hammerling,G.J., Koszinowski,U.H., and Momburg,F. (1997). A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity* 6, 623-632.
- Hengel,H., Reusch,U., Gutermann,A., Ziegler,H., Jonjic,S., Lucin,P., and Koszinowski,U.H. (1999). Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse. *Immunol Rev* 168, 167-176.
- Hershko,A. and Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67425-79, -79.
- Hill,A. and Ploegh,H. (1995). Getting the inside out: the transporter associated with antigen processing (TAP) and the presentation of viral antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 341-343.
- Hiller,M.M., Finger,A., Schweiger,M., and Wolf,D.H. (1996). ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273, 1725-1728.
- Hochstrasser,M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30405-39, -39.
- Hudson,J.B. (1979). The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections. *Arch Virol* 62, 1-29.

- Hughes,E.A., Hammond,C., and Cresswell,P. (1997). Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 1896-1901.
- Irmiere,A. and Gibson,W. (1983). Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* *130*, 118-133.
- Ivessa,N.E., Kitzmuller,C., and de Virgilio,M. (1999). ER-associated protein degradation inside and outside of the endoplasmic reticulum. *Protoplasma* *207*, 16-23.
- Jarrousse,A.S., Gautier,K., Apcher,S., Badaoui,S., Boissonnet,G., Dadet,M.H., Henry,L., Bureau,J.P., Schmid,H.P., and Petit,F. (1999). Relationships between proteasomes and viral gene products. *Mol Biol Rep.* *26*, 113-117.
- Johnston,J.A., Ward,C.L., and Kopito,R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* *143*, 1883-1898.
- Jones,T.R., Hanson,L.K., Sun,L., Slater,J.S., Stenberg,R.M., and Campbell,A.E. (1995). Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol* *69*, 4830-4841.
- Jones,T.R. and Sun,L. (1997). Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol* *71*, 2970-2979.
- Jones,T.R., Wiertz,E.J., Sun,L., Fish,K.N., Nelson,J.A., and Ploegh,H.L. (1996). Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 11327-11333.
- Jonjic,S., Pavic,I., Lucin,P., Rukavina,D., and Koszinowski,U.H. (1990). Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J Virol* *64*, 5457-5464.
- Jonjic,S., Pavic,I., Polic,B., Crnkovic,I., Lucin,P., and Koszinowski,U.H. (1994). Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med* *179*, 1713-1717.

Kavanagh,D.G., Gold,M.C., Wagner,M., Koszinowski,U.H., and Hill,A.B. (2001). The multiple immune-evasion genes of murine cytomegalovirus are not redundant: m4 and m152 inhibit antigen presentation in a complementary and cooperative fashion. *J. Exp. Med.* *194*, 967-978.

Klausner,R.D. and Sitia,R. (1990). Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell* *62*, 611-614.

Kleijnen,M.F., Huppa,J.B., Lucin,P., Mukherjee,S., Farrell,H., Campbell,A.E., Koszinowski,U.H., Hill,A.B., and Ploegh,H.L. (1997). A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J* *16*, 685-694.

Kozlowski,L., Stoklosa,T., Omura,S., Wojcik,C., Wojtukiewicz,M.Z., Worowski,K., and Ostrowska,H. (2001). Lactacystin inhibits cathepsin A activity in melanoma cell lines. *Tumour. Biol.* *22*, 211-215.

LaFemina,R. and Hayward,G.S. (1986). Constitutive and retinoic acid-inducible expression of cytomegalovirus immediate-early genes in human teratocarcinoma cells. *J Virol* *58*, 434-440.

LaFemina,R.L. and Hayward,G.S. (1983). Replicative forms of human cytomegalovirus DNA with joined termini are found in permissively infected human cells but not in non-permissive Balb/c-3T3 mouse cells. *J Gen Virol* *64*, -89.

Le Borgne,R. and Hoflack,B. (1998). Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1404*, 195-209.

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

Liu,Y., Choudhury,P., Cabral,C.M., and Sifers,R.N. (1999). Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome. *J Biol. Chem.* *274*, 5861-5867.

Maniatis,T., Fritsch,E.F., and Sambrook,J.T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor laboratory).

- Matlack,K.E., Misselwitz,B., Plath,K., and Rapoport,T.A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* *97*, 553-564.
- Matlack,K.E., Mothes,W., and Rapoport,T.A. (1998). Protein translocation: tunnel vision. *Cell* *92*, 381-390.
- Mayer,T.U., Braun,T., and Jentsch,S. (1998). Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein. *EMBO J* *17*, 3251-3257.
- Mayo,D.R., Armstrong,J.A., and Ho,M. (1977). Reactivation of murine cytomegalovirus by cyclophosphamide. *Nature* *267*, 721-723.
- McKinsey,T.A., Brockman,J.A., Scherer,D.C., Al-Murrani,S.W., Green,P.L., and Ballard,D.W. (1996). Inactivation of IkappaBbeta by the tax protein of human T-cell leukemia virus type 1: a potential mechanism for constitutive induction of NF-kappaB. *Mol Cell Biol* *16*, 2083-2090.
- Messerle,M., Crnkovic,I., Hammerschmidt,W., Ziegler,H., and Koszinowski,U.H. (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 14759-14763.
- Meyers,J.D. (1984). Cytomegalovirus infection following marrow transplantation: risk, treatment, and prevention. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* *20*, 101-117.
- Mocarski-ES,J. (1996). Cytomeglaovirus and their replication. In *Fields Virology*, B.N.Fields, D.M.Knipe, and P.M.Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers), pp. 2447-2492.
- Moremen,K.W., Touster,O., and Robbins,P.W. (1991). Novel purification of the catalytic domain of Golgi alpha-mannosidase II. Characterization and comparison with the intact enzyme. *J. Biol. Chem.* *266*, 16876-16885.
- Moskowitz,L., Hensley,G.T., Chan,J.C., and Adams,K. (1985). Immediate causes of death in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* *109*, 735-738.
- Murakami,Y., Matsufuji,S., Kameji,T., Hayashi,S., Igarashi,K., Tamura,T., Tanaka,K., and Ichihara,A. (1992a). Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* *360*, 597-599.

- Murakami,Y., Matsufuji,S., Miyazaki,Y., and Hayashi,S. (1992b). Destabilization of ornithine decarboxylase by transfected antizyme gene expression in hepatoma tissue culture cells. *J Biol Chem* 267, 13138-13141.
- Myung,J., Kim,K.B., and Crews,C.M. (2001). The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med. Res. Rev.* 21, 245-273.
- Ortmann,B., Copeman,J., Lehner,P.J., Sadasivan,B., Herberg,J.A., Grandea,A.G., Riddell,S.R., Tampe,R., Spies,T., Trowsdale,J., and Cresswell,P. (1997). A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 277, 1306-1309.
- Parkinson,J. and Everett,R.D. (2000). Alphaherpesvirus proteins related to herpes simplex virus type 1 ICP0 affect cellular structures and proteins. *J Virol* 74, 10006-10017.
- Pilon,M., Schekman,R., and Romisch,K. (1997). Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J.* 16, 4540-4548.
- Plempner,R.K., Bohmler,S., Bordallo,J., Sommer,T., and Wolf,D.H. (1997). Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388, 891-895.
- Plempner,R.K., Egner,R., Kuchler,K., and Wolf,D.H. (1998). Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J Biol. Chem.* 273, 32848-32856.
- Ploegh,H.L. (1998). Viral strategies of immune evasion. *Science* 280, 248-253.
- Qu,D., Teckman,J.H., Omura,S., and Perlmutter,D.H. (1996a). Degradation of a mutant secretory protein, alpha1-antitrypsin Z, in the endoplasmic reticulum requires proteasome activity. *J Biol Chem* 271, 22791-22795.
- Qu,D., Teckman,J.H., Omura,S., and Perlmutter,D.H. (1996b). Degradation of a mutant secretory protein, alpha1-antitrypsin Z, in the endoplasmic reticulum requires proteasome activity. *J. Biol. Chem.* 271, 22791-22795.
- Radsak,K., Eickmann,M., Mockenhaupt,T., Bogner,E., Kern,H., Eis-Hubinger,A., and Reschke,M. (1996). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol* 141, 557-572.

- Raposo,G., van,S.H., Leijendekker,R., Geuze,H.J., and Ploegh,H.L. (1995). Misfolded major histocompatibility complex class I molecules accumulate in an expanded ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Biol.* *131*, 1403-1419.
- Rawlinson,W.D., Farrell,H.E., and Barrell,B.G. (1996). Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol* *70*, 8833-8849.
- Reddehase,M.J., Balthesen,M., Rapp,M., Jonjic,S., Pavic,I., and Koszinowski,U.H. (1994). The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J Exp Med* *179*, 185-193.
- Reddehase,M.J., Jonjic,S., Weiland,F., Mutter,W., and Koszinowski,U.H. (1988). Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *J Virol* *62*, 1061-1065.
- Reddehase,M.J., Weiland,F., Munch,K., Jonjic,S., Luske,A., and Koszinowski,U.H. (1985b). Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J Virol* *55*, 264-273.
- Reddehase,M.J., Weiland,F., Munch,K., Jonjic,S., Luske,A., and Koszinowski,U.H. (1985a). Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* *55*, 264-273.
- Reusch, U. Die MHC Klasse I-regulatorische Funktion des 48 kDa Glykoproteins des murinen Cytomegalievirus. 2000. Dissertation
- Reusch,U., Muranyi,W., Lucin,P., Burgert,H.G., Hengel,H., and Koszinowski,U.H. (1999). A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J.* *18*, 1081-1091.
- Rodan,A.R., Simons,J.F., Trombetta,E.S., and Helenius,A. (1996). N-linked oligosaccharides are necessary and sufficient for association of glycosylated forms of bovine RNase with calnexin and calreticulin. *EMBO J.* *15*, 6921-6930.
- Roizman,B. (1996). Herpesviridae. In *Fields Virology*, B.N.Fields, D.M.Knipe, and P.M.Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers), pp. 2221-2230.

- Sadasivan,B., Lehner,P.J., Ortmann,B., Spies,T., and Cresswell,P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5, 103-114.
- Saraste,J. and Svensson,K. (1991). Distribution of the intermediate elements operating in ER to Golgi transport. *J Cell Sci* 100, 415-430.
- Schubert,U., Anton,L.C., Bacik,I., Cox,J.H., Bour,S., Bennink,J.R., Orłowski,M., Strebel,K., and Yewdell,J.W. (1998). CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J Virol* 72, 2280-2288.
- Seeger,C. (1997). The hepatitis B virus X protein: the quest for a role in viral replication and pathogenesis. *Hepatology* 25 , 496-498.
- Shenkman,M., Ayalon,M., and Lederkremer,G.Z. (1997). Endoplasmic reticulum quality control of asialoglycoprotein receptor H2a involves a determinant for retention and not retrieval. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 11363-11368.
- Sijts,A.J., Ruppert,T., Rehmann,B., Schmidt,M., Koszinowski,U., and Kloetzel,P.M. (2000). Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J. Exp. Med.* 191, 503-514.
- Sirma,H., Weil,R., Rosmorduc,O., Urban,S., Israel,A., Kremsdorf,D., and Brechot,C. (1998). Cytosol is the prime compartment of hepatitis B virus X protein where it colocalizes with the proteasome. *Oncogene* 16, 2051-2063.
- Skepper,J.N., Whiteley,A., Browne,H., and Minson,A. (2001). Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment – deenvelopment- reenvelopment pathway. *J. Virol.* 75, 5697-5702.
- Smith,M.A. and Brennessel,D.J. (1994). Cytomegalovirus. *Infect Dis Clin North Am* 8, 427-438.
- Soderberg-Naucler,C., Fish,K.N., and Nelson,J.A. (1997). Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 91, 119-126.
- Stagno,S., Pass,R.F., Cloud,G., Britt,W.J., Henderson,R.E., Walton,P.D., Veren,D.A., Page,F., and Alford,C.A. (1986). Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* 256, 1904-1908.

Stagno,S., Pass,R.F., Dworsky,M.E., and Alford,C.A. (1982). Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. *Clin Obstet. Gynecol.* 25, 563-576.

Stagno,S. and Whitley,R.J. (1985). Herpesvirus infections of pregnancy. Part I: Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 313, 1270-1274.

Stevens,T.L., Blum,J.H., Foy,S.P., Matsuuchi,L., and DeFranco,A.L. (1994). A mutation of the mu transmembrane that disrupts endoplasmic reticulum retention. Effects on association with accessory proteins and signal transduction. *J. Immunol.* 152, 4397-4406.

Stoddart,C.A., Cardin,R.D., Boname,J.M., Manning,W.C., Abenes,G.B., and Mocarski,E.S. (1994). Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J Virol* 68, 6243-6253.

Story,C.M., Furman,M.H., and Ploegh,H.L. (1999). The cytosolic tail of class I MHC heavy chain is required for its dislocation by the human cytomegalovirus US2 and US11 gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8516-8521.

Suh,W.K., Mitchell,E.K., Yang,Y., Peterson,P.A., Waneck,G.L., and Williams,D.B. (1996). MHC class I molecules form ternary complexes with calnexin and TAP and undergo peptide-regulated interaction with TAP via their extracellular domains. *J. Exp. Med.* 184, 337-348.

Tabas,I. and Kornfeld,S. (1979). Purification and characterization of a rat liver Golgi alpha-mannosidase capable of processing asparagine-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* 254, 11655-11663.

Tarentino,A.L. and Plummer,T.H. (1994). Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enzymol.* 23044-57, -57.

Thale,R., Szepan,U., Hengel,H., Geginat,G., Lucin,P., and Koszinowski,U.H. (1995). Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class I molecule transport. *J Virol* 69, 6098-6105.

Trombetta,E.S. and Helenius,A. (1998). Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 587-592.

Van-Sant,C., Hagglund,R., Lopez,P., and Roizman,B. (2001). The infected cell protein 0 of herpes simplex virus 1 dynamically interacts with proteasomes, binds and activates the cdc34 E2 ubiquitin-conjugating enzyme, and possesses in vitro E3 ubiquitin ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 8815-8820.

van Genderen,I.L., Brandimarti,R., Torrisi,M.R., Campadelli,G., and van Meer,G. (1994). The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology* *200*, 831-836.

Voges,D., Zwickl,P., and Baumeister,W. (1999). The 26S Proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 1015-1068.

Wagner and Koszinowski, U. H. Mutagenesis of viral BAC plasmids with linear DNA fragments (ET recombination). *Methods in Molecular Biology* . 2001, In Press

Wagner, M. Entwicklung von Mutageneseverfahren für klonierte Cytomegalovirusgenome. 2000. Dissertation

Wagner,M., Jonjic,S., Koszinowski,U.H., and Messerle,M. (1999). Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* *73*, 7056-7060.

Walter,P. and Johnson,A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* *10*, 87-119.

Whealy,M.E., Card,J.P., Meade,R.P., Robbins,A.K., and Enquist,L.W. (1991). Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycosylation and virus egress. *J Virol* *65*, 1066-1081.

Wiertz,E.J., Jones,T.R., Sun,L., Bogyo,M., Geuze,H.J., and Ploegh,H.L. (1996a). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* *84*, 769-779.

Wiertz,E.J., Tortorella,D., Bogyo,M., Yu,J., Mothes,W., Jones,T.R., Rapoport,T.A., and Ploegh,H.L. (1996b). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction [see comments]. *Nature* *384*, 432-438.

Wigley,W.C., Fabunmi,R.P., Lee,M.G., Marino,C.R., Muallem,S., DeMartino,G.N., and Thomas,P.J. (1999). Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J Cell Biol.* *145*, 481-490.

- Yang,M., Omura,S., Bonifacino,J.S., and Weissman,A.M. (1998). Novel aspects of degradation of T cell receptor subunits from the endoplasmic reticulum (ER) in T cells: importance of oligosaccharide processing, ubiquitination, and proteasome-dependent removal from ER membranes. *J. Exp. Med.* *187*, 835-846.
- Yu,H., Kaung,G., Kobayashi,S., and Kopito,R.R. (1997). Cytosolic degradation of T-cell receptor alpha chains by the proteasome. *J Biol Chem* *272*, 20800-20804.
- Yu,H. and Kopito,R.R. (1999). The role of multiubiquitination in dislocation and degradation of the alpha subunit of the T cell antigen receptor. *J Biol Chem* *274*, 36852-36858.
- Zapun,A., Jakob,C.A., Thomas,D.Y., and Bergeron,J.J. (1999). Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure. Fold. Des* *7*, R173-R182.
- Zhang,Z., Torii,N., Furusaka,A., Malayaman,N., Hu,Z., and Liang,T.J. (2000). Structural and functional characterization of interaction between hepatitis B virus X protein and the proteasome complex. *J Biol Chem* *275*, 15157-15165.
- Zhu,Z., Gershon,M.D., Hao,Y., Ambron,R.T., Gabel,C.A., and Gershon,A.A. (1995). Envelopment of varicella-zoster virus: targeting of viral glycoproteins to the trans-Golgi network. *J Virol* *69*, 7951-7959.
- Ziegler,H., Muranyi,W., Burgert,H.G., Kremmer,E., and Koszinowski,U.H. (2000). The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules. *EMBO J* *19*, 870-881.
- Ziegler,H., Thale,R., Lucin,P., Muranyi,W., Flohr,T., Hengel,H., Farrell,H., Rawlinson,W., and Koszinowski,U.H. (1997). A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* *6*, 57-66.
- Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* *248*, 701-702.
- Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C. (1979). MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol* *27*:1-177, -177.

7 Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

β_2m	β_2 -Mikroglobulin
aa	Aminosäure(n)
Abb	Abbildung
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
AIDS	“acquired immune deficiency syndrome“
APC	“antigen presenting cell“
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	“American type culture collection“
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	“bacterial artificial chromosome“
BiP	“immunoglobulin binding protein“
bp	Basenpaare
CD	„cluster of differentiation“
Ci	Curie
CMV	Cytomegalovirus
CNX	Calnexin
Cpm	“counts per minute“
CROMA	“croatia monoclonal antibody“
CT	“cytoplasmic tail“
CTL	cytotoxische T Lymphozyten
Cys	Cystein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	“Dulbecco´s modified Eagle medium“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EBNA	“Epstein-Barr virus nuclear antigen“
EBV	Epstein-Barr Virus
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation

ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoresceinisocyanat
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
hc	MHC Klasse I schwere Kette („heavy chain“)
HCMV	humanes CMV
HHV-6, 7, 8	Humanes Herpesvirus-6, 7, 8
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HOAc	Essigsäure
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin
INM	Innere Kernmembran
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
lg	Logarithmus mit der Basis 10
M	Molar
ml	Mililiter
mM	milimolar
m.o.i.	“multiplicity of infection”
mAk	monoklonaler Antikörper
MCMV	murines CMV
MEF	murine embryonale Fibroblasten
Met	Methionin
MetOH	Methanol
MHC	“major histocompatibility complex”
N	Asparagin
Nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen

p.i.	„post infection“
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
PDI	Proteindisulfidisomerase
pfu	plaques forming units
pp	Phosphoprotein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylphosphat
TAP	“transporter associated with antigen presentation”
TcR	T-Zell Rezeptor
TE	Tris/EDTA
TM	Transmembranregion
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Einheiten
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VZV	Varicella zoster Virus
w/v	Gewicht/Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Bubeck, A., Reusch, U., Wagner, M., Ruppert, T., Muranyi, W., Kloetzel, P.M., and Koszinowski, U.H. (2002) The glycoprotein gp48 of murine Cytomegalovirus: proteasome-dependent cytosolic dislocation and degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277

Weitere Veröffentlichungen:

Sommer, R.J., Eizinger, A., Lee, K.Z., Jungblut, B., Bubeck, A., and Schlak, I. (1998)
The *Pristionchus* HOX gene *Ppa-lin-39* inhibits programmed cell death to specify the vulva equivalence group and is not required during vulval induction. *Development* 125; 3865-3873

Gutermann, A., Bubeck, A., Wagner, M., Reusch, U., Menard, C., and Koszinowski, U.H. (2002)
Strategies for the identification and analysis of viral immune evasion genes- Cytomegalovirus as an example. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. In Druck.

9 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Koszinowski für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit, die großzügige Bereitstellung aller Mittel und die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Bei Frau Prof. Hemleben, Universität Tübingen, bedanke ich mich herzlich für die Vertretung der Arbeit an der Universität Tübingen.

Bei Dr. Thomas Ruppert bedanke ich mich für die Betreuung und technischen Ratschläge im ersten Teil meiner Promotion. Ganz besonderer Dank gilt Dr. Uwe Reusch für die praktische Betreuung der Arbeit, da ohne seine Hilfe und Anregungen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Bei Dr. Walter Muranyi bedanke ich mich für die Unterstützung bei den Immunfluoreszenzfärbungen und der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie. Bei Dr. Marion Schmidt möchte ich mich für die Bereitstellung der aufgereinigten Proteasomen bedanken. Dr. Brigitte Rupp, Dr. Markus Wagner und Dr. Uwe Reusch danke ich für die Korrektur des Manuskripts.

Weiterhin bedanke ich mich bei fast allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern am Genzentrum für das freundliche Arbeitsklima und die Unterstützung. Vor allem bei den Kollegen, die zu Freunden wurden: Andreas Elsing, Heike Ziegler, Uwe Reusch, Markus Wagner, Max Nunziante, Brigitte Rupp, Carine Menard und Christine Benz.

Ein besonders herzlicher Dank geht auch in das Sekretariat des Max-von-Pettenkofer Instituts zu Frau Adler und Frau Rinck.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern und meinen Freunden ohne deren Geduld und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Bubeck, Anja

An der Stemmerwiese 1
81377 München

10 Lebenslauf

Name: Anja Bubeck

Geburtstag: 27.02.1973

Geburtsort: Heilbronn/Neckar

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1979-1983
Grund-und Hauptschule, Flein

1983-1992
Justinus-Kerner-Gymnasium, Heilbronn

Schulabschluss: allgemeine Hochschulreife

Studium: 1992-1997
Biologiestudium an der Eberhard-Karls-
Universität, Tübingen

1997-1998
Diplomarbeit am Max-Planck Institut für
Entwicklungsbiologie, Tübingen,
bei Herrn Prof. Hausen

Abschluss: Diplom

Doktorarbeit: 1998-heute
Beginn der Promotion bei Herrn Prof. Koszinowski an der
Ludwig-Maximilians Universität München im Max-von-
Pettenkofer Institut
Betreut von Frau Prof. Hemleben an der Eberhard-Karls
Universität Tübingen