

Aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Kommissarischer Direktor: Univ.-Prof. Dr. Ingo Drexler

NeTT ,*New Tapasin Transcript*‘, ein neuer endogener
Inhibitor des MHC I Antigen Präsentationswegs

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Nele Segarra Pedrola (geb. Beutler)

2015

„Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. Hengel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uhrberg

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Beutler N., Hauka S., Niepel A., Kowalewski D.J., Uhlmann J., Ghanem E., Erkelenz S., Wiek C., Hanenberg H., Schaal H., Stevanovic S., Springer S., Momburg F., Hengel H., Halenius A., 2013

A natural tapasin isoform lacking exon 3 modifies peptide loading complex function. *European Journal of Immunology*, (43) 1459-1469

Zusammenfassung

Das humane Zytomegalovirus (HCMV) hat verschiedene Strategien entwickelt, um der Elimination durch das Immunsystem zu entkommen. HCMV manipuliert auf besonders vielfältige Weise den MHC I Antigen Präsentationsweg, um so Effektorfunktionen der CD8⁺-T-Lymphozyten zu vermeiden. In unterschiedlichen humanen Zellen, vor allem aber in HCMV-infizierten Fibroblasten, konnte ein neu alternativ gespleißtes Tapasin (Tpn) Transkript (NeTT, Tpn Δ Exon3) mit unbekannter Funktion detektiert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob NeTT ein endogener Inhibitor des MHC I Antigen Präsentationswegs ist. Zunächst wurde analysiert, in wie weit NeTT ein Bestandteil des transienten Peptidbeladungskomplex (PLC) des Endoplasmatischen Retikulums ist. NeTT wurde kloniert, mittels unterschiedlicher Expressionssysteme exprimiert und als ein ca. 40 kDa großes Typ I Transmembranglykoprotein dargestellt. Während NeTT wie Tpn über den TAP-Transporter in den PLC integriert wird, kann NeTT durch das Fehlen von Exon 3 nicht mit ERp57 ein NeTT-ERp57-Heterodimer bilden. In Tpn-defizienten Zellen wurde eine schwache, jedoch nicht stabilisierende, Interaktion von NeTT mit den MHC I Molekülen nachgewiesen. Besonders für ein Tpn-abhängiges MHC I Allel, HLA-B*44:02, wurde ein divergentes Expressionsmuster beobachtet: In Tpn-defizienten Zellen konnte NeTT im Gegensatz zu Tpn die Oberflächenexpression der HLA-B*44:02 Moleküle nicht unterstützen. Bei simultaner Expression von Tpn und NeTT zeigte NeTT einen inhibierenden Effekt auf die Antigen Präsentation, auch wenn NeTT dabei nicht generell negativ agierte: In HeLa-Zellen, die transient mit NeTT und HLA-B*44:02 ko-transfiziert wurden, reduzierte NeTT, trotz endogener Tpn Expression, die Oberflächenexpression der HLA-B*44:02 Moleküle um 50%, während die Expression des Tpn-unabhängigen Allels HLA-B*44:05 unverändert blieb.

NeTT und Tpn binden gleichzeitig an denselben TAP-Komplex. Tpn verliert dadurch seine zweite Interaktionsstelle mit TAP, wodurch die Peptidbeladung eingeschränkt wird: Während auf der Tpn-Seite MHC I Moleküle mit Peptiden beladen werden, verhindert NeTT auf der anderen Seite die Peptidbeladung und inhibiert damit die erfolgreiche MHC I Antigen Präsentation Tpn-abhängiger MHC I Allele.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Der MHC I Antigen Präsentationsweg	2
1.3 Der Peptidbeladungskomplex.....	4
1.3.1 Generierung der Peptide und ihre Translokation	5
1.3.2 Der TAP-Komplex.....	6
1.3.3 Faltung von MHC I Molekülen im ER.....	7
1.3.4 Interaktionen innerhalb des PLC	8
1.3.5 Tapasin, Schlüsselprotein im PLC	9
1.3.6 Das Tapasin-ERp57 Heterodimer	10
1.3.7 HLA-B*44:02 und HLA-B*44:05.....	12
1.4 Herpesviren entkommen dem Immunsystem.....	13
2 Ziele der Doktorarbeit	15
3 Materialien	17
3.1 Geräte	17
3.2 Chemikalien und Kits	17
3.3 Medien, Puffer und Lösungen	19
3.4 SDS-Gele.....	21
3.5 Primer und Plasmide.....	21
3.6 Antikörper	23
3.7 Zelllinien und stabile Transfektanten	24
4 Methoden	25
4.1 Zellkultur, Einfrieren und Auftauen von Zellen	25

4.2	Klonierung und Herstellung von Plasmid	25
4.2.1	Klonierung	25
4.2.2	Restriktionsverdau	26
4.2.3	Isolierung der Fragmente im Agarosegel	26
4.2.4	Ligation des <i>gene of interest</i> mit dem Plasmid	27
4.2.5	DNA Transformation in kompetente <i>E.coli</i>	27
4.2.6	Plasmid Präparation	27
4.3	RNA Analysen.....	28
4.3.1	RNA Präparation	28
4.3.2	RT-PCR	28
4.4	Western Blot.....	29
4.4.1	Lysate.....	29
4.4.2	Gelelektrophorese.....	29
4.4.3	Blotting	29
4.4.4	Detektion.....	30
4.5	Immunopräzipitation	32
4.5.1	Immunopräzipitation von metabolisch markierten Proteinen	32
4.5.2	Analyse von Immunkomplexen durch wiederholte IP	33
4.5.3	IP von nicht markierten Proteinen	35
4.6	Durchflusszytometrie.....	35
4.7	Transfektion und stabile Zelllinien	36
4.7.1	Transfektion mit Superfect.....	36
4.7.2	Generierung stabiler Transfektanten	37
4.8	Lentivirales Expressionssystem	38
4.9	Tet-on System: induzierbare NeTT Expression.....	39
4.9.1	Molekularer Hintergrund	39
4.9.2	Selektionsverfahren.....	40
4.10	Konfokale Lasermikroskopie.....	42
5	Ergebnisse	43
5.1	Analyse der NeTT Transkription	43
5.2	Charakteristiken von NeTT	45
5.2.1	Das NeTT Transkript kodiert für ein „stabiles“ Protein.....	45
5.2.2	NeTT wird glykosyliert und ist im ER lokalisiert	46

5.2.3	Halbwertszeitbestimmung und Degradation	50
5.3	NeTT kann die MHC I Oberflächenexpression nicht unterstützen	55
5.4	Interaktionen zwischen NeTT und dem PLC	59
5.4.1	NeTT stabilisiert TAP, aber nicht die MHC I Expression	59
5.4.2	NeTT interagiert schwach mit ERp57 und Calreticulin.....	60
5.4.3	NeTT bindet stärker an TAP als Tapasin	63
5.4.4	Tapasin und NeTT binden gleichzeitig an einen TAP-Komplex	65
5.4.5	Kann NeTT Tapasin aus seiner Interaktion zu TAP verdrängen?.....	68
5.5	Der Einfluss von NeTT auf die MHC I Moleküle	70
5.5.1	NeTT beeinträchtigt die MHC I Stabilität	70
5.5.2	NeTT verzögert den MHC I Transport	73
5.6	NeTT beeinträchtigt die Funktion von Tapasin	75
6	Diskussion	78
6.1	Der NeTT-PLC	78
6.2	TAP vereint Tapasin und NeTT in einem PLC.....	81
6.3	NeTT inhibiert Tapasin im MHC I Antigen Präsentationsweg	83
6.4	Die biologische Rolle von NeTT	85
	Literaturverzeichnis	87
	Danksagung	IX
	Eidesstattliche Versicherung	IX

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: MHC I Antigen Präsentationsweg.	3
Abb. 2: Der PLC.	5
Abb. 3: Peptid Erkennungsanteile.	6
Abb. 4: Das MHC I Molekül.....	8
Abb. 5: Intron-Exon Organisation des Tapasin Gens.....	9
Abb. 6: Kristallstruktur des Tapasin-ERp57 Heterodimers.....	11
Abb. 7: Der Fluchtmechanismus.....	12
Abb. 8: Der RT-PCR Nachweis eines neuen Tapasin Transkript.	16
Abb. 9: Western Blot.	31
Abb. 10: IP metabolisch markierter Proteine.....	34
Abb. 11: Eingrenzung von Zellpopulationen im FACS.	36
Abb. 12: HeLa-44:02 Klone.	37
Abb. 13: TeT-ON Vektorsystem.	40
Abb. 14: Generierung stabiler HeLa-NeTT _{ind} -Zellen.	41
Abb. 15: Induzierte Amplifikation von NeTT in HCMV infizierten Zellen.	44
Abb. 16: NeTT kann in murinen Fibroblasten nicht nachgewiesen werden.	44
Abb. 17: Das NeTT Transkript kodiert ein „stabiles“ Protein.	46
Abb. 18: NeTT ist vollständig Endo H sensitiv.	47
Abb. 19: NeTT zeigt ein ER-ähnliches retikuläres Muster.	48
Abb. 20: Schematische Gegenüberstellung von Tapasin und NeTT.....	49
Abb. 21: Die Halbwertszeit von NeTT beträgt ungefähr 2 Stunden.	51
Abb. 22: Proteasomale Inhibition führt zur Akkumulation von NeTT.....	53
Abb. 23: BFA fördert die Degradation von NeTT.....	54
Abb. 24: NeTT unterstützt nicht die Oberflächenexpression von HLA-B*44:02.....	56

Abb. 25: Retention der HLA-B*44:02 Moleküle bei NeTT Expression im ER.....	58
Abb. 26: NeTT stabilisiert TAP1, aber nicht die MHC I Expression.....	60
Abb. 27: Ko-IP von NeTT nach IP von ERp57, TAP und CRT.....	62
Abb. 28: NeTT bindet stärker als Tapasin an TAP1.....	63
Abb. 29: NeTT präzipitiert TAP besser als Tapasin.	65
Abb. 30: PaSta.1 bindet nur an Tapasin, erkennt aber nicht NeTT.	66
Abb. 31: NeTT wird TAP abhängig präzipitiert.	67
Abb. 32: TAP Expression führt zur Ko-IP von NeTT durch PaSta.1.	68
Abb. 33: NeTT kann Tapasin nicht von TAP verdrängen.	69
Abb. 34: Die 41 kDa MHC I-HC interagiert stark mit Tapasin.....	71
Abb. 35: NeTT sorgt für eine verminderte Thermostabilität von MHC I Molekülen.....	73
Abb. 36: NeTT verzögert den Transport der HLA-B*44:02 Moleküle.....	74
Abb. 37: NeTT inhibiert die Funktion von Tapasin.	76
Abb. 38: Die HLA-B*44:02 Stabilisierung ist in Gegenwart von NeTT um 50% reduziert.	77
Abb. 39: Modell des alternativen PLC mit Tapasin und NeTT.	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Acrylamidgele.....	21
Tabelle 2: Verzeichnis der Primer und Plasmide.....	22
Tabelle 3: Verzeichnis der Antikörper.....	23
Tabelle 4: Verzeichnis der Zelllinien und stabilen Transfektanten	24

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper	Doxy	Doxyzyklin
AMP	Ampicillin	DTT	Dithiothreitol
APC	Antigen-präsentierende Zellen	E.coli	Escherichia Coli
AS	Aminosäure	EDTA	Ethylendiamintetraessig- säure
Asn	Asparaginsäure	Endo H	Endoglykosydase H
BLS	<i>bare lymphocyte Syn- drome</i>	EP	<i>Escape Pathway</i>
BFA	Brefeldin A	ER	Endoplasmatisches Retikulum
BP	Basenpaare	ERAP	ER-Aminopeptidase
bzw.	beziehungsweise	EtBr	Ethidiumbromid
CNX	Calnexin	Expres.Ktrl.	Expressions Kontrolle
COP	<i>coat protein complex</i>	FC	<i>crystallisable fragment</i>
CRT	Calreticulin	FCS	<i>Fetal calf serum</i>
CTL	CD8+ cytotoxische T- Lymphozyten	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Cys	Cystein	G418	Geneticinsulfat
DAPI	4',6-Diamidin-2- phenylindol	g	Gram
d.h.	das heißt	GAM	<i>goat anti Mouse</i>
DMEM	<i>Dulbeco modified eagle medium</i>	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	GOI	<i>Gene of interest</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	HC	<i>Heavy chain</i>
		HCMV	<i>human cytomegalovirus</i>
		HCl	Salzsäure

HHU	Heinrich-Heine-Universität	Min.	Minute
		Mio.	Million
HIS	Polyhistidin	MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>	NaCl	Kochsalzlösung
IF	Immunfluoreszenz	Neo	Neomycin
IFN	Interferon	NeTT	<i>New Tpn Transcript</i>
Ig	Immunglobulin	PAS	Protein A Sepharose
Ig-SF	Ig-Superfamilie	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
IP	Immunopräzipitation	PCR	Polymerase Kettenreaktion
kBP	kilo Basenpaare		
kDa	kilo Dalton	PGS	Protein G Sepharose
Ktrl.	Kontrolle	PLC	<i>Peptide loading complex</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>	Puro	Puromycin
LUC	Luciferase	RE-IP	zweifache IP
m	Milli (1/10 ³)	RNA	Ribonukleinsäure
M	Molarität, Teilchenmenge pro Volumen	rpm	<i>rounds per minute</i>
		RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
MCMV	<i>Mouse CMV</i>		
Met	Methionin	RT	Raumtemperatur
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>	RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
MG132	N-(benzyloxycarbonyl) leucinylleucinylleucinal	SDS	Natriumdodecylsulfat
		SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>	Sek.	Sekunde

Std.	Stunden	v/v	Volumen/Volumen
TA	Transaktivator	w/v	Gewicht/Volumen
Tag	Anhänger	WB	Western Blot
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>	wt	wildtyp
TBE	<i>Tris borat EDTA</i>	z.B.	zum Beispiel
TBST	<i>Tris buffered saline with tween</i>	ZP	Zeitpunkt
TCR	T-Zell-Rezeptor	β₂m	β ₂ Mikroglobulin
TEMED	Tetra- methylethylen-dia- min	μ	Mikro (1/10 ⁶)
TM	transmembran	°C	Grad Celsius
TMD	TM-Domäne		
TMS	TM-Segment		
Tpn	Tapasin		
TRE	<i>Tet-responsive element</i>		
Tris	Tris (hydroxymethyl) ami- nomethan		
u.a.	unter anderem		
ÜN	über Nacht		
ÜS	Überstand		
U	Unit		
US	<i>Unique short</i>		
UV	Ultraviolett		
V	Volt		

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem setzt sich aus unterschiedlich spezialisierten Zellklassen zusammen. Der Begriff leitet sich von dem lateinischen Wort *immunis* ab (frei von etwas) und bedeutet, dass das Immunsystem den Körper frei von Krankheiten hält. Die Körperoberfläche (Haut und Schleimhäute) dient als erste anatomische Barriere, welche die pathogenen Erreger überwinden müssen. Die nächste Hürde stellt die angeborene Immunabwehr dar. Sie wird durch die erworbene (adaptive) spezifische Immunabwehr ergänzt. Dringt ein Pathogen in den Körper ein werden im Rahmen der angeborenen Abwehr Zellen wie Makrophagen, natürliche Killerzellen und Granulozyten aktiviert, die in einer Initialphase versuchen das Pathogen zu eliminieren. Sie sezernieren dabei Botenstoffe, die das adaptive Immunsystem in Alarmbereitschaft versetzen, um gezielter auf das Pathogen reagieren zu können.

Die adaptive, sich auf das Pathogen anpassende, Immunantwort wird durch die Lymphozyten repräsentiert. Sie werden in den primären lymphatischen Organen (Thymus und Knochenmark) gebildet und gelangen von dort in das Blut- und Lymphsystem. Erst in den sekundären lymphatischen Organen (Milz, Schleimhäute und Lymphknoten) erlangen sie ihre vollständige Funktionalität.

Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt: B- und T-Lymphozyten. Auf humoraler Ebene sorgen B-Lymphozyten durch Bindung und Markierung bestimmter Antigen-Epitope für die Beseitigung löslicher und partikulärer pathogener Antigene, zum Beispiel (z.B.) Bakterien und Toxine. Dafür differenzieren sie zum einen zu Antikörper (AK) sezernierenden Plasmazellen und zum anderen zu langlebigen Gedächtniszellen. Bei einem Zweitkontakt mit dem gleichen Antigen können sie unmittelbar reaktiviert werden und damit schneller AK ausschütten, wodurch das Pathogen effektiver bekämpft und häufig eliminiert werden kann. So ermöglicht das „Gedächtnis“ des adaptiven Immunsystems die schützende Langzeitwirkung einer Impfung. Auf zellulärer Ebene spielen die T-Lymphozyten die Hauptrolle. Sie machen mit 70-80% den größten Anteil der Lymphozyten im peripheren Blut aus. T-Lymphozyten reagieren auf intrazelluläre Pathogene und transformierte Zellen. Während ihres Reifungsprozesses differenzieren sie zu $CD4^+$ -T-Helferzellen oder zu $CD8^+$ -zytotoxischen-T-Lymphozyten (CTL). Ihre Aktivierungssignale bekommen sie von

professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie z.B. dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten.

In den Körper eingedrungene Pathogene werden von den APC internalisiert, im Zellinneren durch Proteolyse prozessiert, fragmentiert und als Peptid-Liganden über bestimmte Antigen-präsentierende Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert. Diese Antigen-präsentierenden Moleküle (MHC, *major histocompatibility complex* oder HLA, *human leukocyte antigen*), können in zwei Gruppen eingeteilt werden. MHC Klasse II Moleküle aktivieren CD4⁺-T-Helferzellen, die Interleukine sezernieren, wodurch wiederum das humorale System aktiviert wird. MHC Klasse I Moleküle dagegen aktivieren die CTL, die die Zytolyse befallener Zielzellen herbeiführen. Während die MHC II Moleküle hauptsächlich von APC exprimiert werden, findet man die MHC I Moleküle auf fast allen kernhaltigen somatischen Zellen.

Auf Chromosom 6 sind drei Gene für polymorphe MHC I Moleküle lokalisiert: HLA-A, -B und -C. Sie werden ko-dominant exprimiert, sodass jedes Individuum drei bis sechs verschiedene MHC I Moleküle aufweist (Peaper und Cresswell 2008). Ein starker Aminosäure (AS)-Polymorphismus, besonders der AS, die mit den Peptid-Liganden in Kontakt treten, sorgt für die genetische Vielfalt. So unterscheidet sich jedes Individuum hinsichtlich der Zusammensetzung seiner MHC Moleküle. Diese Individualität kann aber auch nachteilig sein, sie ist eine der Ursachen für die Abstoßung allogener Organe in der Transplantationsmedizin. Bei dem sogenannten „*Host versus graft disease*“ greift das Immunsystem des Empfängers (*host*) das Transplantat (*graft*) an, auf dem körperfremde MHC Moleküle exprimiert und dadurch vom Organismus als fremd identifiziert werden (Schmidt und Thews 1997; Löffler und Petriedes 1997).

1.2 Der MHC I Antigen Präsentationsweg

Nachdem in der Initialphase der Immunreaktion ein immer ähnlich ablaufendes Muster abgespielt wird, agiert das adaptive Immunsystem auf humoraler und zellulärer Ebene weitaus spezifischer und differenzierter. Über den MHC I Antigen Präsentationsweg werden intrazelluläre Krankheitserreger wie Viren, aber auch maligne, mutierte, dem Körper „fremd“ gewordene Proteine als Peptid-Liganden auf MHC I Molekülen den CTL präsentiert (Abb. 1). Dafür werden diese viralen Proteine im Zytosol über das Proteasom zu Peptidfragmente degradiert (②) und über einen spezifischen Peptid-Transporter (TAP1/2) in der Membran des Endoplasmatische

Retikulum (ER) in dessen Lumen transportiert (③). Im Lumen des ERs werden die Peptide mit Hilfe des Peptidbeladungsmechanismus (PLC) auf die MHC I Moleküle geladen (④). Der Peptid-MHC I Komplex wird anschließend über COPII (*coat protein complex II*)-Vesikel (⑤) zur Zelloberfläche transportiert (Cho et al., 2011) und kann hier von den CTL mittels ihres spezifischen T-Zellrezeptors (TCR) erkannt werden (⑥). Wenn es zu einer Aktivierung der T-Zelle kommt, werden zytotoxische Substanzen freigesetzt, die die Zielzelle mitsamt des intrazellulären Erregers zerstören.

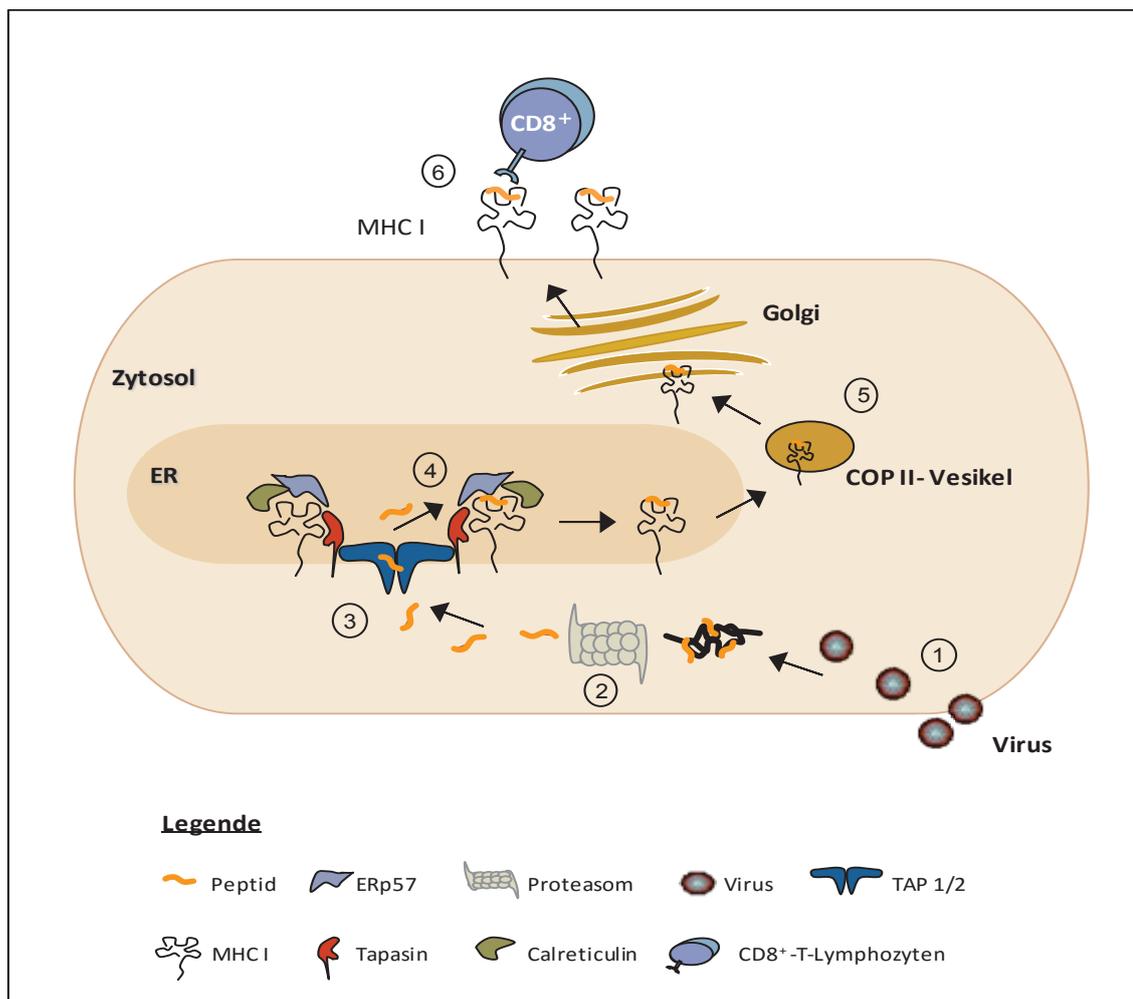


Abb. 1: MHC I Antigen Präsentationsweg.

Schematische Darstellung des MHC I Antigen Präsentationswegs. ① Das Virus dringt in die Zelle ein. ② Virale Proteine werden im Zytosol proteasomal in Peptidfragmente zerlegt und ③ über den TAP-Transporter in das ER transloziert. ④ Die Peptide werden auf MHC I Moleküle geladen und ⑤ mittels COP II Vesikel vom ER über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert. ⑥ Dort präsentieren sie das Antigen den CTL und führen so zur Immunantwort.

Ohne einen funktionierenden MHC I Antigen Präsentationsweg ist die immunologische Überwachung von Krankheitserregern und transformierten Zellen eingeschränkt. Dies wird beispielsweise deutlich anhand der selten auftretenden Erkrankung BLS (*bare lymphocyte syndrome*) Typ I. Bei dieser Erkrankung kommt es durch Mutationen im TAP1 und TAP2 Gen zu einer TAP-Defizienz, die eine reduzierte MHC I Expression beziehungsweise (bzw.) Stabilität zur Folge hat. Dadurch können unter anderem (u.a.) rezidivierende Atemwegsinfekte sowie granulomatöse Hauterkrankungen auftreten (Herold, 2009).

1.3 Der Peptidbeladungskomplex

Die MHC I Moleküle, die im ER durch den PLC mit Peptiden beladen werden, dienen an der Zelloberfläche als Erkennungsstruktur für den TCR der CTL (Pamer und Cresswell 1998). Der PLC stellt einen supermolekularen Komplex aus mehreren Proteinen dar (Abb. 2). Zu seinen Komponenten zählen Calreticulin (CRT), ERp57, Tpn, der heterodimere TAP-Komplex und die MHC I Heterodimere, die wiederum aus einer membrangebundenen schweren Kette (HC, *heavy chain*) und dem löslichen β_2 -Mikroglobulin (β_2m) bestehen (Ortmann et al., 1997; Wearsch und Cresswell 2007). Im Lumen des ERs werden neusynthetisierte MHC I-HC und β_2m Moleküle binnen Minuten (Min.) zu einem Heterodimer gefaltet, wobei die Chaperone Calnexin (CNX) und ERp57 diesem Prozess assistieren (Diedrich et al., 2001). Danach interagiert das MHC I Heterodimer mit dem PLC. Nach erfolgreicher Beladung kann sich das peptidbeladene MHC I Molekül aus dem PLC lösen und verlässt das ER. Ohne einen vollständigen PLC kann der Peptidbeladungsmechanismus nicht optimal ablaufen und die MHC I Moleküle werden nicht effektiv beladen (Garbi et al., 2003).

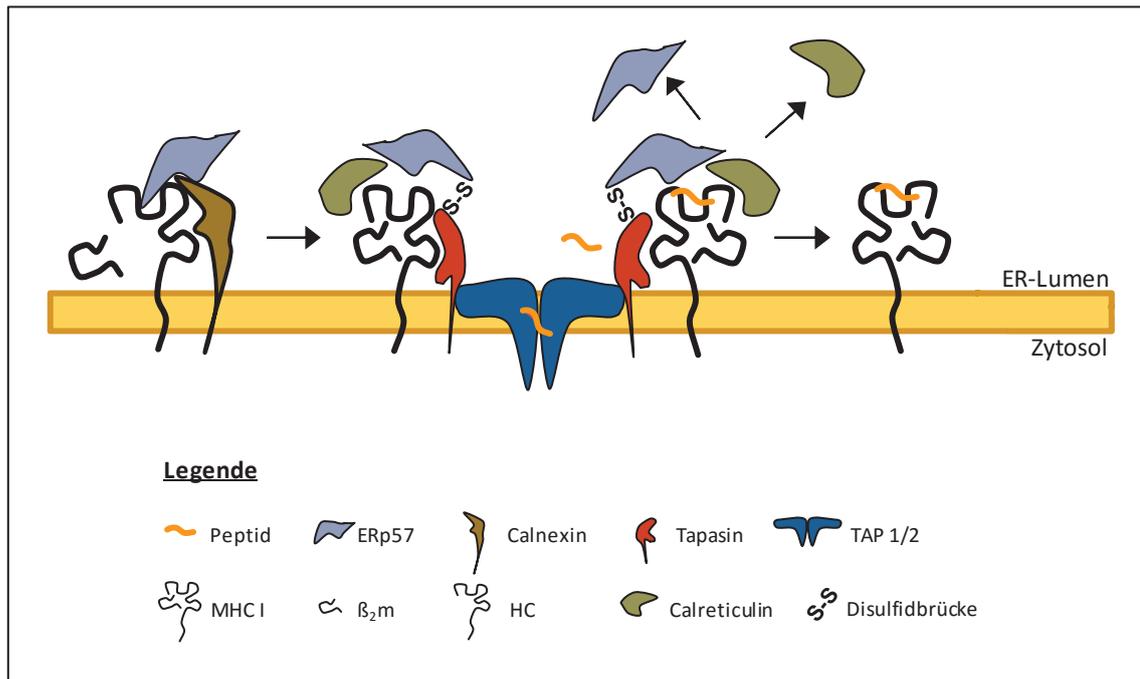


Abb. 2: Der PLC.

Ausschnitt aus einer Zelle, Membran des ERs (beige), oberhalb der Membran das ER-Lumen, unterhalb das Zytosol. Links: Faltung des MHC I Heterodimers (β_2m und HC) unter Hilfe von CNX und ERp57. → Mittig: die Assemblierung des PLC mit TAP, Tpn dem MHC I Komplex sowie CRT und ERp57. Peptide gelangen über den TAP-Komplex ins ER-Lumen und werden auf das MHC I Molekül geladen. → Rechts: das Peptid beladene MHC I Molekül verlässt den PLC.

1.3.1 Generierung der Peptide und ihre Translokation

Das 26S Proteasom ist eine aus mehreren Untereinheiten (20S und 19S) bestehende multikatalytische Protease. Es degradiert bei eukaryotischen Zellen im Zytoplasma sowie im Nukleus intrazelluläre durch Ubiquitin markierte, zum Abbau bestimmte, Proteine (Rock et al., 1994). Im Zytosol werden die Proteine zu 3-30 AS (Kisslev et al., 1999; Emmerich et al., 2000) langen Peptiden fragmentiert. Der MHC I Antigen Präsentationsweg nutzt diese Peptidfragmente, um passende Peptid-Liganden für die MHC I Moleküle zu generieren, die schlussendlich zur Präsentation und Aktivierung der CTL dienen. Bekannt ist nicht nur, dass der TAP-Transporter vorzugsweise Peptidfragmente mit einer Länge von 8-16 AS bindet und ins ER transloziert, sondern auch, dass die gebundenen Peptid-Liganden der MHC I Moleküle eine Länge von 8-11 AS aufweisen (Abele und Tampé 2004). Demzufolge finden weitere Abbauprozesse im ER-Lumen z.B. durch die ER-Aminopeptidase (ERAP1) statt. ERAP1 ist eine Protease, die vor allem

für die Generierung viraler und parasitärer Peptid-Liganden für die MHC I Antigen Präsentation identifiziert wurde. Nur Peptidfragmente, die länger als sieben AS lang sind, werden fragmentiert (Saric et al., 2002, Serwold et al., 2002), dabei gelten Fragmente aus 9-16 AS als optimales Substrat (Chang et al., 2005).

Die Peptide bestehen aus drei Anteilen (Abb. 3). Die AS am C'-Terminus sind meist hydrophob und binden (wie ein Anker) in der Bindegrube der MHC I-HC, weshalb diese AS in der Literatur als ‚anchoring residues‘ bezeichnet werden (Beismann-Driemeyer und Tampé 2004). Sie sind zusammen mit der N'-terminalen AS-Sequenz wichtig für die Translokation durch den Peptid-Transporter TAP (Abele und Tampé 2004; Peaper und Cresswell 2008, Cho et al., 2011). Dadurch können die mittleren AS eine hohe Sequenzvariabilität beibehalten und dienen als Erkennungssequenz für den TCR (Beismann-Driemeyer und Tampé 2004).

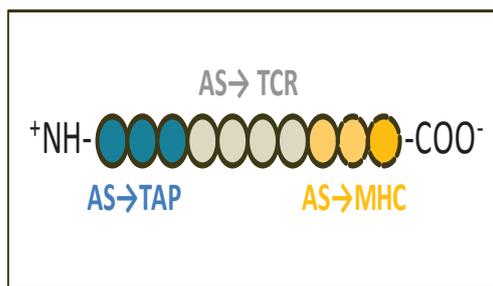


Abb. 3: Peptid Erkennungsanteile.

Dargestellt ist ein Peptid aus 10 AS. Farblich gekennzeichnet sind die AS-Anteile die für die TAP-Erkennung (blau), TCR-Bindung (grau) und MHC-Bindung (orange) notwendig sind (modifiziert nach Beismann-Driemeyer und Tampé 2004).

1.3.2 Der TAP-Komplex

Der heterodimere Peptid-Transporter TAP ist in der Membran des ERs lokalisiert. Seine zwei Untereinheiten TAP1 und TAP2 bilden in einer Stöchiometrie von 1:1 den TAP-Komplex. TAP2 ist mit einem molekularen Gewicht von 72 kilo Dalton (kDa) etwas größer als TAP1 mit 70 kDa (Ortmann et al., 1997). Mittels Adenosintriphosphat-Hydrolyse der zytosolischen Nukleotidbindenden-Domänen der TAP1 und TAP2 Untereinheiten werden die Peptide durch die ER Membran vektorieell transportiert (Gorbulev et al., 2001). TAP und Tpn interagieren über ihre Transmembrandomänen (TMD) miteinander, wodurch zum einen TAP stabilisiert und zum anderen eine räumliche Nähe zwischen TAP und den Tpn assoziierten MHC I Molekülen geschaffen wird (Sadasivan et al., 1996). Beides sorgt für eine verbesserte Peptidbeladung. Wurden Tpn-defiziente B-LCL 721.220 Zellen mit wt-Tpn cDNA rekonstituiert, zeigte

sich eine zwei- bis dreifach höhere TAP-Stabilität (DeMars et al., 1985, Greenwood et al., 1994, Tan et al., 2002). Je besser TAP exprimiert wird, desto mehr Peptide können transloziert werden und die Auswahl an Peptiden für die Beladung der MHC I Moleküle steigt (Bangia et al., 1999; Raghuraman et al., 2002; Garbi et al., 2003).

1.3.3 Faltung von MHC I Molekülen im ER

MHC I Moleküle setzen sich aus der TM-gebundenen MHC I-HC (44 kDa) und dem löslichen β_2m (12 kDa) zusammen. Im ER sorgt das TM-gebundene CNX (90 kDa), ein Lektin-ähnliches Chaperon, für die frühe Faltung und Assemblierung der neusynthetisierten MHC I Moleküle (Rajagopalan und Brenner 1994). Kotranslational wird die Asparaginsäure (Asn) an Position 86 glykosyliert, was die Interaktion mit dem löslichen β_2m zu einem MHC I Heterodimer (HC/ β_2m) fördert. Die MHC I-HC besteht aus drei α -Domänen (Abb. 4). Die α_3 -Domäne formt sich noch vor Assemblierung mit β_2m , während die Disulfidbrücke in der α_2 -Domäne erst nach Integration in den PLC mit Hilfe des Tpn-ERp57 Heterodimers entsteht (Dick et al., 2002). Sie bildet den Boden der Peptidbindegrube und ist die Voraussetzung für die Peptid-Bindung der MHC I Moleküle (Warburton et al., 1994). Das assemblierte MHC I Heterodimer kann dann über das Tpn-ERp57 Heterodimer in den PLC rekrutiert werden (Wearsch und Cresswell 2007). Im PLC wird CNX durch ein lösliches Chaperon CRT (60 kDa) ersetzt. Es interagiert ebenfalls über die glykosylierte Asn86 mit dem MHC I Molekül (Wearsch et al., 2004). Das Tpn-ERp57 Heterodimer sorgt für die komplette Oxidation der MHC I-HC (Tector et al., 1997; Linnquist et al., 1998), sodass sich die MHC I Moleküle in einem *Peptide receptive state* befinden (Wearsch und Cresswell 2008), einem Zustand in dem Peptide gebunden werden können. Ist die Ausbildung eines Heterodimers zwischen Tpn und ERp57 nicht möglich, ist der Redox-Status des MHC I Moleküls verändert: Die Disulfidbrücke der α_2 -Domäne (Cystein (Cys)101-Cys164) wird nicht ausgebildet, beide Thiolgruppen der Cys bleiben im reduzierten Zustand und die Bindung von Peptiden kann nicht erfolgen (Dick et al., 2002).

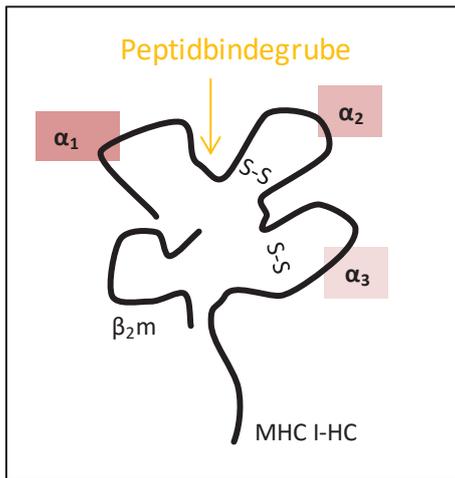


Abb. 4: Das MHC I Molekül.

Darstellung des MHC I Heterodimerr (MHC I-HC/ β_2m). Die MHC I-HC besteht aus drei α -Domänen, die intramolekulare Disulfidbrücken in der α_2 - und α_3 -Domäne sind mit S-S markiert. Die α_2 -Domäne bildet die Bindegube für die Peptide.

1.3.4 Interaktionen innerhalb des PLC

Die Entschlüsselung der Stöchiometrie innerhalb des PLC ist bis heute nicht vollständig geklärt. In frühen Studien wurde von Ortmann und Kollegen vorgeschlagen, dass TAP1 und TAP2 im Verhältnis 1:1 binden und dass Tpn mit einem MHC I Molekül auch im Verhältnis von 1:1 bindet. Über das Bindungsverhalten von Tpn und TAP konnte bis dahin keine genaue Aussage getroffen werden (Ortmann et al., 1997). Während der Fertigstellung dieser Arbeit wurden weitere Studien über die Stöchiometrie veröffentlicht. Diese zeigten, dass zwei Tpn Moleküle an einen TAP-Komplex binden (2:1) und dass mindestens ein MHC I Molekül an Tpn bindet (Hulpke et al., 2012; Panter et al., 2012).

Tpn und MHC I Moleküle interagieren über zwei Interaktionsstellen miteinander. Die erste Interaktion erfolgt direkt zwischen der α_2 -Domäne der MHC I-HC mit den N-terminalen AS (1-50) von Tpn. Die zweite findet zwischen der α_3 -Domäne der MHC I-HC und der Immunoglobulin (Ig)-like Domäne von Tpn statt (Peaper und Cresswell 2008). Tpn bildet zusätzlich über sein Cys95 eine intermolekulare Disulfidbrücke mit ERp57 aus (Dick et al., 2002). Auf diese Weise kommt Tpn in indirekten Kontakt mit CRT, da ERp57 direkt mit CRT interagiert (Wearsch und Cresswell 2007). Außerdem besteht ein zweiter indirekter Kontakt mit CRT über dessen Interaktion mit den MHC I Molekülen (Wearsch et al., 2004). Der PLC wird durch die Bindung von Tpn an den TAP-Transporter vervollständigt.

1.3.5 Tapasin, Schlüsselprotein im PLC

Tpn ist ein Typ I Hausmembranverankertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 48 kDa. Sein Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 (6p21.3) lokalisiert und kodiert für acht Exons (Abb. 5). Nicht alle Basenpaare (BP) werden translatiert, sodass das Tpn Protein letztendlich aus 428 AS besteht. Die Signalsequenz (20 AS) wird vor allem von Exon 1 und zu einem Teil von Exon 2 kodiert. Exon 2-5 kodieren den N'-terminalen Anteil, der die luminale Domäne bildet (AS 1-392). Außerdem kodiert Exon 5 zusätzlich eine Ig-like Domäne, weshalb Tpn zu der Ig-Superfamilie (Ig SF) zählt (Ortmann et al., 1997; Dong et al., 2009). Die TMD mit dem zytoplasmatische Teil (C'-Terminus) wird von den letzten drei Exons 6, 7 und 8 gebildet (AS 393-428) (Abb. 5, Abb. 20, Cabrera 2006).

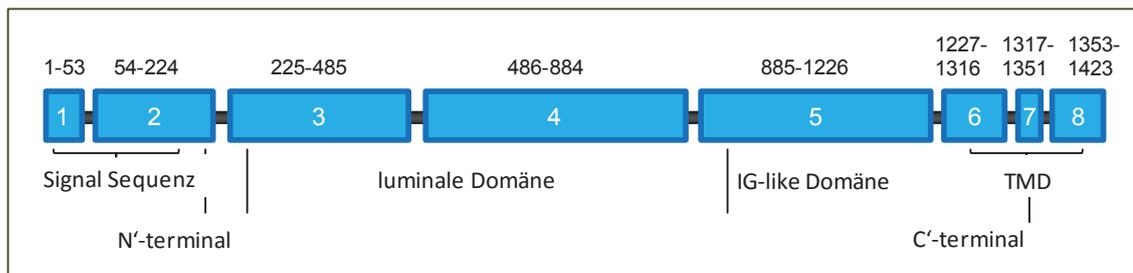


Abb. 5: Intron-Exon Organisation des Tapasin Gens.

Die Darstellungsweise der Tpn RNA in Exonform ermöglicht die Zuordnung kodierender Sequenzen zum Tpn Protein. Die RNA besteht aus acht Exons (blaue Kästen). Über den Exons sind die Anzahl der BP des jeweiligen Exon aufgeführt (z.B. besteht Exon 3 aus 261 BP) (modifiziert nach Cabrera 2006).

Fünf Cys sind für die räumliche Struktur und die Funktion von Tpn von zentraler Bedeutung. Eine der zwei luminalen Disulfidbrücken befindet sich in der Ig SF-like Domäne zwischen Cys295 und Cys362 (Herberg et al., 1998; Pepaer et al., 2005). Die zweite luminale Disulfidbrücke bildet sich N'-terminal zwischen Cys7 und Cys71 aus (Pepaer et al., 2005). Das fünfte Cys an Position 95 (Cys95) hat keinen intramolekularen Partner. Dennoch kommt ihm eine äußerst wichtige Funktion zu, nämlich die Ausbildung einer transienten intermolekularen Disulfidbrücke mit der Oxidoreduktase ERp57 (Dick et al., 2002).

Tpn spielt eine zentrale Rolle für den PLC, was initial durch die Experimente mit den bereits erwähnten B-LCL 721.220 Zellen gezeigt wurde (Sadasivan et al., 1996). Aufgrund einer Mutation fehlt diesen Zellen Tpn, weshalb kaum MHC I Moleküle an der Oberfläche exprimiert werden können. Eine Wiederherstellung der Tpn Expression nach Gentransfer resultierte in einer starken Zunahme der Oberflächenexpression der MHC I Moleküle. Tpn ist folglich essentiell für die MHC I Antigen Präsentation. Zu den Funktionen von Tpn gehört neben der Stabilisierung nicht beladener MHC I Moleküle (Sadasivan et al., 1996; Schoenhals et al., 1999) auch das Zurückhalten von insuffizient beladenen MHC I Moleküle im ER (Ortmann et al., 1997; Paulsson et al., 2002). Desweiteren katalysiert es die Peptid-Bindung durch ein erweitertes Peptid-Repertoire (Barnden et al., 2000; Garbi et al., 2000; Tan et al., 2002).

Viele Autoren unterstützen das Model, in dem Tpn als *Peptid-Editor* betrachtet wird. Solange kein hoch affines, optimal passendes Peptid in der Bindegrube gebunden hat, kann sich das MHC I Molekül nicht von Tpn lösen. Je besser ein Peptid in die Bindegrube passt, desto stabiler wird das MHC I Molekül und löst sich aus dem PLC (Momburg und Tan 2002; Wearsch und Cresswell 2007). Die Zelloberfläche wird erreicht und das Antigen präsentiert (Zarling et al., 2003). Tpn sorgt auf diese Weise für die Qualitätskontrolle bei der Peptidbeladung (Schoenhals et al., 1999; Grandea et al., 2000).

1.3.6 Das Tapasin-ERp57 Heterodimer

Auf die Relevanz der bereits erwähnten Interaktion zwischen ERp57 und Tpn soll noch etwas detaillierter eingegangen werden. Zwischen ERp57-Cys57 und Tpn-Cys95 entsteht eine intermolekulare Disulfidbrücke, die ein stabiles Heterodimer schafft (Abb. 6; Dick et al., 2002; Peaper et al., 2005).

Mittlerweile wird dieses Heterodimer als ein entscheidender Bestandteil des PLC diskutiert, da es die Rekrutierung von MHC I Molekülen in den PLC verbessert. MHC I Moleküle können so über zwei Interaktionspartner im PLC gehalten werden, direkt über Tpn selbst und indirekt über CRT und dessen Bindung an ERp57 (Wearsch und Cresswell 2007).

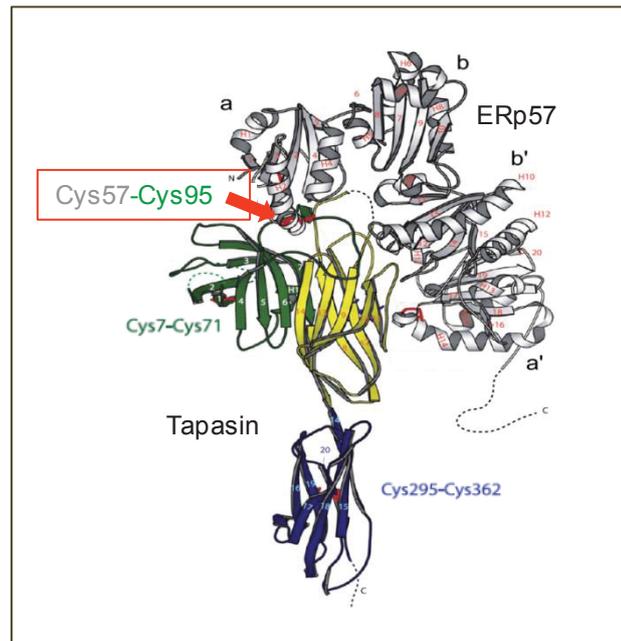


Abb. 6: Kristallstruktur des Tapasin-ERp57 Heterodimers.

Erstmals von Dong und Kollegen beschriebenen Kristallstrukturen von Tpn (grün, gelb und blau) und der Oxidoreduktase ERp57 (grau), die über eine Disulfidbrücke zwischen Cys57 (ERp57) und Cys95 (Tpn) ein Heterodimer bilden. Dabei umschließt ERp57 die luminale Domäne von Tpn (grün). Die Ig-like Domäne wurde in gelb und die TMD mit dem C'-Terminus in blau dargestellt (Dong et al., 2009).

Die Oxidoreduktase ERp57 enthält vier Thioredoxin-artige Domänen $\alpha\beta\beta'\alpha'$, wobei die $\alpha\alpha'$ Domänen die zwei CXXC-Motive mit katalytischer Aktivität beinhalten (Chivers et al., 1996; Siever und Kaiser 2002; Wearsch und Cresswell 2007). Die beiden AS (XX) zwischen den Cys können beliebig variieren. Das CXXC-Motiv dient zur Lösung von Disulfidbrückenbindungen innerhalb neu entstehender Proteine, was als Fluchtmechanismus (EP, *Escape pathway*) beschrieben wurde (Walker und Gilbert 1197). Bei dem EP bildet sich eine transient gemischte Disulfidbrücke zwischen einem Substrat und dem N-terminalen Cys des CXXC-Motivs (Abb. 7, ①). Diese wird durch das C'-terminale Cys wieder gelöst (②), das Substrat dadurch reduziert und aus der Interaktion entlassen (③).

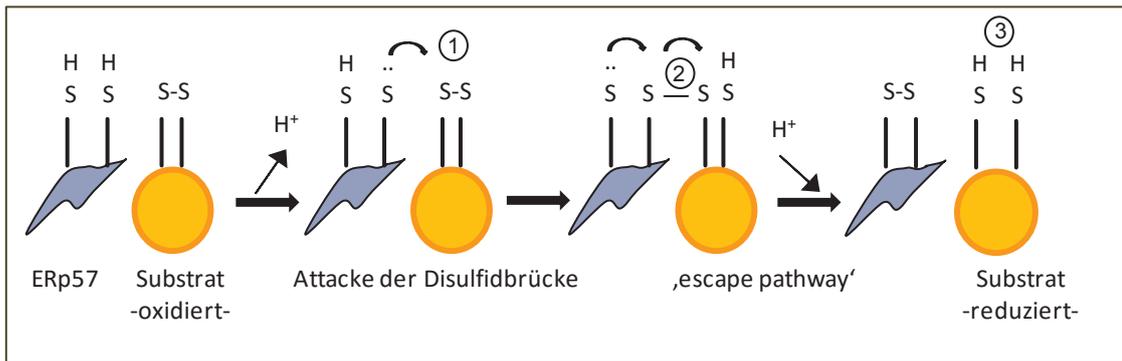


Abb. 7: Der Fluchtmechanismus.

Im EP wird ein oxidiertes Substrat reduziert, wobei ERp57 als Protonendonator dient. ① ERp57 attackiert die Disulfidbrücke des Substrats, ② bildet mit dem Substrat kurzfristig eine intermolekulare Disulfidbrücke (S-S) und entlässt das Substrat wieder ③, wodurch dieses reduziert wird (modifiziert nach Peaper und Cresswell 2008).

Die intermolekulare Disulfidbrücke zwischen ERp57 und Tpn hingegen ist stabil. Das von ERp57 kodierte Cys57 aus der N'-terminalen α Domäne bildet mit dem Tpn-Cys95 die einzige Disulfidbrücke aus (Dick et al., 2002; Peaper et al., 2005). Zusätzlich wird das Heterodimer durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Tpn und den α - und α' -Domänen von ERp57 stabilisiert (Dong et al., 2009). Durch die Bindung an Tpn wird die Reduktaseaktivität der α -Domäne gehemmt und die EP-Funktion verhindert (Peaper et al., 2005). Das führt dazu, dass die MHC I Moleküle stabilisiert werden und so lange in den PLC integriert bleiben, bis ein affines Peptid gebunden hat. Fehlt bei Tpn das Cys95 erfolgt keine Interaktion mit ERp57 und die Peptidbeladung verläuft nicht optimal.

1.3.7 HLA-B*44:02 und HLA-B*44:05

In der Internetdatenbank sind mehr als 7000 verschiedene polymorphe (A, B, C, E, F, G) MHC I Allele aufgelistet (<http://hla.alleles.org/class1.html>). Dieser Polymorphismus ist oftmals in der Bindegroße lokalisiert, wodurch eine große Vielfalt an verschiedenen Peptid-Liganden für die TCR entsteht, was wiederum zu einer divergenten T-Zell Antwort führt. Einzelne AS-Polymorphismen von MHC I Allelen können extreme Variationen bezüglich der MHC I Stabilität und ihrer PLC-Abhängigkeit aufweisen (Zernich et al., 2001; Pepaer und Cresswell 2008).

HLA-B*44:02 und HLA-B*44:05 sind zwei natürlich vorkommende MHC I Allele, die in ihrer Tpn-Abhängigkeit extrem variieren. Diese beiden MHC I Moleküle unterscheidet nur eine einzige AS an Position 116. Sie befindet sich im Boden der Bindegrube, während HLA-B*44:02 an Position 116 die AS Aspartat aufweist, besitzt HLA-B*44:05 dort ein Tyrosin. Die Stabilität und Peptidbeladung von HLA-B*44:02 ist dadurch extrem Tpn-abhängig, wohingegen HLA-B*44:05 Peptide bindet ohne mit dem PLC und Tpn interagieren zu müssen (Zernich et al., 2004).

1.4 Herpesviren entkommen dem Immunsystem

Unser Immunsystem setzt sich aus diversen Einzelkomponenten zusammen, die im Zusammenspiel eine Vielzahl unterschiedlicher Immunantworten möglich machen. Dennoch schaffen es einige Erreger, wie beispielsweise die Herpesviren, der Eliminati-on durch unser Immunsystem zu entkommen (Chatterjee und Harrison 2001).

Herpesviren sind doppelsträngige DNA-Viren mit einem großen linearen Genom (135-235 kbp). Zu den humanen Herpesviren gehören unter anderem das Herpes-simplex Virus Typ 1, das den Lippenherpes verursacht, das Varizella-Zoster-Virus, welches für die Varizellen und den Herpes Zoster verantwortlich ist, und das Epstein-Barr-Virus, durch das das Pfeiffersche Drüsenfieber hervorgerufen wird.

HCMV ist mit ca. 230 kbp das größte humanpathogene Herpesvirus (Chee et al., 1990) und exprimiert 750 Proteine (Stern-Ginossar et al., 2012). Es infiziert die Speicheldrüsen, breitet sich überwiegend hämatogen aus und persistiert in CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen (Chatterjee und Harrison 2001). Die Durchseuchung mit HCMV ist sehr verbreitet und liegt abhängig von Ethnizität und sozialem Status bei 80-100% der Erwachsenen in Ländern der Dritten Welt und bei 50% in West-Europa (Britt und Alford, 1996; Herold 2009). Für immunkompetente Menschen stellt es, verglichen zu den oben genannten Herpesinfektionen, kaum eine gesundheitliche Einschränkung dar. Allerdings ist eine Infektion mit HCMV für prädisponierte Menschen von großer medizinischer Bedeutung.

Eine diaplazentare Übertragung sowie eine perinatale Infektion können irreparable Folgen für das Neugeborene haben, wie beispielsweise eine Innenohrschädigung, einen Mikrozephalus oder geistige Retardierung. Auch immuninkompetente Menschen

(z.B. AIDS Patienten, Knochenmark- und Organtransplantierte) können schwerwiegende Erkrankungen, wie eine Retinitis, Enzephalitis, interstitielle Pneumonie oder gastrointestinale Manifestationen (Hepatitis) erleiden.

Wenn HCMV den Wirt infiziert, entsteht eine Erstinfektion mit unspezifischen Symptomen und mäßigem bis mittelstarkem Krankheitsgefühl. Anschließend persistiert das Virus in einem sogenannten *Latenzstadium*, welches durch das Immunsystem zwar kontrolliert, aber nicht vollständig eliminiert werden kann (Polic et al., 1998). Aus der Latenzphase kann es reaktiviert werden, wozu kleine Trigger wie eine Erkältung, Schwangerschaft, Stillperiode oder Stress ausreichen. Herpesvirale Infektionen spiegeln das empfindliche Verhältnis von viraler Evasion und Immunantwort wieder, welches dem Virus ermöglicht lebenslang im Körper zu persistieren.

Aufgrund seiner Ko-Evolution mit dem Menschen während Millionen (Mio.) von Jahren hat HCMV vielfältige Strategien entwickelt, um dem Immunsystem des Wirts partiell zu entgehen. Der Immunevasion dienen unter anderem mindestens ein funktionales Interleukin-10-Homolog als Immunsuppressor (Kotenko et al., 2000; Jenkins et al., 2004) oder aber Fc γ -Rezeptoren, die humanes Ig G binden (Atalay et al., 2002). Die MHC I abhängige Antigen Präsentation wird durch mindestens vier Genprodukte (*unique short*, US2, US3, US6 und US 11) maßgeblich eingeschränkt. Dabei wird durch US6 der Peptid-Transport unterdrückt (Hengel et al., 1997; Ahn et al., 1997; Lehner et al., 1997). US2 und US11 sorgen für die Degradation von MHC I-HC (Wiertz et al., 1996; Jones et al., 1997). US3 kann direkt die Funktion von Tpn hemmen (Park et al., 2004). Darüber hinaus wurde von Halenius und Kollegen zum ersten Mal beschrieben wie HCMV auf transkriptioneller Ebene mit dem Antigen Präsentationsweg interferiert. Sie zeigten, dass HCMV in der frühe Phase der Infektion den Promotor von Tpn blockiert und damit die Neusynthese von Tpn inhibiert (Halenius et al., 2011).

2 Ziele der Doktorarbeit

Eine der immunevasiven Strategien von HCMV ist seine Regulierung und Beeinflussung der MHC I Antigen Präsentation. Halenius und Kollegen zufolge reduzierte die HCMV Replikation die Tpn Transkription in infizierten Zellen. Die Interaktion mit den MHC I Molekülen konnte nur eingeschränkt stattfinden (Halenius et al., 2011). Um die Ursache der reduzierten Tpn mRNA zu verstehen, wurde die Integrität der mRNA geprüft. Es wurde eine RT-PCR mit Oligonucleotid-Primer, die die komplette kodierende Sequenz der Tpn mRNA amplifizierten, durchgeführt (Abb. 8 B). Während die HCMV Replikation die Tpn Transkription verringerte, erschien analog dazu eine verkürzte mRNA Spezies (*), die nach längerer Infektionszeit an Stärke zunahm. Die Sequenzierung der kleineren Bande zeigte, dass es sich um ein neues alternativ gespleißtes Tpn Transkript (NeTT) handelte, dem das Exon 3 fehlte. Ziel dieser Arbeit sollte zum einen die funktionelle Analyse von NeTT, d.h. seine Interaktionsmöglichkeiten mit dem PLC und seine Effekte auf die MHC I Beladung sein und zum anderen die Hypothese prüfen, ob NeTT ein neuer endogener Inhibitor des MHC I Antigen Präsentationswegs ist.

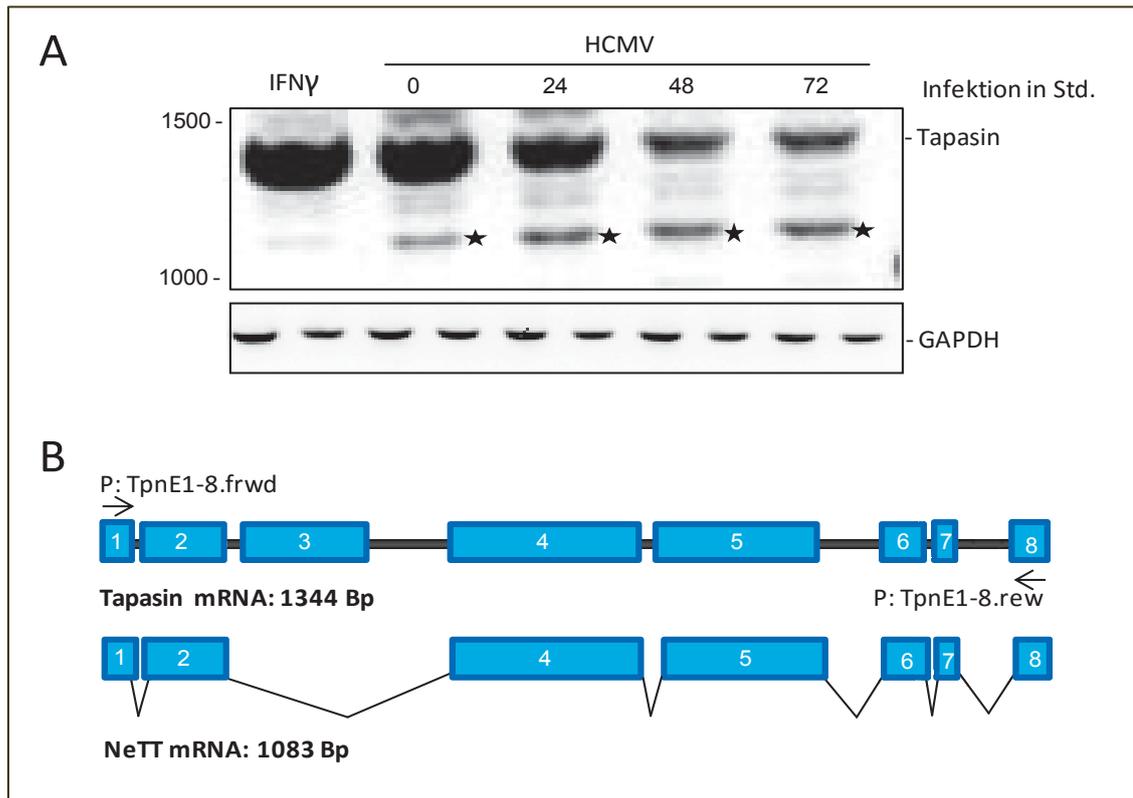


Abb. 8: Der RT-PCR Nachweis eines neuen Tapasin Transkript.

A. MRC-5 Zellen wurden mit einem HCMV wt-Stamm (AD169) infiziert (MOI 3, multiplicity of Infection) oder mit IFN γ (500 U/ml) stimuliert. Dargestellt ist eine RT-PCR Analyse unter Verwendung des Primerpaar (TpnE1-8.fwd/rew). Zur Kontrolle der RNA-Menge wurde parallel eine GAPDH spezifische RT-PCR durchgeführt. Neben Tpn konnte eine weitere Bande detektiert werden (*), bei der es sich um ein kleineres Tpn Transkript handelt (RT-PCR wurde von Sebastian Hauka durchgeführt, Institut für Virologie der Heinrich Heine Universität (HHU), Düsseldorf). B. Schematische Darstellung des Tpn Gens (Gen ID 6892), in blauen sind die acht Exons dargestellt und inschwarz die sieben Introns. Amplifikationsrichtung, \rightarrow des Primerpaar. Unter Tpn wurde zum Vergleich NeTT, dem Exon 3 fehlt, aufgeführt (Beutler et al., 2013).

3 Materialien

3.1 Geräte

Zentrifugen	Eppendorf (5810R; 5417R; 5415D), Sigma (3K30), Beckmann (J2-21)
FACS	FACS Cantoll™ BD, Biosciences
Durchflusszytometrischer Zellsortierer	FACS Star plus, BD (Heidelberg)
Mikroskop	Nikon
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss 510 Confocal
UV-Transluminator	Roche
Brutschrank	Heraeus
Blotting-Apparatur	Biometra
Geltrockner	Biorad
Thermoblöcke	ThermoStat plus (Eppendorf), Ther- momixer Comfort (Eppendorf)
Einfrierbehälter	Neo Lab
Elektrophorese Kammern	Biometra
AIDA Image Analyzer	Straubenhardt (Deutschland)

3.2 Chemikalien und Kits

Amersham	Protein A-Sepharose (PAS)/ Protein G-Sepharose (PGS); ECL Plus Western Blotting Detection System
Applichem	Triton X-100
Axxora	Lactacystin; MG132
BD Bioscience	GolgiStop™
Bioline	DNA-Größenstandard Hyperladder I
BioMax	Kodak Film

Biorad	Ethidiumbromid (EtBr); Kaleidoscope Marker
Biozym	Biozym Agarose
Calbiochem	Digitonin, high purity; Iodacetamid
Invitrogen/Gibco	Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) DMEM ohne L-Methionin (Met) und L-Cys; Platinum® <i>Taq</i> DNA-Polymerase High Fidelity; Fetal calf serum (FCS); Trypsin 2,5% ; Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml, PenStrep); I KB Ladder; Geneticin Sulphate (G418); <i>phosphate buffered saline Dulbecco</i> (PBS); RPMI 1640 +GlutaMax™
Merck	Bromphenolblau; Dithiothreitol (DTT); Ethylendiamin- tetraessigsäure (EDTA); Ethanol; Isopropanol
New England Biolabs	<i>Asc I</i> ; <i>BamH I</i> ; <i>EcoRI</i> ; <i>Hind III</i> ; <i>Nhe I</i> ; <i>Not I</i> ; <i>Xba I</i> , T4-DNA- Ligase
Oxoid	Magermilchpulver
Perkin Elmer	C ¹⁴ -Marker, Easytag™ EXPRESS ³⁵ S protein labelling mix [³⁵ S]-Met/Cys 7mCi (259MBq)
Qiagen	QIAquick Gel Extraction Kit; QiaShredder Kit; QIAprep Spin Miniprep Kit; Plasmid Midi Kit; Endofree Plasmid MaxiKit; OneStep RT-PCR Kit; Superfect Transfection Reagent; RNeasy Mini Kit
Renner	Cryo-Einfrierröhrchen, 6-Loch-Zellkulturplatten
Roche	Luciferase Gene Assay Kit; T4-Polynukleotid-Kinase; dNTPs; Ampicillin (Amp); Complete® Protease Inhibitor, Endoglycosidase H (Endo H)
Roth	β-Mercaptoethanol; Essigsäure; Glycerol; N,N,N',N'''- Tetramethyldiamin (TEMED); Dimethylsulfoxid (DMSO); Saccharose; Natriumcitrat; Natriumdodecylsulfat (SDS);

	Tris-Base; Acrylamid; Rotiphorese-30; NP40; Igepal; Protaminphosphat
Sigma-Aldrich	Polylysin; Mowiol
Whatman	Whatman-Papier; Nitrocellulose Membran Protran BA85

3.3 Medien, Puffer und Lösungen

Zellkultur

ZK-Medium

DMEM/ RPMI
 10% FCS
 1000 U PenStrep (1%)
 0,5-1,5 mg/ml G418
 → 37°C warm verwendet

Einfriermedium

10% DMSO
 50% FCS
 40% DMEM/ RPMI

Trypsin

1:5 in PBS

FACS-Puffer

PBS
 3% FCS
 → 4°C kalt verwendet

Säure Puffer pH 3 (s. 5.5.2)

0,131 M Natriumcitrat
 0,066 M Natriumphosphat

Transfektionsansatz

1-2 µg DNA
 add 100 µl DMEM (ohne FCS/PS)
 10-15 µl Superfect
 5-10 Min. bei Raumtemperatur (RT)
 add 600 µl DMEM (mit FCS/PS)

Immunopräzipitation

IP-Lysepuffer

140 mM NaCl
 5 mM MgCl₂
 20 mM Tris-HCl, pH 7,6
 → Vor Verwendung 1% (w/v) Digitonin bzw. 1% (v/v) NP40; Complete Protease Inhibitor (1 mM PMSF, 10 µg Leupeptin, 1 µM Pepstatin A) hinzufügen

1x IP-Probenpuffer

80 mM Tris-HCl, pH 6,8
 5 mM EDTA
 34% Saccharose (w/v)
 Bromphenolblau

→ Vor Verwendung 200 µl 20% SDS (Endkonzentration 3,2%) und 50 µl 1 M DTT (Endkonzentration 40 mM) zu 1 ml 1x IP-Probenpuffer hinzufügen

Waschpuffer B

150 mM NaCl
 10 mM Tris-HCl, pH 7,6
 2 mM EDTA
 → Vor Verwendung 0,2% (w/v) Digitonin bzw. 0,2% (v/v) NP40 hinzufügen

Waschpuffer C

500 mM NaCl
10 mM Tris-HCl, pH 7,6
2 mM EDTA
→ Vor Verwendung 0,2% (w/v) Digitonin
bzw. 0,2% (v/v) NP40 hinzufügen

Waschpuffer D

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

Fixierlösung

10% (v/v) Essigsäure
40% (v/v) Methanol

4x IP-Probenpuffer

250 mM Tris-HCl, pH 6,8
20 mM EDTA
8% SDS (w/v)
60% Saccharose (w/v)
Bromphenolblau
→ Vor Verwendung 200 µl 20% SDS
(Endkonzentration 11,2%) und 50 µl 2
M DTT (Endkonzentration 80 mM) zu 1
ml 4x IP-Probenpuffer hinzufügen

5x Lauffpuffer

250 mM Tris
2 M Glycin
0,1% SDS Endkonzentration

Western Blot

5x SDS-Probenpuffer

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
25% (v/v) Glycerol
2% (w/v) SDS
2% (v/v) β-Mercaptoethanol
Bromphenolblau

10x Lämmli-Elektrophoresepuffer

252 mM Tris
1,92 mM Glycin
1% (w/v) SDS

5% Milchpulver

5 g Magermilchpulver
in 100 ml TBST

10x Blotting-Puffer

480 mM Tris
280 mM Glycin
20% (v/v) Methanol

Endo H Puffer

0,5 M Na-Citrat, pH 5,5
10% PMSF (w/v)

Endo H Verdau

20 µl Luciferase-Lysat (nach Herstel-
lerangaben)
5 µl 5x Endo H Puffer
→ 5 Min. kochen
Frisch 2 µl Endo H Enzym hinzufügen

RT-PCR, PCR, Klonierung und Agarosegel

20 µl Restriktionsansatz

0,5-1 µl DNA/Plasmid
1-1,5 µl Restriktionsenzyme
2 µl 10x Puffer
2 µl 10x BSA
add ddH₂O

15 µl Ligationsansatz

1 µl T4-DNA-Ligase
1,5 µl 10x Ligasepuffer
0,5 µl Plasmid
2 µl DNA-Insert
add ddH₂O

10x TBE

900 mM Tris
900 mM Borsäure
20 mM EDTA, pH 8,0

6x TBE-Probenpuffer

10% (v/v) Glycerol
6x TBE
Bromphenolblau

Agarosegel 1%

50 ml 1x TBE
0,5 g Agarosepulver → aufkochen
1-2 µl EtBr

3.4 SDS-Gele

	Trenngel 10%	Sammelgel	Gradienten- gel 10%	Gradienten- gel 11,5 %
30% Acrylamid	4 ml	1,5 ml (5 ml)	13,25 ml	15,3 ml
2 M Tris/HCl, pH 8,8	2,5 ml	-	8,4 ml	8,4 ml
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	-	1,2 ml (4 ml)	-	-
20% SDS	60 µl	45 µl (150 µl)	200 µl	200 µl
60% Saccharose	-	2,1 ml (7 ml)	-	- (10 ml)
H ₂ O	5,3 ml	4,2 ml (14 ml)	18,13 ml	16 ml (6 ml)
TEMED	24 µl	12 µl (15 µl)	20 µl	20 µl
10% APS	144 µl	120 µl (180 µl)	120 µl	120 µl

Tabelle 1: Acrylamidgele

3.5 Primer und Plasmide

Primer	Sequenz 5'-3'
TpnE1-8.frwd	GAAGTCCCTGTCTCTGCTCC
TpnE1-8.rew	TGAGTGCCCTCACTCTGCT
GAPDH.frwd	ACCACAGTCCATGCCATCAC
GAPDA.rew	TCCACCACCCTGTTGCTCTA

NB-HIS 1	GGGGCTAGCCCCACAATGAGGGCCTGGATCTTCTT
NB-HIS 2	GATCACCGCGGGTCCCATTCCGGAGTGATGGTGATGGTGATG
NB-HIS NeTT 1	CATCACTCCGGAATGGGACCCGCGGTGATCGAG
NB-HIS NeTT 2	GCAAGCTTTCCTCT GCTTTCTTCTTTGAATCCTTGCA
SH Exon 2	GGACCCGCGGTGATCGAGTG
SH Exon 4	GCTGGCGTCGCCACTCTAGC
NB Exon2	GGGCCTGGCCAAGAGACCC
NB Exon4	GGGCAGGGGTGTGGGTGAG
Tpn/NeTT 1	CGGCTAGCATGAAGTCCCTGTCTCTGC
Tpn/NeTT 2	GCGGATCCTCACTCTGCTTTCTTCTTTGAATCCTTG
Plasmide	Herkunft
pcDNA3.1	Invitrogen, K4900-01
pUC2-CL6-IRES-EGFP	Prof. Dr. Helmut Hanenberg, Universitätsklinikum für
pUC2-CL6-IRES-Puro	Kinderonkologie, -Hämatologie und Immunologie,
pCL12msc-IRES-Puro	Düsseldorf
TeT-ON-IRES-Neo	
pIRES2-EGFP	Clontech
pESG-IBA142	IBA, 5-5142-005
pCR2.1-TOPO	Invitrogen, K4560-01

Tabelle 2: Verzeichnis der Primer und Plasmide

3.6 Antikörper

AK	<i>Spezifität</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller/Referenz</i>
TT4-A20	HLA-B 44:02 HLA-B 44:05	FACS 1:300 IP 100 µl	Tahara, 1990
W6/32 (Aszites)	MHC I (Dimer)	FACS 1:50 IP 10 µl	Parham, 1979
HC-10	MHC I-HC	IP 8 µl WB 1:2000	Stam, 1986
ERp57	ERp57	IP 1 µl WB 1:4000	Stressgen, SPA-725
Tpn-C	Tpn/NeTT	WB 1:4000	Stressgen, CSA-625
STC	Tpn/NeTT	IP 2,5 µl WB 1:5000	Tan, 2002
Tpn-C (N-17)	Tpn/NeTT	WB 1:100	Santa Cruz Biotechnol.
PaSta.1	hTpn	IP 1 µl	Dick, 2002
HIS-	HIS-Tag	IP 4 µl	Abcam, AB 5000
TAP 148.3	TAP1	IP 80 µl WB 1:20	Meyer, 1994
TAP 435.3	TAP2	IP 1:20	Meyer, 1994
CRT	CRT	IP 2 µl	Stressgen, SPA-600
β-actin	Aktin	WB 1:20000	Sigma, A2228
CD71	CD71	FACS 1:300	Immunotech
GM130	Rat Golgi	IF 1:200	BD, 558712
<i>Sekundär AK</i>			
Rabbit POD		WB 1:2000	Sigma, A6154-1
GAM-POD		WB: 1:5000	Dianova, 205035-108
GAM-APC		FACS: 1:300	BD, 550826

Tabelle 3: Verzeichnis der Antikörper

3.7 Zelllinien und stabile Transfektanten

Zellen	Herkunft
CMT64.5	Defizient für TAP1/2 und Tpn, murine Lungenkarzinom Zellen (Franks et al., 1976)
-CMT64.5 Tpn -CMT64.5 NeTT -CMT64.5 NeTT/Tpn	pUC2-CL6-Tpn-IRES-Puro pUC2-CL6-NeTT-IRES-Puro pUC2-CL6-NeTT-IRES-Puro + pUC2-CL6-Tpn-IRES-Puro
HeLa	Humane Epithelzellen aus einem Zervixadenokarzinom, ATCC CCL-2
HeLa-HLA-B*44:02 HeLa-HLA-B*44:02-Tpn HeLa-HLA-B*44:02-NeTT HeLa-Tpn HeLa-NeTT HeLa-NeTT _{ind}	HLA-B*44:02 in pcDNA3.1 pUC2-CL6-Tpn-IRES-Puro pUC2-CL6-NeTT-IRES-Puro pUC2-CL6-Tpn-IRES-Puro pUC2-CL6-NeTT-IRES-Puro pCL12msc-NeTT-IRES-Puro
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen, ATCC CRL 11268
B-LCL 721.220	Tpn-defiziente B Zellen (DeMars et al., 1985)
.220-HLA-B*44:02 .220-HLA-B*44:05 .220-HLA-B*44:02-TPN .220-HLA-B*44:02-NeTT .220-HLA-B*44:05-TPN .220-HLA-B*44:05-NeTT	Dr. Frank Momburg, DKFZ, Heidelberg Dr. Frank Momburg, DKFZ, Heidelberg pUC2-CL6-Tpn-IRES-Puro pUC2-CL6-NeTT-IRES-Puro pUC2-CL6-Tpn-IRES-Puro pUC2-CL6-NeTT-IRES-Puro
MRC-5	Humane embryonale Lungenfibroblasten, ATCC X-55
NIH 3T3	Murine embryonale Fibroblasten, ATCC CRL 1658

Tabelle 4: Verzeichnis der Zelllinien und stabilen Transfektanten

4 Methoden

4.1 Zellkultur, Einfrieren und Auftauen von Zellen

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen in DMEM oder RPMI Kulturnährmedium in einem Brutschrank unter Normalatmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37°C inkubiert.

Um ein zu dichtes Wachsen zu vermeiden, wurden die Zellen unter Berücksichtigung der Teilungsrate alle zwei bis drei Tage gesplittet. In der Wachstumsphase sollten die Zellen immer ausreichend mit Medium bedeckt sein, um eine Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten und ein Austrocknen zu verhindern. Transfektanten waren zusätzlich unter ständigem Selektionsdruck (DMEM mit 0,5-1 mg/ml G418).

Zur Aufbewahrung von Zellen wurden diese bei einer Konfluenz von ca. 70 % eingefroren. Adhärente Zellen wurden mit Trypsin gelöst, in DMEM aufgenommen und pelletiert (5 Min., 1200 rpm, 5810R, Eppendorf). Das Pellet wurde in Einfriermedium (1 ml) resuspendiert und in Cryo-Einfrieröhrchen aliquotiert. In einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox wurden die Zellen langsam (-1°/min) auf -80°C eingefroren. Nach 24 Std. fand eine Umlagerung der Aliquots in flüssigen Stickstoff (-196°C) statt.

Der Auftau-Prozess erfolgte zügig: Die Zellen wurden in einem Wasserbad (37°C) angetaut und zur Verdünnung des zelltoxischen DMSO in warmes DMEM aufgenommen. Nach Zentrifugation (5 Min., 1200 rpm) wurde das Zellpellet in ausreichend frischem Medium resuspendiert und kultiviert.

4.2 Klonierung und Herstellung von Plasmid

4.2.1 Klonierung

Zur Protein Expression und Analyse erfolgte die Klonierung von Tpn und NeTT in Expressionsvektoren. NeTT und Tpn cDNA wurden aus 100 ng RNA (MRC-5 Zellen) amplifiziert (Primerpaar: Tpn/NeTT 1 und Tpn/NeTT 2, Tabelle 2). Für die Subklonierung von Tpn und NeTT in pcDNA3.1 wurde mittels der Restriktionsenzyme *Nhe I* und *Not I* geschnitten, für die Klonierung in pIRES-EGFP und in lentivirale Vektoren pUC2-CL6-IRES-EGFP und pUC2-CL6-IRES-Puro mit *Nhe I* und *BamH I*. Um das induzierbare System (Tet-On) zu generieren, wurde NeTT aus pUC2-CL6-IRES-Puro in pCL12msc-IRES-Puro kloniert (*Asc I* und *Xba I*). Die cDNA von HLA-B*44:02 und HLA-B*44:05 (Dr. Tobias Dick, DKFZ, Heidelberg) wurde mittels der Schnittstellen *Eco RI* und *BamH I* in pcDNA3.1 und mittels *Nhe I* und *BamH I* in pUC2-CL6-IRES EGFP Vektors subkloniert.

Zur simultanen Expression von Tpn und NeTT wurden beide Proteine mit einem Polyhisitidin Anhänger (HIS-Tag) versehen. In einer ersten Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde, um die Signalsequenz (BM40) und den HIS-Tag aus dem pESG-IBA142 Vektor zu amplifizieren das Primerpaar NB-HIS 1 und 2 verwendet (Tabelle 2). Eine zweite PCR mit NB-HIS NeTT 1 und 2 diente zur Vervielfältigung der Tpn und NeTT Sequenz ohne ihre eigene Signalsequenz. Anschließend wurden die Produkte aus den beiden PCR in einer dritten PCR (NB-HIS 1 und NB-HIS NeTT 2) zu einem HIS-NeTT oder HIS-Tpn Konstrukt zusammengefügt und amplifiziert. Diese Konstrukte wurden danach in den pCR2.1-TOPO Vektor subkloniert. HIS-NeTT und HIS-Tpn geschnitten mit den Restriktionsenzymen *Xba I* und *Hind III* und mit *Nhe I* und *Hind III* in pcDNA3.1 eingefügt. Es wurde das Platinum[®]Taq DNA-Polymerase High Fidelity Kit von Invitrogen verwendet.

50 µl PCR-Ansatz

0,5 µl Platinum[®]Taq High Fidelity
 1,5 µl Primer I
 1,5 µl Primer II
 0,5 µg DNA
 1 µl 10 mM dNTPs
 5 µl 10x High Fidelity PCR Puffer
 add ddH₂O

PCR-Programm

95°C 5 Min.
 94°C 30 Sek. }
 62°C 1 Min. } 35-40x
 72°C 2 Min. }
 72°C 10 Min.

4.2.2 Restriktionsverdau

Für die Rekombination bestimmter Nukleinsäuresequenzen wurden PCR Produkte und Plasmid mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Hierdurch wurden gleiche Schnittstellen geschaffen, die es ermöglichten das GOI (*gene of interest*) aus dem PCR Produkt in das Plasmid einzubauen. Die Restriktionsansätze wurden für 1-2 Std. bei 37°C inkubiert.

4.2.3 Isolierung der Fragmente im Agarosegel

Ausgeschnittene DNA-Fragmente aus dem Restriktionsverdau wurden über ein Agarosegel aufgetrennt. Der Verdau (10 µl) wurde mit 6x TBE Probenpuffer (2 µl) vermischt und auf ein 1% Agarosegel aufgetragen (20-30 Min. Laufzeit, 120 V). Es erfolgte die Beurteilung der unterschiedlichen Fragmente mittels eines UV-Transluminators der Größe nach. Die UV-Belichtungszeit musste kurz gehalten werden,

um mögliche DNA Schäden durch das UV-Licht zu minimieren. Die Fragmente wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Nukleinsäure extrahiert. Die Extraktion erfolgte mittels eines Qiaquick Gel Extraction Kit von Qiagen nach Herstellerangaben.

4.2.4 Ligation des *gene of interest* mit dem Plasmid

Nach Gel Extraktion des GOI und des Vektors (Plasmid) wurden beide Fragmente zum Mengenabgleich nochmals auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Ligation des Gens mit dem Plasmid sollte im Verhältnis 4:1 geschehen und erfolgt über Nacht (ÜN) bei 16°C.

4.2.5 DNA Transformation in kompetente *E.coli*

Für die Transformation der DNA in chemisch kompetente *E.coli* Bakterien wurden kompetente *E.coli* (50 µl) auf Eis angetaut und mit 15 µl der zu transformierender DNA vermischt. Nach 20 Min. Inkubation auf Eis erfolgten ein Hitzeschock bei 42°C (1 Min.) und eine Abkühlungsphase (2 Min.) auf Eis. Zu den nun transformierten *E.coli* Bakterien wurde warmes LB-Medium (1 ml) gegeben und der Ansatz für 1 Std. schüttelnd bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf einer LB-Platte (Antibiotium je nach Resistenz des transformierten Plasmid) ausgestrichen und alle transformierten Bakterien wuchsen ÜN bei 37°C.

4.2.6 Plasmid Präparation

Einzelnen wurden die Kolonien mit einer Pipettenspitze abgestrichen und in warmes LB-Medium (4 ml, Amp 1:1000) geworfen. Die DNA aus den kultivierten Bakterien wurde mittels Qiaprep Spin Miniprep Kit von Qiagen nach Herstellerangaben präpariert.

Zur Kontrolle einer korrekten Ligation wurde das Plasmid abermals mit den bereits verwendeten Restriktionsenzymen geschnitten. Zeigten sich auf dem Agarosegel DNA-Banden der erwarteten Größen, konnte der Klon als positiv gewertet werden und wurde in einer Midi-Kultur (20 µl Bakterien (Mini-Kultur), 100 ml LB-Medium, Amp 1:1000) vervielfältigt. So konnte eine ausreichende Menge an DNA mittels eines Plasmid Midi-Kits von Qiagen nach Herstellerangaben isoliert werden. Zur Aufbewahrung der Klone wurden Glycerolstock, bestehend aus 500 µl transformierter *E.coli* und 500 µl 30%igem Glycerol, bei -80°C eingefroren.

4.3 RNA Analysen

4.3.1 RNA Präparation

In den Nachweisanalysen der mit HCMV/MCMV (*mouse CMV*) infizierten Zellen wurde das alternative Splicing von Tpn mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase PCR) untersucht. Dafür musste ausreichende RNA (sechs Mio. Zellen/Probe) aus Zellen isoliert werden, wofür das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet wurde. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, pelletiert, in 600 µl Lysispuffer und 6 µl β-Mercaptoethanol lysiert. Das Lysat wurde über eine QiaShredder-Säule zentrifugiert (2 Min., 12000 rpm, 5417R, Eppendorf) und der Überstand (ÜS) mit 600 µl 70% Ethanol vermischt. Zum Binden der RNA wurde über eine RNeasy Säule zentrifugiert (3 Min., 10000 rpm), die Säulchenmembran anschließend mit zwei unterschiedlichen Puffern gewaschen (15 Sek., 10000 rpm) und die RNA in insgesamt 100 µl RNase-freiem Wasser eluiert (1 Min., 10000 rpm). Die eluierte RNA wurde entweder sofort für die RT-PCR Analyse verwendet oder bei -20°C gelagert.

4.3.2 RT-PCR

Bei der RT-PCR wurde die zu analysierende RNA mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in cDNA umgewandelt, die anschließend amplifiziert werden konnte. Es wurde für die RT-PCR das OneStep RT-PCR Kit von Qiagen verwendet.

20 µl RT-PCR Ansatz

0,8 µl OneStep RT-PCR Enzymmix
 1,2 µl Primer I
 1,2 µl Primer II
 2 µl 150 ng RNA
 0,8 µl 10 mM dNTPs
 4 µl 5x OneStep RT-PCR Puffer
 add ddH₂O

RT-PCR-Programm

50°C 30 Min.
 95°C 15 Min.
 94°C 30 Sek. } 28x
 61°C 30 Sek.
 72°C 30 Sek.
 72°C 10 Min.

4.4 Western Blot

Mit der Western Blot (WB) Analyse konnten intrazelluläre Proteine detektiert werden. Es wurden Proteinlysate hergestellt, die Protein gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer auf eine Membran für die Detektion mit spezifischen AK markiert.

4.4.1 Lysate

Für die Herstellung der Proteinlysate wurde der Luciferase-Lysispuffer (Luciferase Reporter Gene Assay) verwendet. Etwa eine Mio. Zellen pro Probe wurden mit Trypsin gelöst und mit kaltem PBS gründlich gewaschen, zentrifugiert und anschließend in Lysispuffer (70-100 µl) resuspendiert und bei -20°C für mindestens 20 Min. eingefroren. Bevor die Lysate weiter verwendet werden konnten, wurden sie nach einer kurzen Auftauphase, zentrifugiert (30 Min., 4°C, 13000 rpm, 5417R, Eppendorf), um die Proteine von den Membranresten zu trennen. Der ÜS mit den Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden analysiert oder bei -20°C gelagert.

4.4.2 Gelelektrophorese

Für die Elektrophorese der Proteine musste zunächst das Gel (Trenn- und Sammelgel) hergestellt werden. Zum Abglätten der Oberfläche des Trenngels wurde direkt nach dem Gießen eine dünne Schicht Isopropanol hinzugefügt. Nach Polymerisierung und Entfernung des Isopropanols konnte das Sammelgel auf das Trenngel gegossen werden. In das noch unpolymerisierte Sammelgel wurde ein Kamm gesteckt, der nach Entfernung im festen Gel Proben-Taschen hinterließ. Diese mussten vor Beladung gründlich mit Lämmli-Puffer ausgespült werden. Nach Denaturierung der Proteine (5 Min., 95°C, in 5x SDS Probenpuffer), erfolgte die Probenaustragung (max. 24 µl/Tasche; Abb. 9, ①). Bei 20 mA erfolgte die Proteinauftrennung (50-70 Min. Laufzeit; ②). Kleinere Proteine wanderten dabei schneller von der Kathode zur Anode, sodass diese weiter unten im Gel zu erwarten waren.

4.4.3 Blotting

Für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran wurde auf die Anode des Blotters eine dreilagige Schicht Whatman-Papier (3 mm dick) gelegt. Auf diese folgten die Nitrocellulose-Membran und das Gel, welches möglichst glatt (ohne

Luftblasen) aufliegen sollte. Von oben wurde das Gel zusätzlich mit einer dreilagigen Schicht Whatman-Papier und einer Kathode abgedeckt (③). Die Membran sowie das Whatman-Papier wurden zuvor in Blotting-Puffer getränkt. Bei 14-16 mV erfolgte die Übertragung der Proteine abhängig ihrer Größe aus dem Gel auf die Membran (70 Min.). Um den erfolgreichen Transfer zu visualisieren, konnte die Membran mit einer reversiblen Färbung (Ponceau) gefärbt werden.

4.4.4 Detektion

Auf der Nitrocellulose-Membran konnten nun die Proteine durch spezifische AK-Bindung dargestellt werden. Die Membran wurde zunächst mit 5% Milchpulver (45 Min.) vorbehandelt, um so unspezifische AK-Bindungen zu vermeiden. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen primären AK (Tabelle 3) schwenkend, zur gleichmäßigen Benetzung der Membran, inkubiert (1 Std. bei RT oder 4°C ÜN). Der primäre AK wurde abgossen, die Membran mit TBST kurz abgespült und weiter für 45-60 Min. mit einem sekundären AK inkubiert, der die FC-Region des primären AK erkannte (Abb. 9, ④). Nach gründlichem Waschen in TBST konnten die durch die AK markierten Proteine auf der Membran mit Hilfe eines WB-Detektionsreagenz und Fotofilme detektiert werden.

Dieselbe Membran konnte für weitere Proteinanalysen (der bereits aufgetragenen Proben) wiederverwendet werden. Dafür wurde die Membran in Reblot-Puffer für 5-10 Min. geschwenkt. Hierdurch lösten sich die AK-Bindungen von den bereits detektierten Proteinen. Für die neue Detektion wurde die Membran wieder in Milchpulver inkubiert und anschließend mit primären und sekundären AK behandelt.

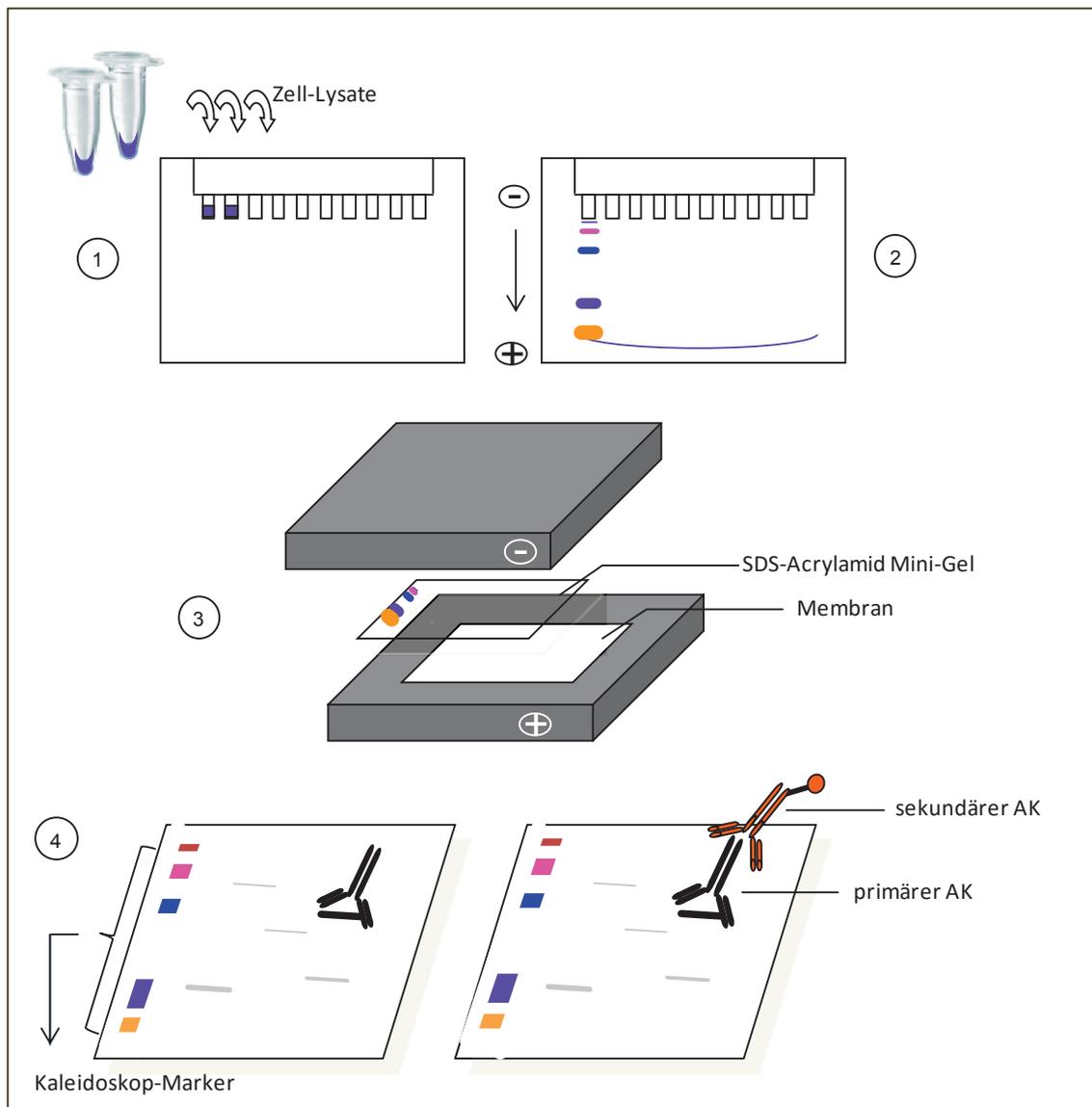


Abb. 9: Western Blot.

Versuchsaufbau eines WB. ① Übertragung der Proteinlysate in die Geltaschen. ② Mini-Gel nach Gelelektrophorese (rechts), die Front (lila Linie) zeigt den Abschluss der Proteinauftrennung an. ③ Blotting-Apparatur, Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran. ④ Primäre und sekundäre AK-Bindung, in bund dargestellt der Kaleidoskop Proteingrößenmarker.

4.5 Immunopräzipitation

4.5.1 Immunopräzipitation von metabolisch markierten Proteinen

Mit der Immunopräzipitation (IP) von metabolisch markierten Proteinen wurden intrazelluläre Protein-Protein Interaktionen analysiert. Radioaktiv markierte AS wurden in neusynthetisierte Proteine eingebaut, die nach Zelllyse durch Autoradiographie detektiert wurden. Je nach verwendetem Detergenz wurden Wechselwirkungen innerhalb des intakten PLC (Digitonin) oder nur einzelne Komponenten nach Trennung der hydrophoben Interaktionen (NP40) analysiert (Abb. 10, ②).

Die zu analysierenden Zellen wurden einen Tag vor der Analyse auf einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät (1 Loch für eine IP-Probe). Vor der metabolischen Markierung wurden die Zellen mit 37°C warmen PBS gewaschen und in Met- und Cys-freiem Medium (Hungermedium) inkubiert (30-60 Min.). Danach wurde das Hungermedium durch frisches Medium, versetzt mit radioaktiv markiertem [³⁵S]-Met/Cys (3,7 MBq/ml), ersetzt und die Zellen je nach Analyse für 7-60 Min. bei 37°C metabolisch markiert (①). Um anschließend die weitere Proteinsynthese zu stoppen, erfolgten alle weiteren Bearbeitungsschritte auf Eis oder 4°C. Das radioaktive Medium wurde abgesaugt und die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das PBS sehr gründlich entfernt und die Zellen in je 1 ml Lysispuffer für 30 Min. lysiert (②), ehe eine Zentrifugation erfolgte (30 Min, 4°C, 13000 rpm, 5417R, Eppendorf). Zur Minimierung der Hintergrundbanden wurden nur 900 µl des ÜS in neue Reaktionsgefäße, in denen der jeweilige AK (Tabelle 3) bereits vorgelegt war, überführt (③) und rotierend inkubiert (1 Std., 4°C). Dann wurde für eine weitere Std. ein Tropfen (ca. 35 µl, mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze) Protein G Sepharose (PGS) oder Protein A Sepharose (PAS) hinzugegeben (④). Je nach verwendetem AK erkannte PGS und/oder PAS die Fc-Region des AK, sodass durch die Sepharosebeats der AK-Protein-Komplex präzipitiert werden konnte (die in dieser Arbeit verwendeten AK konnten durch beide (PGS und PAS) erkannt und präzipitiert werden). Es folgten mehrere Waschschriffe der Sepharose mit unterschiedlichen Waschpuffern (je zweimal Waschpuffer B und C, sowie einmal Waschpuffer D). Nach dem letzten Waschschrift wurde die Sepharose sehr gründlich abgesaugt und in 40 µl 1x IP-Probenpuffer aufgekocht (5 Min., 95°C), auf Eis abgekühlt, mit 8 µl 0,5 M Iodoacetamid vermischt und nochmals zentrifugiert (5 Min., 4°C, 13000 rpm). Die Proben wurden

anschließend auf ein großes Gradienten-Gel (Tabelle 1) aufgetragen und die Proteine trennten sich elektrophoretisch ihrer Größe nach auf (⑤). Es wurden fast ausschließlich 10-11,5% Gradientengele verwendet, wobei der 11,5%ige Acrylamid-Anteil zuerst, dann eine Vermischung der beiden Anteile und zuletzt der 10%ige Acrylamid-Anteil gegossen wurde. Je höher der Acrylamid-Gehalt desto besser war die Auftrennung von Proteinen mit kleinem Molekulargewicht. Die Proben wurden zusammen mit einem [C^{14}]-Größenmarker aufgetragen und aufgetrennt (13 Std., 20 mA). Das Gel wurde in einer Fixierungslösung fixiert (45 Min.) und auf einem Gelrockner getrocknet (2 Std., 80°C). Zur Detektion des radioaktiven Signals wurde ein Röntgenfilm auf das getrocknete Gel gelegt, welcher abhängig der gewünschten Signalstärke länger oder kürzer, mindestens aber 1 ÜN, exponiert wurde. Zusätzlich wurde von einigen IPs die Strahlenintensität anhand eines Phosphor-Imager (AIDA Image Analyzer und Raytest Software, Straubenhardt Deutschland) quantifiziert.

4.5.2 Analyse von Immunkomplexen durch wiederholte IP

Bei der Analyse von Immunkomplexen durch wiederholte IP handelte es sich um eine zweifache IP von metabolisch markierten Proteinen. Hierdurch waren detailliertere Schlussfolgerungen über spezifische Interaktionen möglich.

Zuerst erfolgte eine einfache IP (siehe 4.5.1) mit zwei bis drei Mio. Zellen pro Probe. Die Zelllyse erfolgte mit Digitonin und es wurde die zwei- bis dreifache Menge an AK verwendet. Das Sepharose-Sediment wurde nach dem Waschen in 100 μ l 1,5% (w/v) haltigem SDS NP40-Lysispuffer inkubiert (30 Min., 65°C), auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (10 Min., 4°C, 13000 rpm, 5417R, Eppendorf). 100 μ l des ÜS wurden in ein neues Reaktionsgefäße überführt. Das Sepharose-Sediment wurde nochmals mit 1 ml NP40-Lysispuffer gewaschen, kurz zentrifugiert und anschließend wurde dieser ÜS ebenfalls in das neue Reaktionsgefäße gegeben. So wurde SDS auf eine Endkonzentration von 0,15% verringert. Danach wurde eine zweite IP mit einem anderen AK durchgeführt (siehe 4.5.1, ab dem Zeitpunkt (ZP) der AK Zugabe).

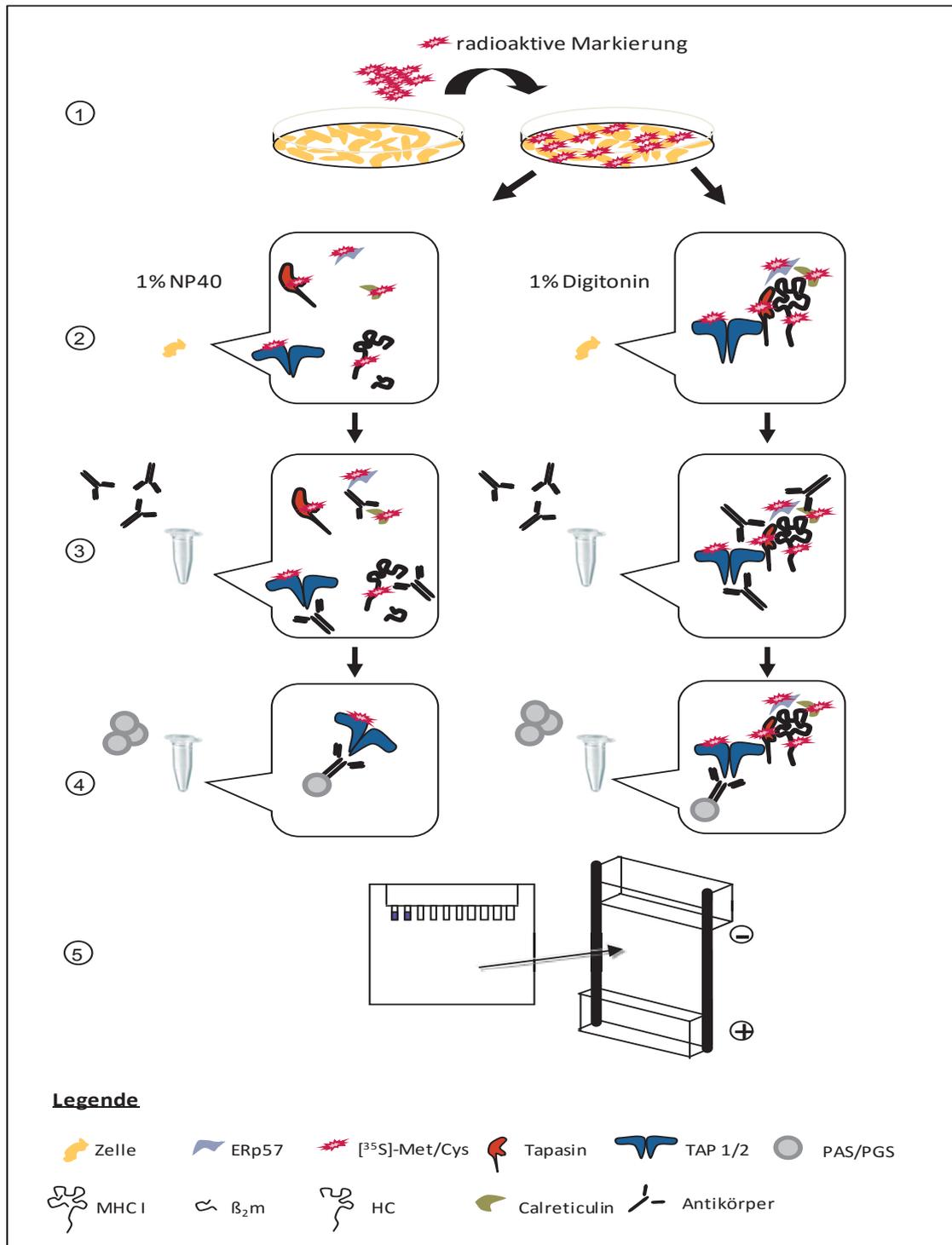


Abb. 10: IP metabolisch markierter Proteine.

Schematische Darstellung einer IP. ① Radioaktive Markierung von Zellen mit [³⁵S]-Met/Cys (rote Sterne). ② Zelllyse in Digitonin- (rechte Spalte) oder NP40- (linke Spalte) Lysispuffer. ③ AK-Protein-Bindung (ein AK/IP). ④ Zugabe von PAS/PGS sowie Präzipitation des AK-Protein-Komplexes. ⑤ Probenauftragung auf ein großes IP-Gradientengel. Nicht dargestellt: Fixierung und Trocknung des Gels, Detektion der Proteine durch einen Kodak Film mittels Autoradiographie.

4.5.3 IP von nicht markierten Proteinen

Eine IP von nicht markierten Proteinen erlaubte Analysen von nicht neusynthetisierten Protein-Protein Interaktionen. Zwei Mio. Zellen wurden gewaschen und in 600 µl Lysispuffer für 20 Min. lysiert und anschließend zentrifugiert (siehe 4.5.1). Der ÜS wurde mit der zweifachen AK-Menge rotierend inkubiert (1 Std. oder ÜN, 4°C). Die Präzipitation durch PAS/PGS sowie die Waschschrirte und die elektrophoretische Auftrennung verliefen wie in 4.5.1. Die Detektion der Proteine erfolgte aber mittels WB-Analysen (4.4.3 und 4.4.4).

4.6 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Dichte definierter Zelloberflächenmoleküle mittels monoklonaler AK wurden Durchflusszytometrie-Analysen (FACS) durchgeführt. Dazu wurden die Moleküle mit Fluophor-gekoppelten AK markiert, welche bei Anregung durch Laser bestimmter Wellenlängen detektierbare Signale abgaben.

Eine FACS-Probe bestand aus einer halbe bis einer Mio. Zellen. Die Zellen wurden in kaltem FACS-Puffer (PBS, 3% FCS) mehrmals gewaschen und zentrifugiert (4 Min., 4°C, 1200 rpm, 5810R, Eppendorf). Das Zellsediment wurde zuerst mit einem primärem AK, welcher spezifisch gegen das zu messende Molekül gerichtet war, in einem Volumen von 100 µl resuspendiert und inkubiert (30 Min., auf Eis), anschließend erfolgte nach mehrfachem Waschen, die Inkubation mit einem sekundären, Fluophor-gekoppelten AK (GAM-APC) im Dunkeln (30 Min., auf Eis). Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) aufgenommen. DAPI drang schneller in tote als in lebendige Zellen ein. Durch das Setzen von Populationsgates (auf die ungefärbten Zellen) konnten die toten Zellen in der FACS-Diva-Software von der Messung ausgeschlossen werden (Abb. 11). In den FACS-Analysen von den Experimenten Abb. 36 und Abb. 37 wurden die Zellen mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) exprimierenden Vektor ko-transfiziert, sodass zusätzliches Populationsgate gesetzt werden konnten, die nur positiv transfizierte Zellen in die Analyse mit einschlossen (Abb. 11, Mitte).

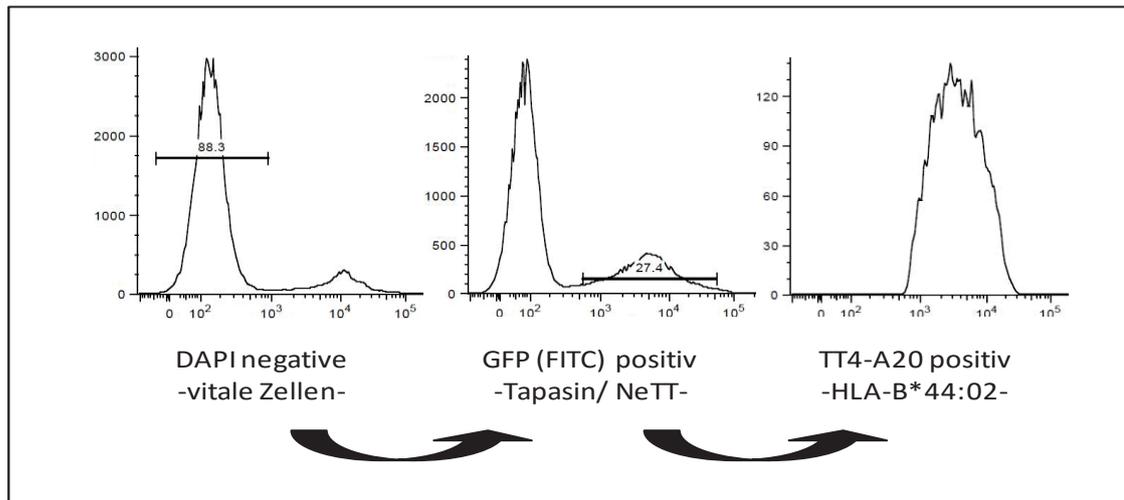


Abb. 11: Eingrenzung von Zellpopulationen im FACS.

Drei unterschiedliche Färbungen einer FACS-Analyse. Die linke und mittlere Grafik dienen zur Voreinstellung für die eigentliche Messung (rechts). Linke Grafik zeigt die Färbung mit DAPI, große Population entspricht ungefärbten Zellen (DAPI-negativ = lebendige Zellen), die Trennlinie (Gate) umfasst lebendige Zellen. Diese Einstellung wurde für die weiteren Messungen übernommen. Mittlere Grafik zeigt die Messung von *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) gefärbten Zellen, d.h. kleine Population rechts = GFP positive Zellen (transfizierte Zellen die NeTT/Tpn und gleichzeitig GFP exprimierten), große Population links = nicht-transfizierte Zellen, das Populationsgate der GFP positiven Zellen wurde ebenfalls für weitere Messung übernommen. Rechte Grafik (eigentliche Analyse) zeigt die Färbung für das Oberflächenmolekül (HLA-B*44:02) und dessen Expressionsstärke.

4.7 Transfektion und stabile Zelllinien

4.7.1 Transfektion mit Superfect

Zur Expression gewünschter Gene wurden Plasmide (die das GOI kodierten) in unterschiedliche Zellen transfiziert. So konnten 16-20 Std. nach Transfektion Proteinabhängige Analysen durchgeführt werden. Zellen wurden zunächst auf einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät, sodass sie zum ZP der Transfektion eine Konfluenz von 60-75% besaßen. Vor Zugabe des Transfektionsansatzes wurden die Zellen vorsichtig mit warmen PBS gewaschen. Es wurde je ein Ansatz auf ein Loch der 6-Loch-Zellkulturplatte pipettiert und bei RT inkubiert (10 Min.), ehe 650 µl Medium (mit Zusätzen) hinzugefügt und der dünn benetzte Zellrase im Brutschrank kultiviert wurde (4 Std., 37°C). Anschließend wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

4.7.2 Generierung stabiler Transfektanten

Am Beispiel von HeLa-HLA-B*44:02 Zellen (HeLa-44:02) wird die Generierung von stabilen Transfektanten beschrieben.

HeLa-Zellen wurden mit dem MHC Klasse I Allel HLA-B*44:02 in pcDNA3.1 nach Transfektionsprotokoll transfiziert. 24 Std. danach wurde ein Selektionsantibiotikum G418 (1-2 mg/ml) dem Medium hinzugefügt. Durch den Selektionsdruck starben innerhalb weiterer 48 Std. die Zellen, die nicht den HLA-B*44:02 Vektor inseriert und somit keine G418-Resistenz erworben hatten. Alle lebendigen Zellen wurden auf eine Gitterschale umgesetzt mit je einer transfizierte Zelle pro Gittervertiefung, um so das Wachstum eines homogenen Zellklones zu ermöglichen. Nachdem sich eine Zelle mehrfach geteilt hatte, wurden diese in ein Loch einer 96-Loch-Zellkulturplatte umgesetzt. Füllte der Zellklon die Fläche der Zellkulturplatte aus, wurde er auf eine größere Zellkulturplatte umgesetzt. Ab einer Zellzahl von mehr als 1 Mio. wurden die Transfektanten (jeder Zellklon) mittels FACS-Analyse auf die Expression des HLA-B*44:02 Allels getestet (Abb. 12).

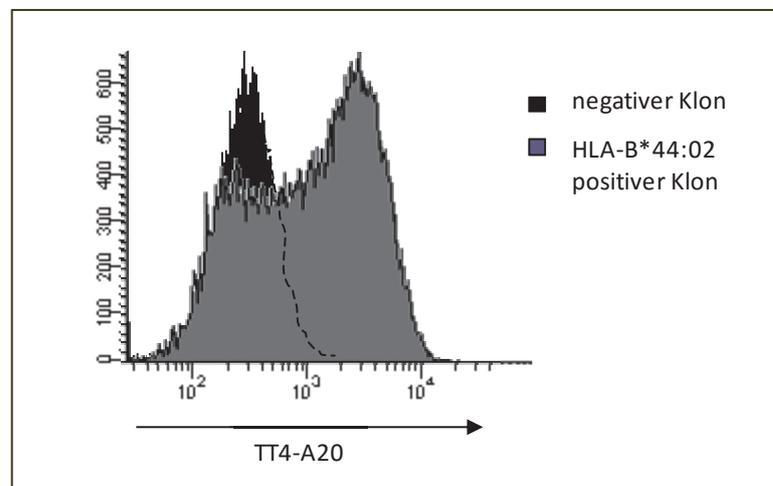


Abb. 12: HeLa-44:02 Klone.

Messung der HLA-B*44:02 Oberflächenexpression von stabil transfizierten HeLa-44:02 Klone, per FACS-Analyse. Die Färbung erfolgte mit dem HLA-B*44 spezifischen TT4-A20 AK. Die schwarze Kurve (Hintergrund) zeigt eine negative Zellpopulation. Die graue Kurve (rechter Gipfel) spiegelt die stabil transfizierte Zellpopulation wieder, der linke graue Gipfel, die der nicht transfizierten Zellen derselben Population.

Von 21 getesteten Klonen waren nur zwei Klone positiv. Selbst in diesen Klonen exprimierten nicht alle Zellen das HLA-B*44:02 Allel, obwohl eine G418 Resistenz bestand (Abb. 12). Die HeLa-44:02 Zellen wurden deshalb auf die HLA-B*44:02 Expression, mittels eines durchflusszytometrischen Zellsortierers mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Daniel Degrandi und Dr. Philipp Dresing (Mitarbeiter des Instituts für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der HHU, Düsseldorf) selektiert.

4.8 Lentivirales Expressionssystem

Die Generierung von Lentiviren und deren Transduktion verlief teilweise parallel, sodass hier eine Darstellung nach Tagen erfolgt.

Tag 1 HEK 293T Zellen wurden auf einer Schale (10 cm Durchmesser) mit einer Zellzahl von 5×10^6 am Tag vor der Transfektion ausgesät.

Tag 2 Für die Transfektion der lentiviralen Vektoren wurden zwei Ansätze (A und B) vorbereitet.

Ansatz A

1 ml DMEM

45 µg PEI (Transfektionsreagenz)

Ansatz B

1 ml DMEM

6 µg pCD/NL-BH (gag/pol)

6 µg VSV-G-Plasmid (env)

6 µg Vektor

Ansatz A und B wurden gut miteinander vermischt und für 15-20 Min. bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den HEK 293T Zellen abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit warmen PBS gewaschen. Es wurden 4 ml Medium zu den Zellen gegeben, der Transfektionsansatz hinzugefügt und die HEK 293T Zellen ÜN im Brutschrank inkubiert.

Tag 3 Ersatz des Transfektionsmediums durch frisches Medium (10 ml).

Vorbereitung für die Transduktion: die zu transduzierenden Zellen wurden in 6-Loch-Zellkulturplatten für den nächsten Tag (10^6 Zellen) ausgesät.

Tag 4 Das Medium mit den produzierten Lentiviren wurde abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter steril filtriert und zur Transduktion verwendet. Die HEK 293T Zellen wurden entsorgt.

Transduktion: In jedes Loch der 6-Loch-Zellkulturplatte wurden 2 ml der filtrierten Lentiviren, vermischt mit Polybrene (4-8 µg/ml), gegeben. Suspensionzellen ($0,5-1 \times 10^6$) wurden in 1,5 ml Virusüberstand und Polybrene (4-8 µg/ml) aufgenommen und kultiviert (37°C).

Tag 5 Ersatz des lentiviralen Mediums durch frisches Medium.

Tag 6 Abhängig des verwendeten lentiviralen Vektors wurden die unterschiedlichen Selektionsreagenzien (1-2 mg/ml G418 oder 2-5 µg/ml Puromycin (Puro)) dem Medium hinzugefügt und alle zwei bis drei Tage gewechselt.

4.9 Tet-on System: induzierbare NeTT Expression

Im Rahmen des lentiviralen Expressionssystems soll ein weiterer Vektor (Tet-ON-System) vorgestellt werden, bei dem die NeTT-Expression gezielt induziert werden konnte.

4.9.1 Molekularer Hintergrund

Das Tet-ON induzierbare Expressionssystem ließ sich mit einem Induktor regulieren. Der Tet-ON-IRES-Neo Vektor (TeT-ON) exprimierte einen durch Doxzyklin (Doxy) kontrollierbaren transkriptionellen Transaktivator (TA). Dieser TA wurde ununterbrochen transkribiert. In Anwesenheit von Doxy, welches an eine Tet05-Sequenz des pCL12msc-NeTT-IRES-Puro Vektors (PCL12msc-NeTT) band, wurde der Promotor aktiviert und das GOI (NeTT) exprimiert (Abb. 13). Die Tet05-Sequenz setzte sich aus modifizierten Tet-Responsive-Elements (TRE), die aus fünf Wiederholungen bestand, zusammen. Dem in dieser Arbeit verwendeten Vektor fehlten zwei Wiederholungen (ursprünglicher Vektor besitzt eine Tet07-Sequenz), wodurch hier eine geringe Menge

an NeTT auch ohne Doxy-Induktion synthetisiert wurde (Abb. 21 C, Spur 2). Nach 100 nM Doxy wurde die Expression von NeTT deutlich induziert (Spur 5).

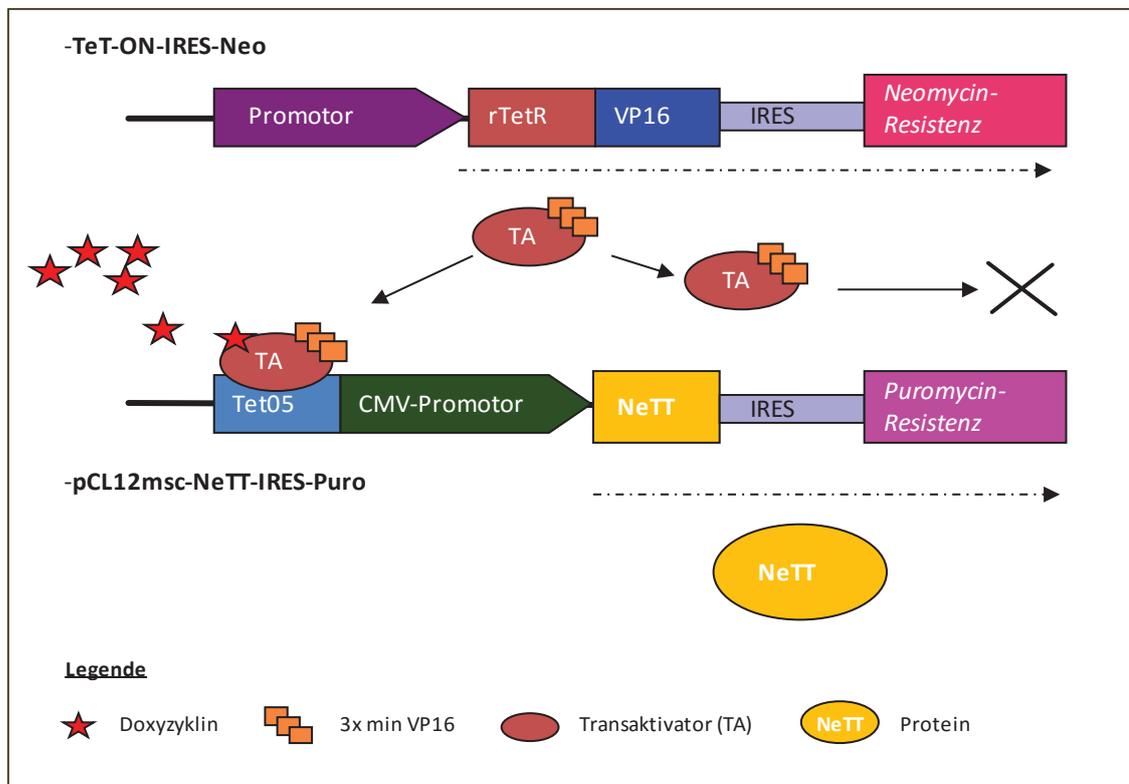


Abb. 13: TeT-ON Vektorsystem.

Das TeT-ON System bestehend aus zwei Vektoren (TeT-ON-IRES-Neomycin (Neo) und pCL12msc-NeTT-IRES-Puro). Der TeT-ON Vektor bildet permanent einen Doxy-kontrollierten TA, der nur in Gegenwart von Doxy an die Tet05-Sequenz des pCL12msc-NeTT-IRES-Puro Vektor binden kann. Der CMV-Promotor (grün) wird aktiviert und NeTT (gelb) synthetisiert. Der TA ist eine Fusionsprotein aus einem rTetR Element und drei kleinen Aktivierungsdomänen aus dem VP16 Protein (modifiziert nach Clontech).

4.9.2 Selektionsverfahren

Durch eine Neo-Resistenz des Tet-ON-Vektors und eine Puro-Resistenz des pCL12msc-NeTT Vektors konnten die Zellen zweifach selektiert werden, so dass nur die Zellen überlebten, die tatsächlich mit beiden Vektoren erfolgreich transduziert waren.

Nach der Transduktion wurden die Zellen zuerst mit G418 (1-2 mg/ml) selektiert (Abb. 14, ②). Es starben alle Zellen, die nicht den Tet-ON-Vektor integriert hatten. Danach wurden die Zellen mit Doxy induziert (③), sodass der TA an den pCL12msc-NeTT Promotor band. Zellen, die ebenfalls den pCL12msc-NeTT Vektor integriert hatten,

synthetisierten NeTT und wiesen eine Puro-Resistenz auf. Durch die Puro-Selektion (500-750 ng/ml) überlebten deshalb nur Zellen die NeTT exprimierten (HeLa-NeTT_{ind}).

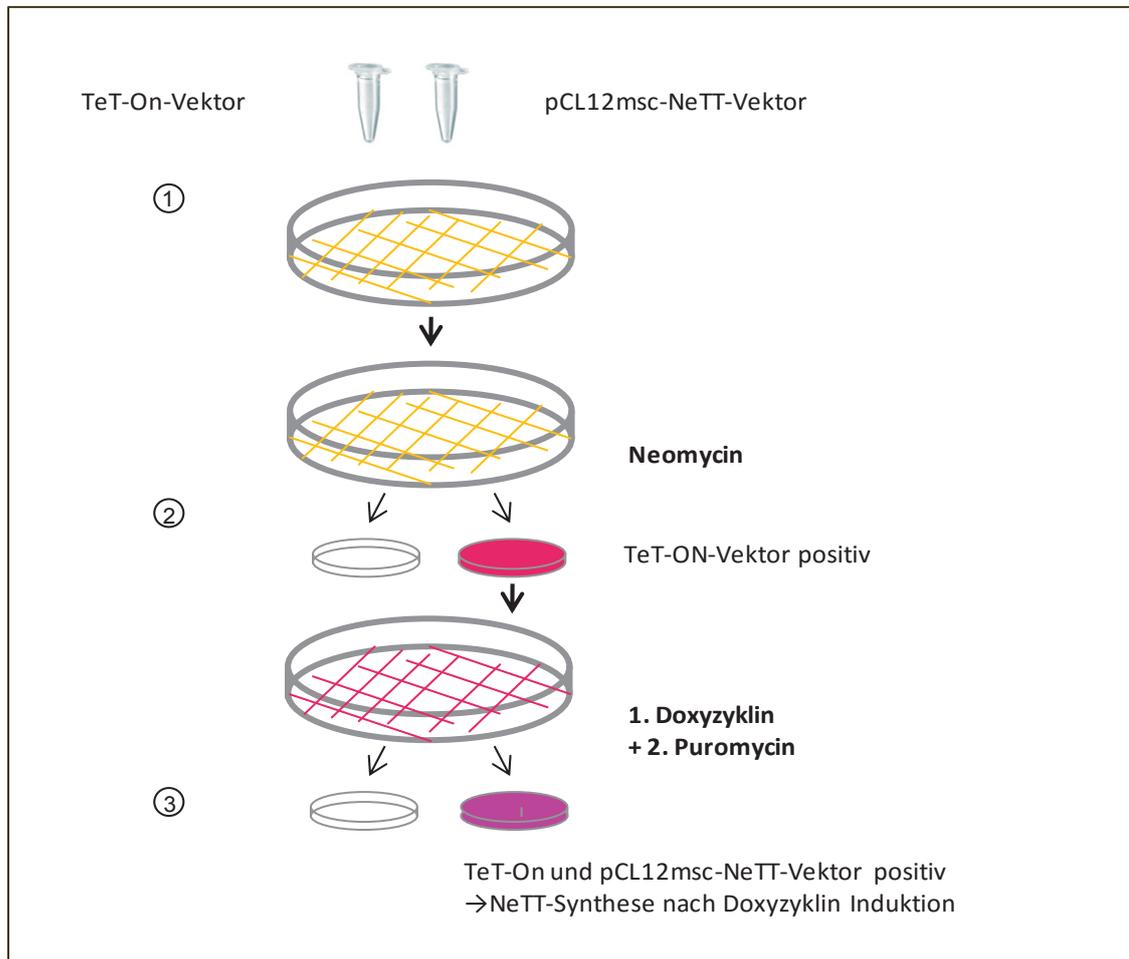


Abb. 14: Generierung stabiler HeLa-NeTT_{ind}-Zellen.

Schematische Darstellung der Generierung stabiler HeLa-NeTT_{ind}-Zellen. ① Doppeltransduktion von HeLa-Zellen mit Tet-ON und pCL12msc-NeTT Vektor. ② Selektion mit Neo, rosa Schale: TeT-ON-Vektor positive Zellen, weiße Schale: TeT-ON-Vektor negative Zellen. ③ Induktion mit Doxy, gefolgt durch eine Selektion mit Puro, lila Schale: Zellen die NeTT synthetisieren und Puro-resistent sind (TeT-ON und pCL12msc-NeTT positiv), weiße Schale: TeT-ON-Vektor positiv, aber pCL12msc-NeTT negativ.

4.10 Konfokale Lasermikroskopie

Die konfokale Lasermikroskopie eignete sich zur Lokalisation von Proteinen und subzelluläre Kompartimenten innerhalb einer Zelle.

Suspensionszellen mussten auf Objektträgern befestigt werden. Glasplättchen wurden mit 0,1% Polylysin überdeckt (30 Min., 37°C), mit H₂O gereinigt und an der Luft getrocknet. Die Suspensionszellen wurden währenddessen gesammelt ($2,5 \times 10^5$ /Glasplättchen), zentrifugiert (5 Min., 1000 rpm, 5810R, Eppendorf), in PBS (75 µl) resuspendiert und als Tropfen auf die Plättchen gegeben (15 Min., 37°C).

Adhärente Zellen (4×10^4 Zellen/Glasplättchen) wuchsen ÜN direkt auf den Glasplättchen.

Zur Fixierung von Suspensionszellen und der adhärennten Zellen auf den Plättchen wurde 3%iges ParaFormaldehyd (500 µl) auf den Plättchen mit den Zellen verteilt (10 Min., 37 °C). Nach einem Waschschrift in PBS (5 Min.) wurden die Zellmembranen mit dem Detergenz Triton X-100 (in PBS verdünnt) permeabel gemacht (7 Min., 0,1% Triton X-100). Die Proben wurden erneut dreimal mit PBS (5 Min.) gewaschen, bevor sie kopfüber auf ein Tropfen AK (20-30 µl) gestülpt und inkubiert (30 Min.) wurden. Nach einem Waschschrift erfolgte die Inkubation mit einem sekundären AK (30 Min.). Zur Fixierung der Glasplättchen auf einem Objektträger wurden die Proben auf einen Mowiol®-Tropfen (Polyvinylalkohol) gelegt und ÜN im Dunkeln luftgetrocknet. Die Analysen erfolgten mit dem Zeiss LSM 510 Confocal Mikroskop.

5 Ergebnisse

Essentiell für die optimale Peptidbeladung und damit der MHC I Antigen Präsentation sind intakte Wechselwirkungen zwischen allen Komponenten des PLC sowie die Funktionalität des MHC I Chaperons Tpn. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass HCMV die Rekrutierung von MHC I Molekülen in den PLC inhibiert (Halenius et al., 2011). Die dafür verantwortlichen Faktoren konnten noch nicht identifiziert werden. Im Rahmen dieser Analysen wurde jedoch NeTT entdeckt, dem Exon 3 fehlt und somit Cys95, was zu einer von Tpn verschiedenen Proteinfunktion von NeTT führen könnte. Die vorliegende Arbeit verfolgte die Hypothese, dass NeTT die Komposition und Funktion des PLC stört und damit ein Inhibitor des MHC I Antigen Präsentationswegs sein könnte.

5.1 Analyse der NeTT Transkription

Vorhergehende semiquantitative RT-PCR Analysen (Abb. 8) hatten gezeigt, dass HCMV die Tpn mRNA im Verlauf der Infektion reduzierte. Gleichzeitig schien es, als ob die Entstehung des NeTT Transkriptes durch die HCMV-Infektion induziert wurde. Eine plausible Erklärung gab es zunächst nicht, da beide Transkripte aus einem Gen stammten. Wie konnte die Synthese des einen Transkriptes inhibiert werden, während das andere im PCR Nachweis stärker generiert wurde? Das verwendete Primerpaar amplifizierte die komplette kodierende Sequenz der Tpn mRNA (TpnE1-8.frwd/rew.; Tabelle 2). Deshalb sollte genauer überprüft werden, ob die steigende Menge von NeTT tatsächlich auf eine Induktion zurückgeführt werden konnte, oder ob NeTT an relativer Stärke zunahm, weil die Tpn Menge reduziert und daher die Amplifikation von NeTT begünstigt wurde. Es sollten zwei unterschiedliche Ansätze betrachtet werden. MRC-5 Fibroblasten wurden entweder mit INF γ , um die Tpn Synthese zu induzieren, stimuliert oder mit HCMV infiziert. Desweiteren fand eine Optimierung der Bedingungen für die Quantifizierung von NeTT statt. Zum einen wurden neue Primer generiert (SH Exon 2/ SH Exon 4; Tabelle 2), die in der Region vor und nach Exon 3 banden, zum anderen wurde die Elongationszeit verkürzt. Im Vergleich zu Tpn wurde reproduzierbar weniger NeTT Transkript amplifiziert, dessen Menge allerdings bei infizierten Zellen eindeutig anstieg (Abb. 15). Für die Bestimmung der tatsächlichen Menge von NeTT wurden in der Dissertation von Sebastian Hauka (Institut für Virologie HHU, Düssel-

dorf) quantitative RT-PCRs durchgeführt, die die semi-quantitative Analysen aus Abb. 15 bestätigten (Beutler et al., 2013).

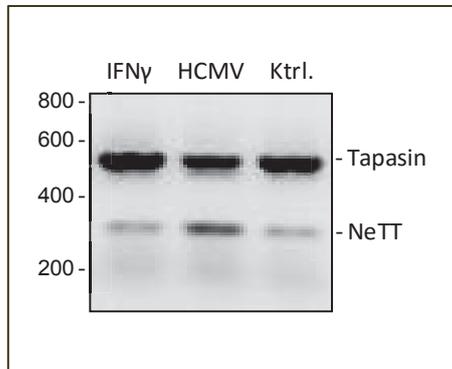


Abb. 15: Induzierte Amplifikation von NeTT in HCMV infizierten Zellen.

MRC-5 Zellen wurden mit HCMV (AD169, MOI 3) infiziert, IFN γ - (500 U/ml) stimuliert oder nicht behandelt (Ktrl.). Mit der isolierten RNA wurde eine RT-PCR mit dem Primerpaar SH Exon 2/ SH Exon 4 und einer Elongationszeit von 15 Sekunden (Sek.) durchgeführt.

Interessanterweise wurde NeTT nicht nur in HCMV-infizierten Zellen beobachtet. Auch in anderen humanen Zelllinien, wie beispielsweise HeLa, HEK 293 T und MRC-5 Zellen, konnte ein NeTT Transkript amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus sollte eine andere Spezies auf die Entstehung des alternativ gespleißten Tpn Transkript getestet werden. Murine Fibroblasten (NIH 3T3) wurden in einer Infektionskinetik unterschiedlich lang mit MCMV infiziert bevor eine RT-PCR erfolgte (Abb. 16).

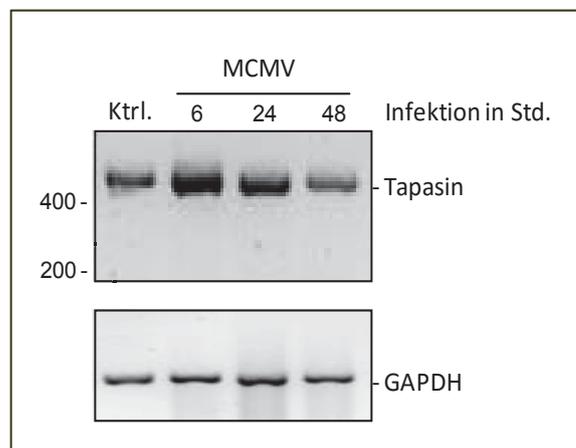


Abb. 16: NeTT kann in murinen Fibroblasten nicht nachgewiesen werden.

NIH 3T3 Fibroblasten wurden mit MCMV infiziert (C3X, MOI 3) oder nicht behandelt (Ktrl.). 6, 24 und 48 Std. nach Infektion wurde die RNA isoliert und es erfolgte eine RT-PCR mit dem Primerpaar NB Exon 2/NB Exon 4. Zur Kontrolle der verwendeten RNA Menge wurde parallel eine GAPDH spezifische RT-PCR durchgeführt.

In murinen Zellen konnte ebenfalls durch Infektion mit MCMV nach initialer Induktion (6 Std. nach Infektion) eine Reduktion der Tpn mRNA beobachtet werden (48 Std. nach Infektion). Anders jedoch als in humanen Zellen deutete nichts auf die Entstehung von NeTT hin.

Zusammenfassung:

- Die HCMV-Infektion führt zu einem alternativ gespleißten Tpn Transkript, NeTT.
 - NeTT kann aus humanen Zellen amplifiziert werden und wird verstärkt bei HCMV-Infektion synthetisiert.
 - NeTT kann in murinen 3T3 Fibroblasten, auch nach MCMV-Infektion, nicht nachgewiesen werden.
-

5.2 Charakteristiken von NeTT

Die RT-PCR-Analysen deuteten darauf hin, dass HCMV die Entstehung von NeTT induzierte (Abb. 15). Ein inhibierender Einfluss des alternativ gespleißten Tpn Transkriptes auf die MHC I Antigen Präsentation wäre somit möglich. Exon 3 kodiert u.a. das Cys95, was für die Funktionalität des Tpn Proteins, nämlich der Ausbildung eines Heterodimers mit ERp57, von Bedeutung ist (Abb. 20). Es besteht aus 261 Basenpaaren, damit kodiert Exon 3 exakt 87 AS. Der Leserahmen für die Translation der dahinterliegenden Exons sollte nicht verschoben sein und eine Translation des NeTT Proteins wäre möglich.

5.2.1 Das NeTT Transkript kodiert für ein „stabiles“ Protein

Unnatürlich veränderte und nicht funktionelle Proteine sind oft instabil und werden deshalb sehr schnell degradiert. Durch die kurze Halbwertszeit wird der Nachweis solcher Proteine erheblich erschwert. Im folgenden Experiment wurde analysiert, ob die alternativ gespleißte Tpn mRNA in ein stabiles Protein translatiert und dieses detektiert werden konnte. Dazu wurde die isolierte NeTT cDNA in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert und in HeLa-Zellen transfiziert. Für die Detektion im WB wurde ein polyklonaler Kaninchen anti-Tpn AK verwendet, der gegen die letzten C'-terminalen 20 AS von Tpn gerichtet ist. Durch die anzunehmende identische Sequenz des C'-Terminus von Tpn und NeTT sollte der AK auch NeTT erkennen.

Aus Zelllysaten der NeTT transfizierten Zellen wurde ein Protein mit der zu erwartenden Größe von ca. 40 kDa detektiert (Abb. 17, Spur 4-5). Es wurden keine zusätzlichen Banden, die auf Degradationsprodukte hinweisen könnten, im WB erkennbar. Das NeTT Transkript scheint somit ein Protein zu kodieren, welches strukturell stabil ist

(der verwendete anti-Tpn AK wird deshalb folgend als anti-Tpn/NeTT AK bezeichnet).

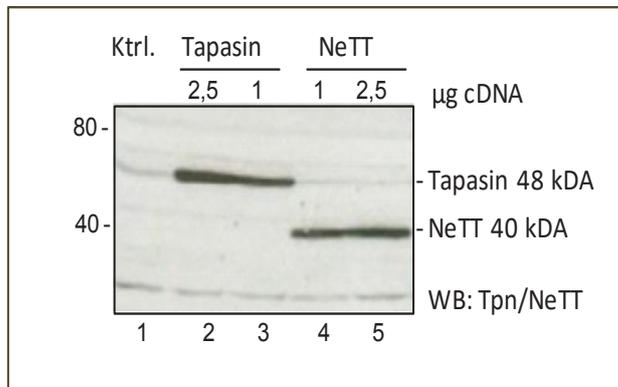


Abb. 17: Das NeTT Transkript kodiert ein „stabiles“ Protein.

HeLa-Zellen wurden transient mit variierenden Konzentrationen Tpn und NeTT pcDNA3.1 (1µg; 2,5µg) oder Kontroll- (Ktrl.) transfiziert. 24 Std. nach der Transfektion wurden Lysate hergestellt. Die Detektion im WB erfolgte mit dem anti-Tpn/NeTT AK.

5.2.2 NeTT wird glykosyliert und ist im ER lokalisiert

Das Typ I TM-glykoprotein Tpn wird an einer einzigen Asparaginsäure (Asn233) glykosyliert. Das Kodon für diese Asn liegt außerhalb des Exon 3, weshalb für NeTT, wenn es wie Tpn im ER lokalisiert ist, ebenfalls die Nutzung dieser Glykosylierungsstelle vermutet werden kann. Zur Bestätigung wurde ein Endo H Verdau durchgeführt (Abb. 18). Endo H deglykosyliert mannosereiche Oligosaccharide von Glykoproteinen, die während ihrer Reifungsphase und dem Transportweg vom ER über die Cis-Golgi Kompartimente an das Protein angehängt wurden. Erreicht ein Protein das Cis-Golgi, wurden die Zuckerreste so verändert, dass Endo H diese nicht mehr deglykosylieren kann. Ein Endo H Verdau ermöglicht Schlussfolgerungen über den Reifungszustand und die ungefähre Lokalisation von Proteinen.

Nach der Endo H Behandlung wurde ein gleichermaßen komplett verändertes Laufverhalten für Tpn und NeTT von ca. 3 kDa beobachtet (Spur 2 und 4), was bedeutet, dass Tpn und NeTT vollständig deglykosyliert wurden. Der vollständige Endo H Verdau belegt, dass NeTT ein glykosyliertes Protein und nur Endo H sensitive Glykane besitzt. Außerdem zeigte dieser Befund, dass NeTT wie Tpn hauptsächlich im ER lokalisiert ist und den Golgi-Apparat nicht erreicht.

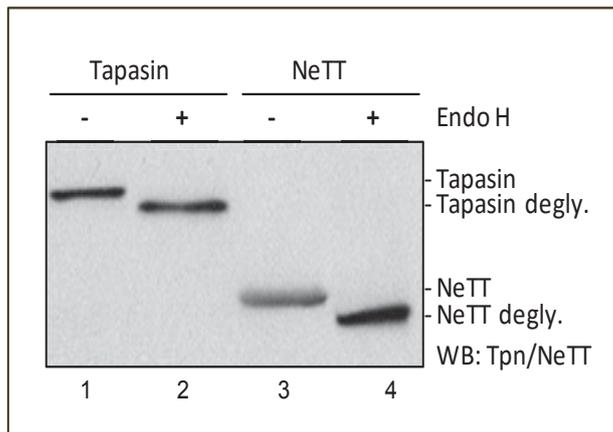


Abb. 18: NeTT ist vollständig Endo H sensitiv.

24 Std. nach transienter Transfektion von HeLa-Zellen mit Tpn und NeTT in pcDNA3.1 wurden Zelllysate generiert und mit (+) oder ohne (-) Endo H inkubiert. Die Auftrennung und Detektion erfolgte im WB mit dem anti-Tpn/NeTT AK.

Zur Bestätigung der Daten aus Abb. 18 wurde die zelluläre Lokalisation von NeTT mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Tpn und NeTT (grün markiert) umrahmten in einem retikulären Muster ER-typisch den Nukleus (Abb. 19). Ein spezieller Cis-Golgi Marker (GM130; Nakamura et al., 1995) stellte den Golgi-Apparat rot dar. Das Übereinanderlegen der beiden Färbungen (NeTT und Cis-Golgi) zeigte keine Übereinstimmung, was wie erwartet darauf hinweist, dass NeTT diese Golgi-Kompartimente nicht erreicht. Allerdings muss bei der Auswertung der Lokalisationsanalyse berücksichtigt werden, dass CMT64.5 Zellen TAP-defizient sind (Franks et al., 1976) und dieser Defekt einen Einfluss auf die Lokalisation haben könnte.

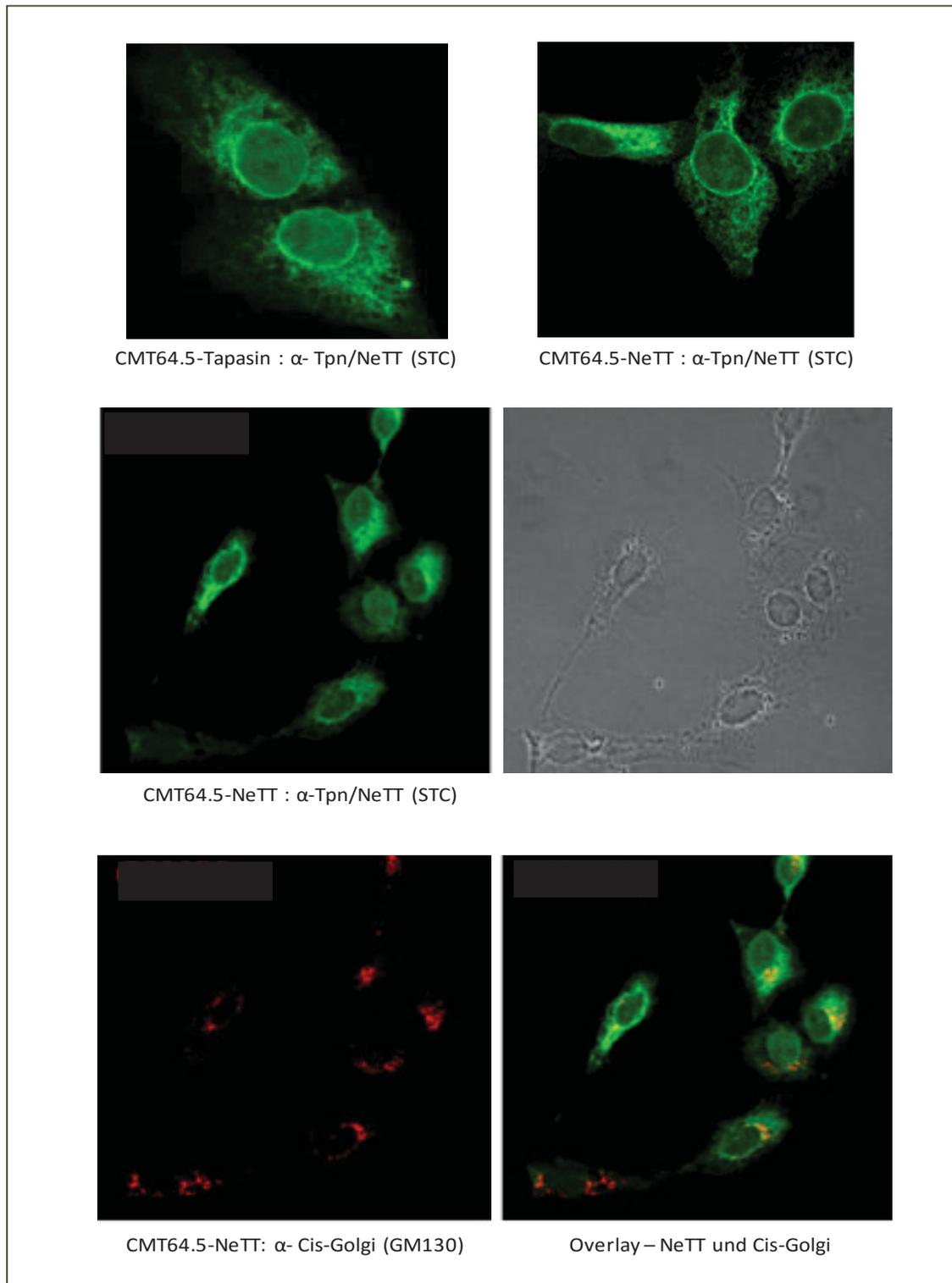


Abb. 19: NeTT zeigt ein ER-ähnliches retikuläres Muster.

TAP-defiziente CMT64.5 Zellen wurden mit einem Tpn oder NeTT exprimierenden lentiviralen Vektor transduziert. Die Färbung von Tpn und NeTT erfolgte mit α -Tpn/NeTT AK (STC, grün). Der Cis-Golgi-Apparat wurde mit GM130 gefärbt (rot, unten rechts). Unten links ist die Übereinanderlegung (Overlay) der NeTT und Cis-Golgi Färbung dargestellt.

Der Verlust von Exon 3, d.h. von Cys95, sowie die fehlende Disulfidbrücke zwischen Cys7-Cys71 scheinen die Proteinstabilität, N-Glykosylierung und die Lokalisation von NeTT nicht zu beeinflussen. Abb. 20 fasst in einer linearen Proteindarstellung die strukturellen Charakteristika von Tpn und NeTT zusammen. Durch die fehlenden 87 AS (Exon 3) im NeTT Protein verschieben sich die dahinter liegenden Interaktionsstellen um 87 AS, d.h. die vermutete Glykosylierungsseite ist für NeTT an Position 146, während diese bei Tpn an Position 233 liegt. Die Signalsequenz, der N'-Terminus und der TM Anteil sowie der C'-Terminus der beiden Proteine sind identisch, weshalb eine Erkennung von AK, die gegen diese Region gerichtet sind, möglich ist.

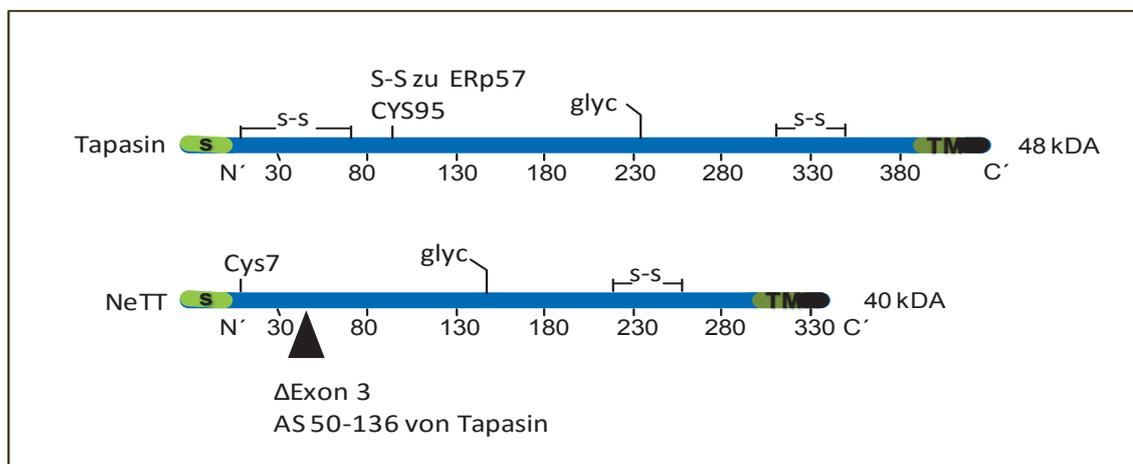


Abb. 20: Schematische Gegenüberstellung von Tapasin und NeTT.

Schematische Gegenüberstellung der strukturbestimmenden Charakteristika von Tpn und NeTT auf Proteinebene. ‚S-S‘ markieren die intramolekularen Disulfidbrücken. Das Fehlen von Exon 3 ist als schwarzes Dreieck dargestellt. Die Glykosylierungsstelle (glyc) für NeTT ist an Position 146, für Tpn an Position 233. Zusätzlich dargestellt: Signalsequenz (S, grün), N'-Terminus (N'), TM Anteil (TM, grün) und C'-Terminus (C').

Die lineare Darstellung zeigt das Ausmaß des Verlustes von Exon 3 allerdings weniger deutlich als die Kristallstruktur von Tpn (Abb. 6). Im NeTT Protein fehlt ein großer Anteil der N'-terminalen Domäne (grüne Struktur), der den kurzen Part von Tpn L-förmiger Struktur bildet. Diese zum Teil fehlende Domäne könnte zusätzlich zu dem Verlust von Cys95 weitere Einflüsse auf die Funktionalität und Stabilität von NeTT haben. Der C'-Terminus und die Ig-like Domäne hingegen (gelb und blaue Struktur), die den langen Teil der L-Struktur formen, bleiben durch den Verlust von Exon 3 unberührt.

5.2.3 Halbwertszeitbestimmung und Degradation

Tpn ist ein langlebiges Protein mit einer beschriebenen Halbwertszeit von ungefähr einem Tag (Bangia und Cresswell 2005). Dick und Kollegen haben Halbwertszeitanalysen von Tpn-Mutanten, bei denen einzelne Cys (Cys7, Cys71 oder Cys95) deletiert wurden, durchgeführt (Dick et al., 2002). Diese zeigten wie wichtig die räumliche Struktur der Ektodomäne für die Langlebigkeit des Proteins ist. Cys7 und Cys71 Mutanten wiesen infolge der Deletion eine verkürzte Halbwertszeit von 8 Std. auf, wt-Tpn hatte mit 20 Std. eine deutlich längere Halbwertszeit. Demgegenüber war die Halbwertszeit der Cys95-Mutante nicht verändert. Da NeTT sowohl Cys71 als auch Cys95 fehlt, sollte näher untersucht werden, inwieweit dies die Stabilität von NeTT und dessen Halbwertszeit beeinflusst.

Um die Halbwertszeit für NeTT zu bestimmen, wurde ein *pulse-chase* Experiment durchgeführt. HeLa-Zellen, die stabil mit einem NeTT exprimierenden Vektor transduziert waren (HeLa-NeTT_{ind}), wurden für 30 Min. in radioaktiven Medium inkubiert (*pulse*), d.h. alle während des *pulse* neusynthetisierten Proteine wurden durch den Einbau von [³⁵S]-Met/Cys radioaktiv markiert. Anschließend wurde das radioaktive Medium gegen normales Medium ausgetauscht und die Zellen wurden in diesem bis zu 4 Std. inkubiert (*chase*). Alle Proteine, die in diesem *chase*-Zeitraum neusynthetisiert wurden, wurden nicht mehr radioaktiv markiert (Abb. 21 A). Für die Halbwertszeitbestimmung von Tpn wurden nicht transfizierte HeLa-Zellen verwendet. Der endogene Tpn-Promotor ist vergleichsweise schwächer, weshalb die HeLa-Zellen für ein ausreichendes Tpn Signal für 2 Std. metabolisch markiert wurden (*pulse*). Desweiteren wurde wegen der anzunehmenden Langlebigkeit von Tpn ein längerer *chase*-Zeitraum (von 24 Std.) gewählt (Abb. 21 B).

Die Halbwertszeit von NeTT betrug etwas über 2 Std. (A, Bandenintensität nach 2 Std. nur noch 50%), während die Menge von Tpn erst nach 24 Std. um die Hälfte reduziert war (B). Dieses Ergebnis zeigt, dass Tpn und NeTT sich hinsichtlich ihrer Stabilität deutlich unterscheiden.

In einem weiteren Experiment sollte geprüft werden, ob die gleichzeitige Expression von NeTT und Tpn einen zusätzlichen Einfluss auf die Stabilität der Proteine haben

könnte. Ohne Doxy-Induktion ist der verwendete Promotor (HeLa-NeTT_{ind}) für die NeTT Expression nur schwach aktiv, daher konnte mit diesem Expressionssystem Tpn und

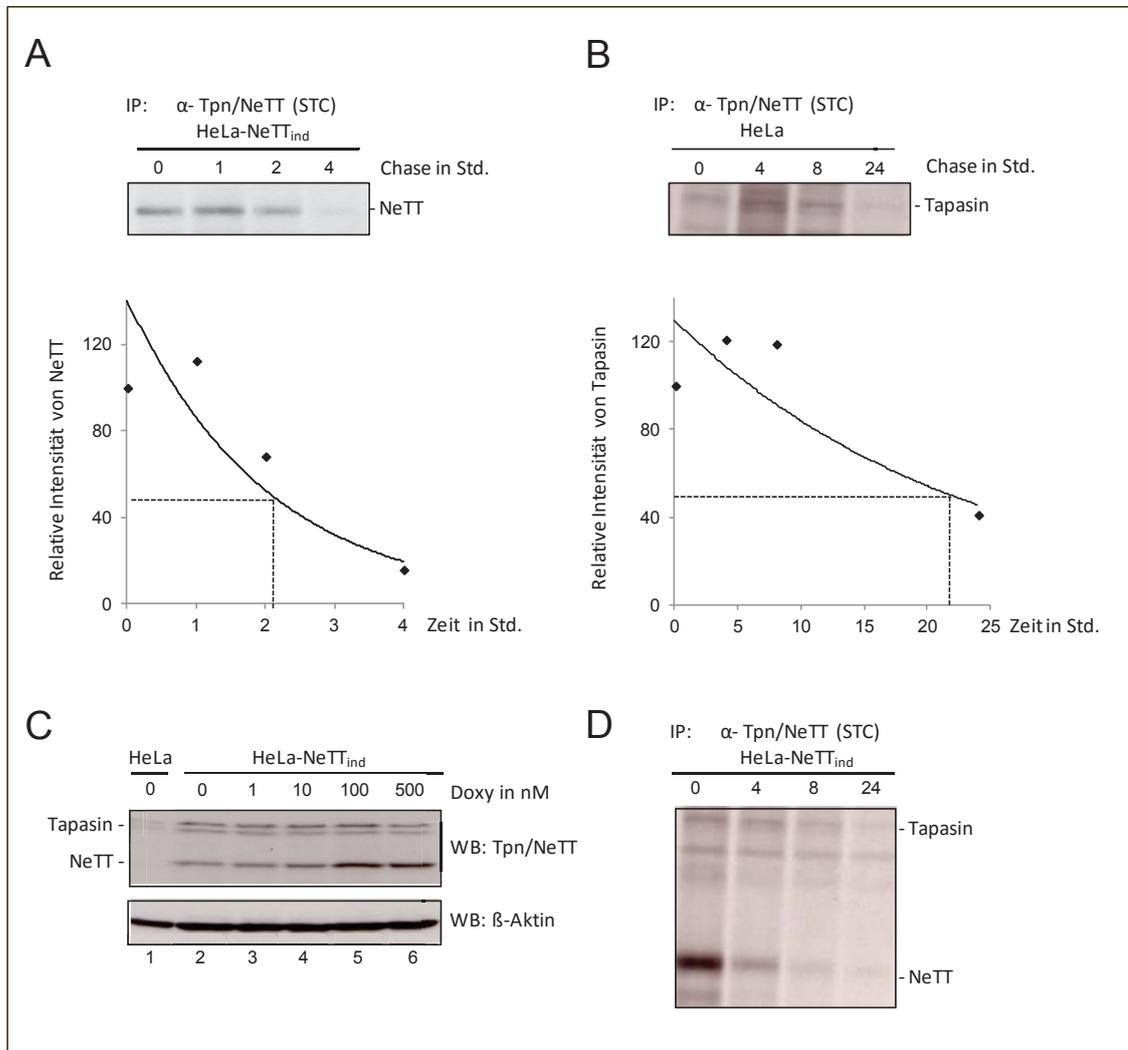


Abb. 21: Die Halbwertszeit von NeTT beträgt ungefähr 2 Stunden.

Pulse-chase Experiment zur Halbwertszeitbestimmung. A. HeLa-NeTT_{ind}-Zellen wurden 24 Std. nach Doxy-Induktion 30 Min. mit [³⁵S]-Met/Cys metabolisch markiert. Vor Lyse in 1% NP40 IP-Lysispuffer wurden die Zellen für 0, 1, 2 und 4 Std. in DMEM weiter inkubiert, ehe eine IP mit anti-Tpn/NeTT AK erfolgte. Darstellung der quantifizierten Präzipitationsstärken relativ zum ZP 0. B. HeLa-Zellen wurden 2 Std. mit [³⁵S]-Met/Cys metabolisch markiert und für 0, 4, 8 und 24 Std. in DMEM inkubiert. Weiteres Vorgehen wie in A. C. HeLa-NeTT_{ind}-Zellen, entweder unbehandelt (0), oder für zwei Tage in unterschiedlichen Konzentrationen mit Doxy stimuliert. WB-Detektion mit anti-Tpn/NeTT AK. D. HeLa-NeTT_{ind}-Zellen wurden wie in B behandelt und präzipitiert. Gezeigt ist eins (A, B und D) von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

NeTT in ähnlicher Stärke exprimiert (C, Spur 2) und für die Halbwertszeitanalyse genutzt werden. Die gleichzeitige Expression von Tpn und NeTT zeigte aber keinen eindeutigen Hinweis darauf, dass eine gegenseitige Beeinflussung der Halbwertszeiten stattfindet (D).

Vor dem Hintergrund der Daten von Dick und Cresswell ist die Halbwertszeit von NeTT mit ca. 2 Std. unerwartet kürzer als die 8 Std. von der Cys71-Punkt Mutante (Dick et al., 2002). Zur Stabilität des Tpn Proteins tragen anscheinend die intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cys7-Cys71 und die intermolekulare Stabilisierungsmöglichkeit über Cys95 gemeinsam bei. Möglicherweise wird die Halbwertszeit von NeTT anders kontrolliert als die von Tpn. Um die Degradationswege näher einzugrenzen, wurden stabil transduzierte HeLa-NeTT Zellen metabolisch markiert (*pulse*) und anschließend für 2,5 Std. mit unterschiedlichen Protease-Inhibitoren behandelt (*chase*) (Abb. 22). Die Protease-Inhibitoren waren im Lösungsmittel DMSO gelöst, welches bei RT zelltoxisch wirkt. Daher wurden die Kontrollzellen mit reinem DMSO behandelt. Die Protease-Inhibitoren haben unterschiedliche Wirkmechanismen, MG132 unterbindet den Abbau über das Ubiquitin-Proteasomen-System. Monensin (GolgiStop™) und Brefeldin A (BFA) hingegen verhindern den Transport aus dem ER in Richtung Golgi-Apparat, haben aber einen unterschiedlichen Wirkmechanismus. BFA wird aus dem Pilz *Penicillium brefeldianum* isoliert und verhindert durch eine Interaktion mit den Guaninnukleotid-Austauschfaktoren die Aktivierung der ADP-Ribosylierungsfaktoren. Infolgedessen werden viele funktionelle Abläufe des Golgi-Apparates gestört. Es hemmt die Generierung der COP I Vesikel, wodurch der antero- und retrograde Transport zwischen ER und Golgi-Apparat verhindert wird (Fujiwara et al., 1988; Donaldson et al., 1992; Pavelka und Roth 2005). GolgiStop™ enthält Monensin, ein Polyen-Makrolidantibiotikum, welches aus dem Pilz *Streptomyces cinnamonis* gewonnen wird. Es agiert als Natrium-Wasserstoff Antiporter und verhindert den Proteintransport durch die Zelle (Butaye et al., 2003).

Die Behandlung mit dem Proteasomen-Inhibitor MG132 führte zur Akkumulation von NeTT. Das IP-Signal war im Vergleich zu dem der DMSO-Ktrl. stark angestiegen (Abb. 22 A, Spur 2/ 5; B MG132). Für Tpn konnte durch MG132 keine Akkumulation, sondern eher eine Reduktion gemessen werden. Allerdings ist durch die längere Halbwertszeit

von Tpn die Beurteilung der Abbau-Inhibition bei diesem kurzen Inkubationszeitraum von 2,5 Std. nur ungenügend möglich. Interessant waren trotzdem die unterschiedlichen Präzipitationsmengen von Tpn und NeTT nach Behandlung mit BFA. Es konnte mehr Tpn präzipitiert werden, während NeTT überhaupt nicht mehr detektierbar war (A, Spur 3). Zusätzlich fiel eine deutliche Ko-IP von einem Protein auf Höhe von 57 kDa auf (A, Spur 3), bei dem es sich um ERp57 handeln könnte.

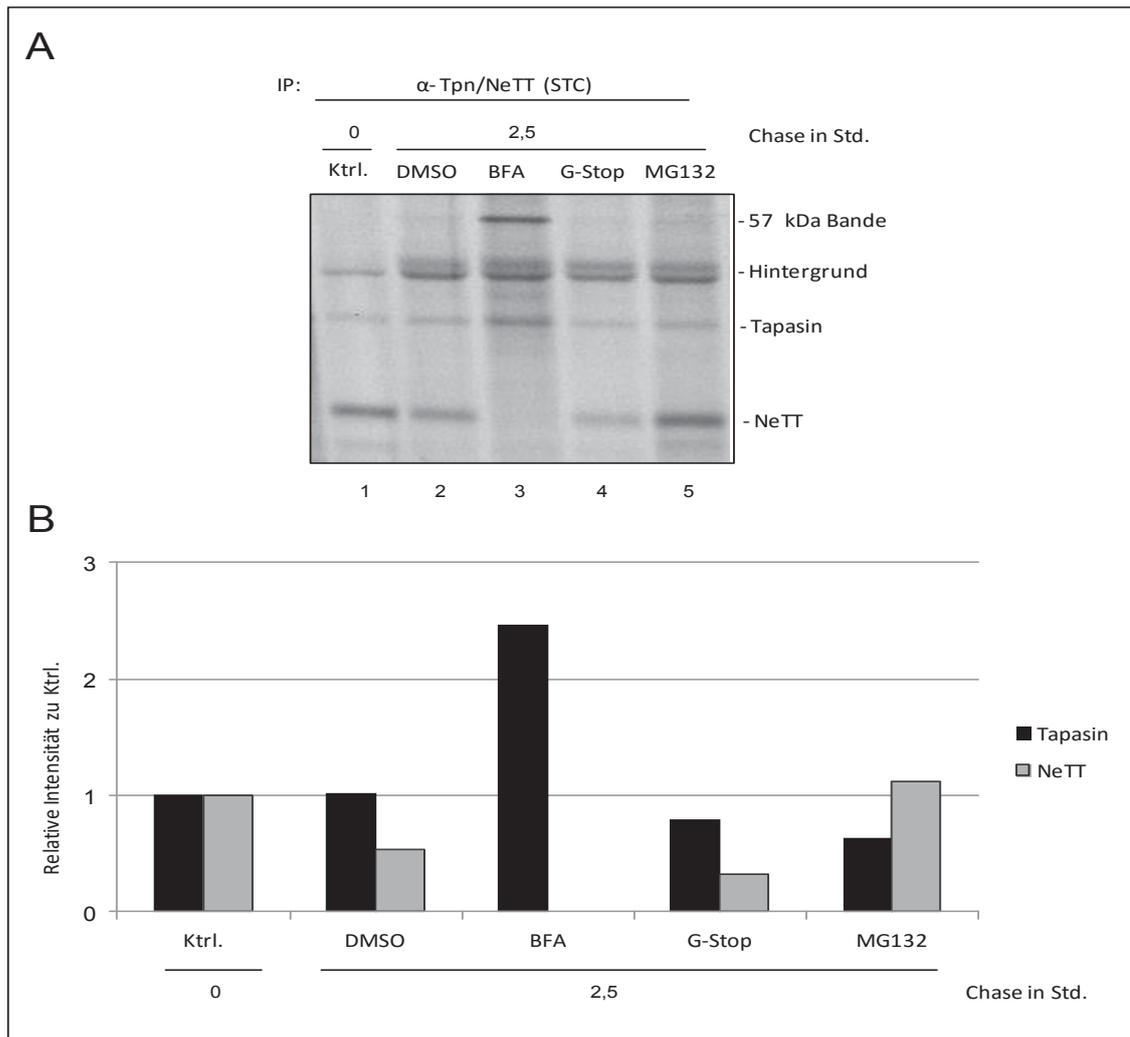


Abb. 22: Proteasomale Inhibition führt zur Akkumulation von NeTT.

Pulse-chase Experiment mit proteasomalen Abbauinhibitoren. A. Stabil transfizierte HeLa-NeTT Zellen wurden für 30 Min. [35 S]-Met/Cys metabolisch markiert (*pulse*) und 2,5 Std. mit den angegebenen Inhibitoren in DMEM inkubiert (*chase*). Die Ktrl.-behandelten Zellen wurden gleich nach der metabolischen Markierung lysiert. Die IP erfolgte mit anti-Tpn/NeTT AK. B. Quantitative Analyse der isolierten Tpn und NeTT Banden in Relation zur Präzipitationsstärke der Ktrl.-behandelten Probe. Gezeigt ist eins von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

Die ungleichen Mengen an Tpn und NeTT in den Ktrl.-behandelten Zellen sind am ehesten Folge der unterschiedlichen Promotoraktivitäten (Tpn: endogener Promotor; NeTT: Promotor pUC2-CL6-IRES-Puro Vektor, A, Spur 1).

Die unerwartete Beobachtung, dass NeTT unter BFA Behandlung kaum detektierbar war, sollte näher untersucht werden. HeLa-NeTT Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume mit BFA behandelt und im WB mit anti-Tpn/NeTT AK (STC) analysiert (Abb. 23). In unbehandelten Zellen wurden Tpn und NeTT in ähnlichen Mengen exprimiert (Spur1). Bereits nach 50 Min. BFA Behandlung konnte NeTT nicht mehr detektiert werden, während das Niveau von Tpn unverändert blieb (Spur 2). BFA scheint den Abbau von NeTT, aber nicht den von Tpn, stark zu beschleunigen. Neben einer Hintergrundbande, knapp unterhalb der Größe von NeTT, konnte zu späteren ZP eine zusätzliche Bande (*), an Größe zunehmend, detektiert werden. Ubiquitin hat eine Größe von 8 kDa, während sich die Bande in kleineren Intervallen (ca. 3 kDa) veränderte. Dies könnte darauf hinweisen, dass NeTT bei der Degradation eine divergente Modifikation erfährt, die jedoch nicht weiter untersucht werden konnte.

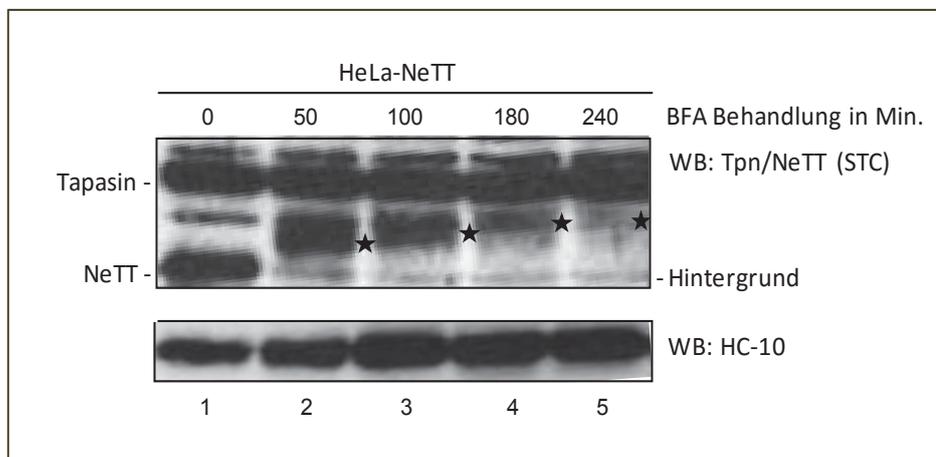


Abb. 23: BFA fördert die Degradation von NeTT.

Stabil transfizierte HeLa-NeTT Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit BFA (20 $\mu\text{g/ml}$) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, im WB aufgetrennt und mit anti-Tpn/NeTT (STC) und HC-10 AK detektiert. Gezeigt ist ein einmalig durchgeführtes Experiment.

Zusammenfassung:

- NeTT kann als ein 40 kDa großes Protein detektiert werden.
 - NeTT ist vollständig Endo H Sensitivität und seine ER-ähnliche Lokalisation zeigt an, dass das Golgi Kompartiment nicht erreicht wird.
 - Die Halbwertszeit von NeTT beträgt ungefähr 2 Std.
 - Brefeldin A beschleunigt den Abbau von NeTT.
 - Tpn und NeTT werden durch unterschiedliche Mechanismen im ER reguliert.
-

5.3 NeTT kann die MHC I Oberflächenexpression nicht unterstützen

Die zentrale Frage dieser Arbeit sollte klären, ob NeTT einen negativen Einfluss auf den PLC hat und die Oberflächenexpression der MHC I Moleküle inhibieren kann. Daher wurden Tpn-defiziente B-LCL-B721.220 Zellen, die das Tpn-abhängige MHC I Allel HLA-B*44:02 exprimierten (.220-B*44:02), zusätzlich mit einem Tpn oder NeTT exprimierenden lentiviralen Vektor transduziert. Die HLA-B*44:02 Oberflächenexpression wurde im FACS mit dem TT4-A20 AK gemessen.

Wie die Daten in Abb. 24 A zeigen, stellte Tpn nach Transfektion die Oberflächenexpression des Tpn-abhängigen HLA-B*44:02 in .220 Zellen wieder her. Abb. 24 B zeigt hingegen, dass die HLA-B*44:02 Oberflächenexpression in NeTT exprimierenden Zellen so niedrig war wie die in Tpn-defizienten (Ktrl.) Zellen. Durch die bicistronische EGFP Expression konnte sichergestellt werden, dass nur die HLA-44:02 Oberflächenexpression von EGFP und damit NeTT positiven Zellen gewertet wurde. Dieses Ergebnis bestätigt, dass Exon 3 für die Unterstützung der HLA-B*44:02 Oberflächenexpression benötigt wird. Interessanterweise beschrieben Studien von Dick und Kollegen ebenfalls, dass eine Tpn Cys95-Punktmutante die Oberflächenexpression von HLA-B*44:02 schwächer unterstützte als wt-Tpn (Dick et al., 2002), jedoch war die Reduktion nicht annähernd so stark wie die von NeTT. Daher ist zu vermuten, dass neben der Interaktion zu ERp57 noch weitere Domänen von Tpn für die MHC I Stabilisierung und Beladung wichtig sind.

Neben dem transduzierten HLA-B*44:02 Allel exprimieren .220 Zellen auch HLA-C Moleküle, die mittels der W6/32-Färbung erfasst werden konnten. Die Messung aller MHC I Moleküle auf der Zelloberfläche ergab ebenfalls einen deutlichen Unterschied zwischen Tpn und NeTT exprimierenden Zellen (Abb. 24 B). Im Vergleich erreichte die MHC I Oberflächenexpression der NeTT exprimierenden Zellen nur 15% von der aus Tpn exprimierenden Zellen.

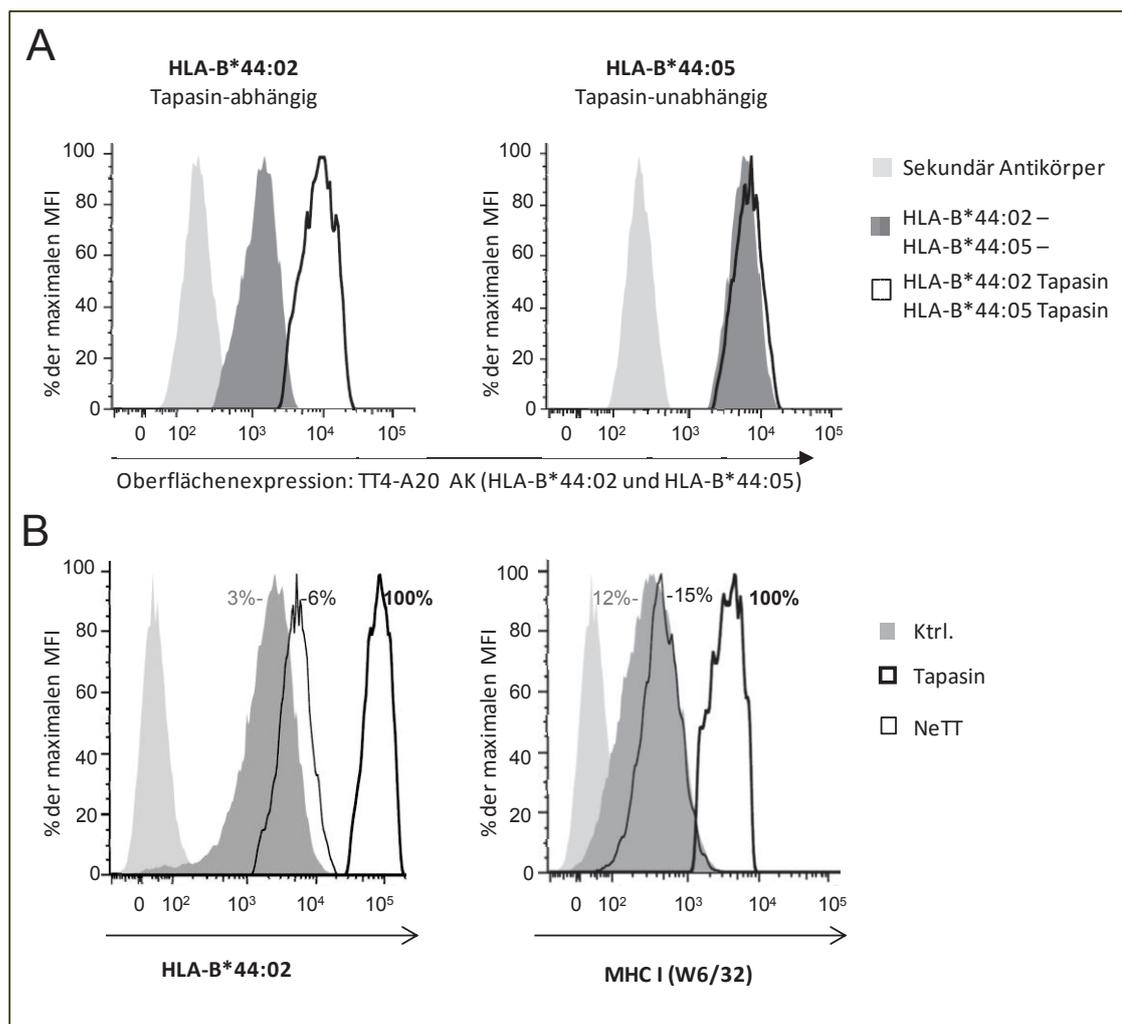


Abb. 24: NeTT unterstützt nicht die Oberflächenexpression von HLA-B*44:02.

FACS-Analysen von HLA-B*44:02 und HLA-B*44:05 sowie der gesamt MHC I Menge in .220-HLA-B*44:02/ -B*44:05, in transduzierten .220-HLA-B*44:02-Tpn-EGFP/ -NeTT-EGFP, sowie in .220-HLA-B*44:05-Tpn-EGFP/ -NeTT-EGFP A. Messung der HLA-B*44:02 und HLA-B*44:05 Oberflächenexpression ohne Tpn (dunkelgrauer Gipfel) und mit Tpn (schwarz umrandeter Gipfel). Der hellgraue Gipfel diente als Ktrl. für den sekundären AK. B. Links: Messung der HLA-B*44:02 Oberflächenexpression EGFP positiver Zellen mit dem TT4-A20 AK bei Ktrl.

(ausgefüllter mittelgrauer Gipfel), NeTT (dünn umrandeter schwarzer Gipfel) und Tpn Expression (dick umrandeter schwarzer Gipfel). Rechts: Messung der gesamt MHC I Oberflächenexpression mit dem W6/32 AK. Gezeigt ist eins von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

Eine MHC I Lokalisationsanalyse im konfokalen Fluoreszenzmikroskop konnte das FACS Ergebnis bestätigen (Abb. 25). Tpn und NeTT transduzierte .220-HLA-B*4402 Zellen wurden mit anti-Tpn/NeTT (grün) und zur Markierung der HLA-B*44:02 sowie der endogenen HLA-C Moleküle mit anti-HC-10 (rot) gefärbt. Die MHC I Moleküle (hauptsächlich HLA-B*44:02) stellten sich in Tpn exprimierenden Zellen als roter Oberflächenrandsaum dar, während die HLA-B*44:02 Moleküle in NeTT exprimierenden Zellen eine ER-typische Lokalisation aufwiesen (Overlay, gelb), was auf eine fehlende Peptidbeladung und Stabilisierung und daher Retention im ER Kompartiment hinweist. In einer nicht mit NeTT transduzierte .220-HLA-B*44:02 Zelle (*) konnte keine Oberflächenexpression nachgewiesen werden.

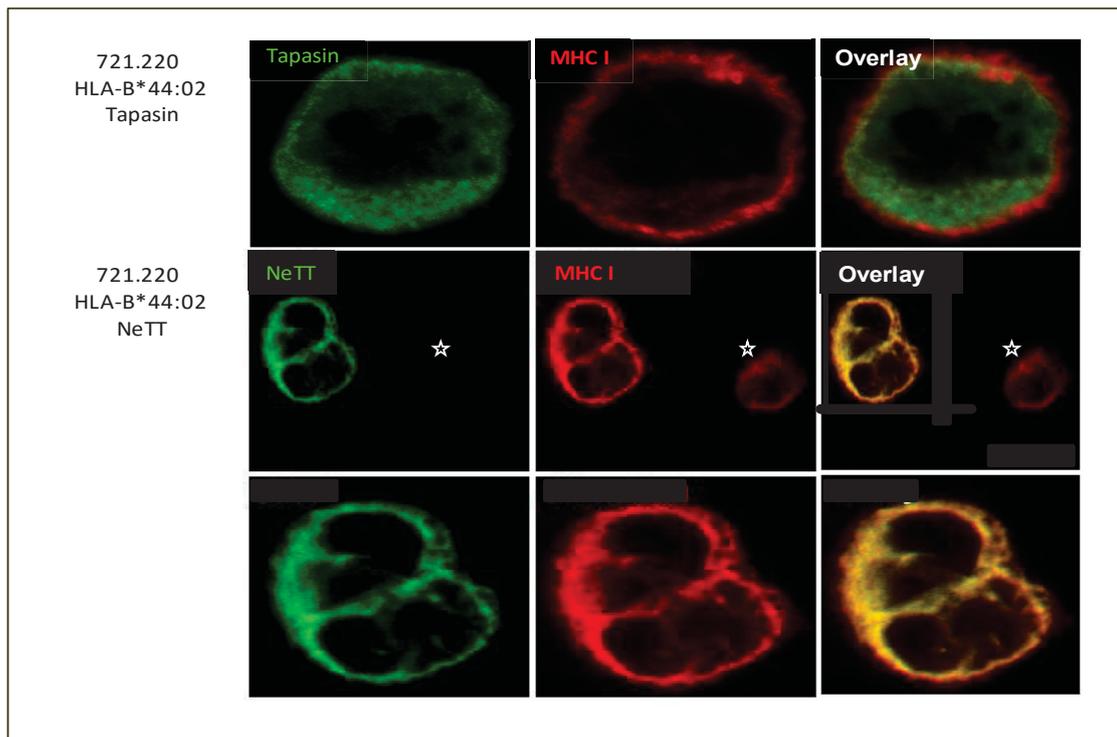


Abb. 25: Retention der HLA-B*44:02 Moleküle bei NeTT Expression im ER.

Fluoreszenzanalyse der MHC I/HLA-B*44:02 Moleküle (Zellen aus Abb. 24). Färbung der MHC I Moleküle (HLA-B*44:02) erfolgte mit HC-10 (rot) und für Tpn und NeTT mit anti-Tpn/NeTT (N-17; grün). Der * markiert eine nicht mit NeTT transfizierte .220-HLA-B*44:02 Zelle.

Zusammenfassung:

- NeTT unterstützt nicht die Oberflächenexpression des Tpn-abhängigen MHC I Allels (HLA-B*44:02) in Tpn-defizienten Zellen.
- Für Tpn-abhängige MHC I Moleküle (HLA-B*44:02) wird bei NeTT Expression eine ER-typische Lokalisation beobachtet.

5.4 Interaktionen zwischen NeTT und dem PLC

5.4.1 NeTT stabilisiert TAP, aber nicht die MHC I Expression

NeTT fördert nicht wie Tpn die Oberflächenexpression der Tpn-abhängigen HLA-B*44:02 Moleküle. Kann NeTT überhaupt mit den einzelnen PLC Komponenten interagieren? Die Interaktionen von NeTT mit TAP1 und MHC I Molekülen wurden zunächst in Abwesenheit von Tpn analysiert. Dafür wurden .220-HLA-B*44:02 Zellen, die stabil Tpn oder NeTT exprimierten, durch Ko-IP-Experimente mit anti-Tpn/NeTT und anti-TAP1 AK untersucht (Abb. 26).

Es konnte nicht nur eine ähnlich starke Ko-IP von TAP1 durch Tpn und NeTT beobachtet werden (A, Spur 2-3), sondern auch durch anti-TAP1 konnten Tpn und NeTT ko-präzipitiert werden (A, Spur 5-6). Dieses Ko-IP Ergebnis war zu erwarten, da die TMD, die mit TAP interagiert, sowohl in Tpn als auch in NeTT kodiert wird (Sadasivan et al., 1996). Das gewählte Expressionssystem ermöglichte desweiteren zu zeigen, dass NeTT unabhängig von Tpn mit TAP1 interagieren konnte (A, Spur 3 und 6). Zusätzlich weist die TAP1 Detektion in der Expressionskontrolle (Expres.Ktrl.) darauf hin, dass die Expression von NeTT positiv mit der TAP1 Stabilität korreliert (A, Spur 7 und 9).

Dem gegenüber steht das divergente Interaktionsverhalten von NeTT mit den MHC I Molekülen. NeTT konnte im Vergleich zu den Tpn exprimierenden Zellen einen Großteil der MHC I Moleküle nicht stabilisieren (Spur 9/9a). Die Detektionsstärke entsprach der der Ktrl.-Zellen (Spur 7/7a). Trotzdem konnte reproduzierbar eine schwache aber erkennbare MHC I Ko-IP mit NeTT beobachtet werden (Spur 3/3a). NeTT muss demzufolge, trotz des Fehlens von Exon 3, intakte Interaktionsdomänen für MHC I besitzen. In diesem Experiment konnte allerdings nicht zwischen den endogenen HLA-C Allelen oder den stabil transfizierten HLA-B*44:02 Allelen unterschieden werden, da der verwendete anti-MHC I-HC AK sowohl HLA-B als auch HLA-C Allele binden kann.

Über TAP1 konnten keine MHC I Moleküle aus NeTT exprimierenden Zellen ko-präzipitiert werden (A, Spur 6), zumindest war die Detektion im WB nicht sensitiv genug. Möglich wäre also, dass NeTT mit den MHC I Molekülen interagiert, aber nicht die nötigen editierenden (Cys95-abhängigen) Funktionen besitzt, um die MHC I Moleküle mit affinen Peptiden zu beladen und zu stabilisieren.

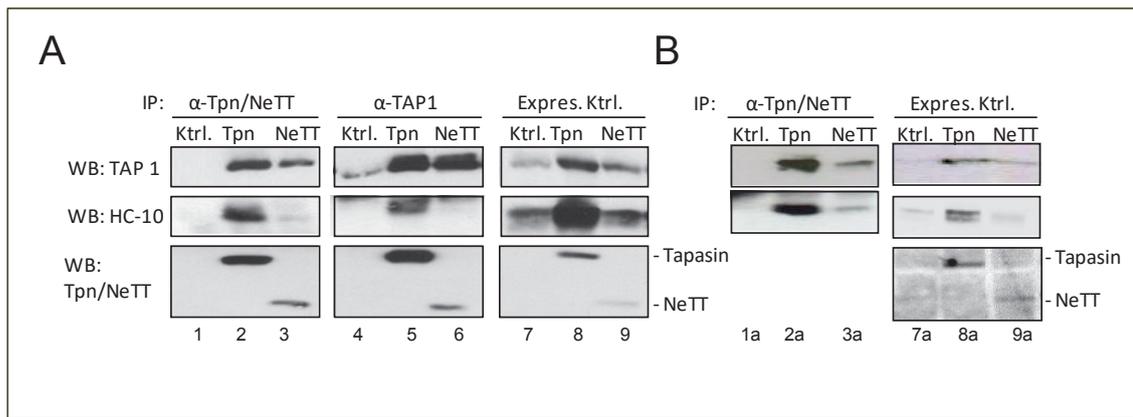


Abb. 26: NeTT stabilisiert TAP1, aber nicht die MHC I Expression.

A. .220-HLA-B*44:02-Ktrl, .220-HLA-B*44:02-Tpn und .220-HLA-B*44:02-NeTT Zellen wurden in Digitonin lysiert und mit dem anti-Tpn/NeTT (STC) und anti-TAP1 AK präzipitiert. Die Detektion im WB erfolgte mit anti-TAP1, HC-10 (MHC I HC) und anti-Tpn/NeTT AK (C'-Terminus). B. Gezeigt ist ein Ausschnitt einer von Experiment A unabhängig durchgeführten Reproduktion.

Zusammenfassung:

- NeTT stabilisiert den TAP1/2 Komplex.
- NeTT interagiert nicht bzw. nur schwach mit den MHC I Molekülen.
- Durch NeTT werden die MHC I Moleküle nicht, wie es für Tpn zu beobachten ist, stabilisiert.

5.4.2 NeTT interagiert schwach mit ERp57 und Calreticulin

Um die Interaktionen von NeTT mit den PLC Komponenten auch in Anwesenheit von Tpn zu untersuchen, wurden stabil transfizierte HeLa-Tpn und HeLa-NeTT Zellen durch Re-IP Analysen untersucht. In einer ersten IP wurden die Bestandteile des PLC direkt präzipitiert, anschließend bei 65°C in 1% SDS dissoziiert, um dann mit dem anti-Tpn/NeTT AK (STC) die in der initialen IP ko-präzipitierten Moleküle nochmals zu identifizieren (Abb. 27).

Durch die Überexpression von Tpn in HeLa-Tpn Zellen wurde Tpn verstärkt durch anti-ERp57 ko-präzipitiert (A, Spur 5). Nach einer langen Filmexpositionszeit von mehreren

Tagen konnte NeTT überraschenderweise ebenfalls durch eine ERp57 Ko-IP sehr schwach detektiert werden (B, Spur 6). Die NeTT IP war schwächer als die IP von endogenem Tpn in den HeLa-NeTT Zellen (B, Spur 6). Bisher wurde davon ausgegangen, dass NeTT ohne Cys95 überhaupt nicht mit ERp57 interagiert. Es stellt sich demnach die Frage, ob eine residuelle Affinität zwischen NeTT und ERp57 existiert, die Cys95 unabhängig ist und die dann ebenfalls auch für die TPN-ERp57 Wechselwirkung wirksam ist oder ob NeTT durch eine indirekte Bindung ko-präzipitiert wurde.

Ein ähnliches Ko-IP Muster zeigte sich für NeTT durch anti-CRT. Auch hier konnte NeTT detektiert werden, wieder um ein Vielfaches schwächer als die ko-präzipitierte endogene Tpn Menge (A-B, Spur 12).

Übereinstimmend mit der Interaktionsanalyse in Tpn-defizienten Zellen (Abb. 26) konnte auch in HeLa-Zellen eine Interaktion zwischen NeTT und TAP nachgewiesen werden (Abb. 27 A, Spur 8-9). Sie scheint mindestens so stabil zu sein, wie die zwischen Tpn und TAP. Erstaunlicherweise wurden bei einer längeren Filmexposition der Re-IP in den HeLa-NeTT Zellen Proteine sichtbar (70 und 72 kDa), die der Größe von TAP1 und TAP2 entsprachen (D, Spur 3.). Diese zwei Banden konnten nicht in HeLa-Tpn Zellen detektiert werden, was bedeuten könnte, dass sich Tpn und NeTT in ihrer Interaktionsweise mit dem TAP-Komplex unterscheiden.

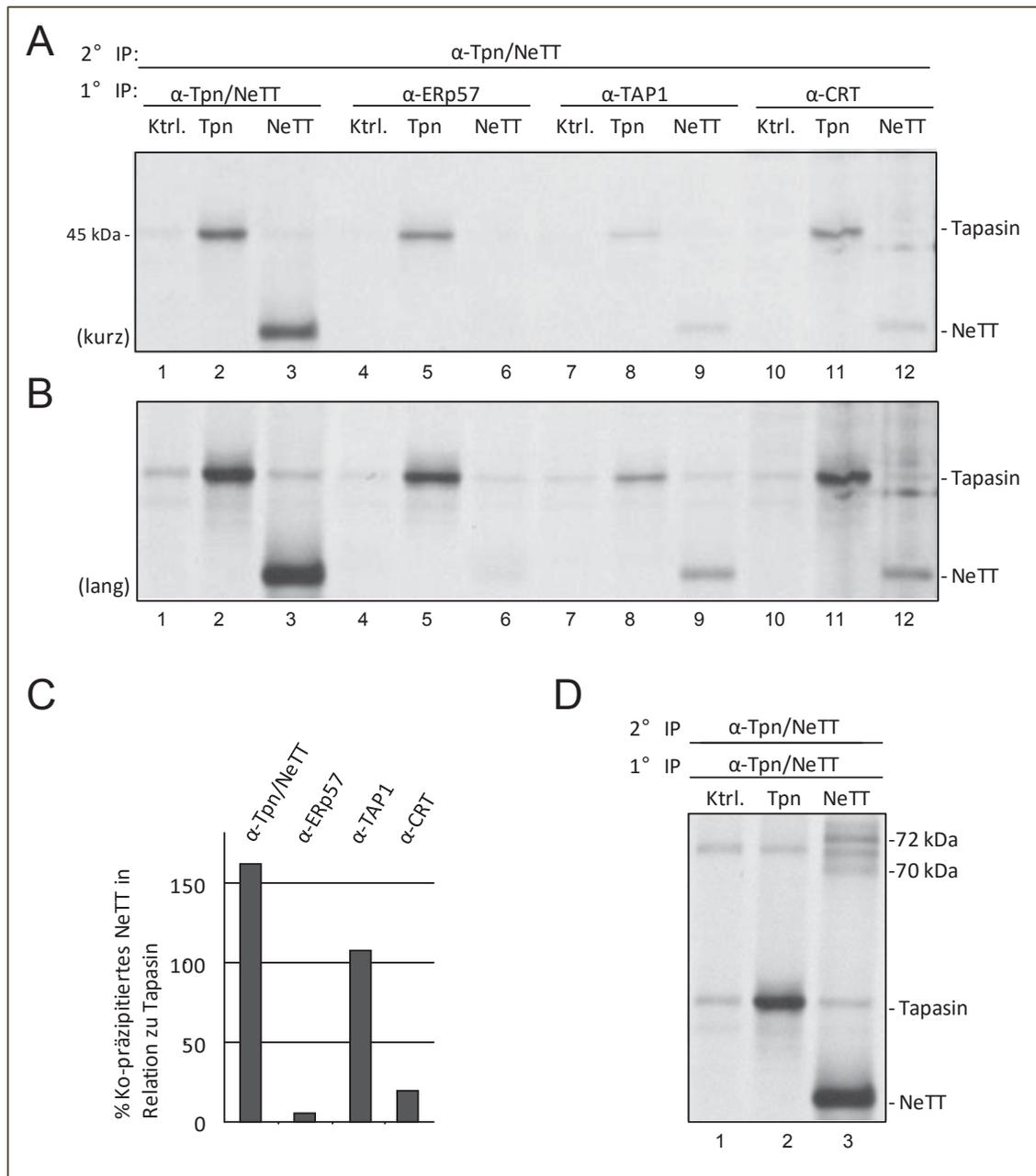


Abb. 27: Ko-IP von NeTT nach IP von ERp57, TAP und CRT.

A. Stabil transfizierte HeLa-Ktrl., -Tpn und -NeTT Zellen wurden 4 Std. mit [³⁵S]-Met/Cys metabolisch markiert und in Digitonin lysiert. Die erste IP erfolgte mit anti-Tpn/NeTT (STC), anti-ERp57, anti-TAP1 und anti-CRT (1° IP). In der nachfolgende IP (2° IP) der bereits präzipitierten Immunkomplexen wurde zur Lyse NP40 Lysispuffer und zur Präzipitation abermals der anti-Tpn/NeTT AK (STC) verwendet. Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie. B. Längere Filmexpositionszeit der Re-IP aus A. C. Quantifizierung der Ko-Präzipitationsintensitäten von Tpn und NeTT. D. Ausschnitt der Re-IP aus B. Gezeigt ist eins von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

5.4.3 NeTT bindet stärker an TAP als Tapasin

Zur Überprüfung der Hypothese eines unterschiedlichen Bindungsverhaltens von Tpn und NeTT mit TAP wurde in einem weiteren Experiment die endogene TAP und Tpn Expression verstärkt. Stabil transfizierte HeLa-Tpn und HeLa-NeTT Zellen wurden für 24 Std. mit IFN γ stimuliert. Anschließend erfolgte eine IP mit dem anti-Tpn/NeTT AK. Unabhängig von der IFN γ -Stimulation und bei vergleichbarer TAP1 Proteinmenge konnte NeTT TAP1 stärker ko-präzipitieren als Tpn (Abb. 28). NeTT schien sogar eine stärkere Bindung an TAP1 zu haben als Tpn (vgl. Spur 2-3 TAP1 Ko-IP mit Expres. Ktrl.).

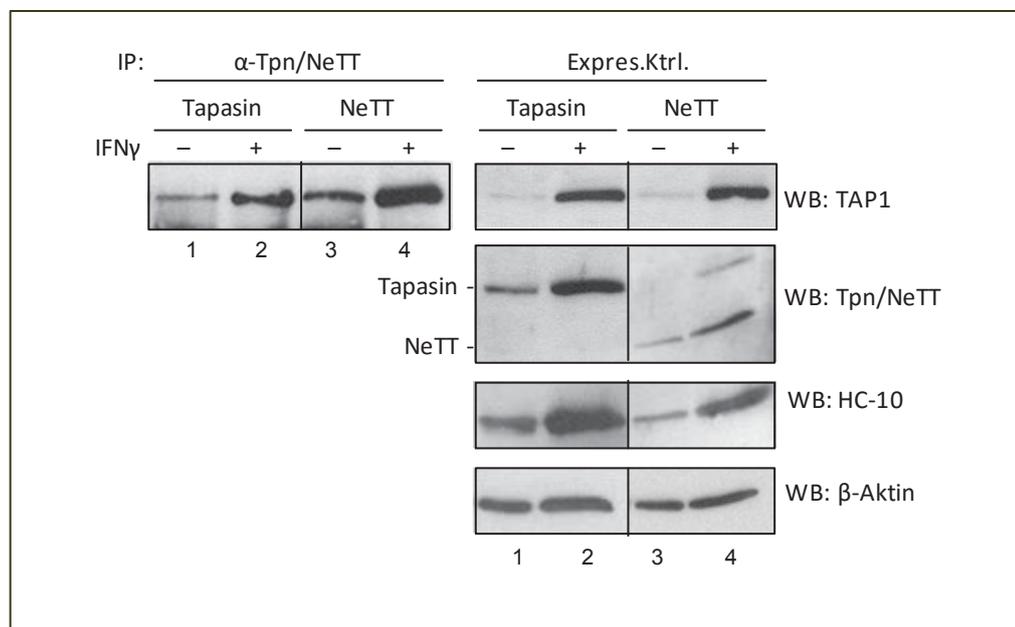


Abb. 28: NeTT bindet stärker als Tapasin an TAP1.

HeLa-Tpn und HeLa-NeTT Zellen wurden für 24 Std. mit (+) IFN γ (200 U/ml) oder ohne (-) IFN γ stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in digitoninhaltigem IP-Lysisbuffer lysiert und eine IP mit anti-Tpn/NeTT AK (STC) durchgeführt. Die Auftrennung sowie Detektion erfolgte im WB mit anti-TAP1 AK. Für die Expres.Ktrl. wurden die AK anti-Tpn/NeTT (C'-Terminus), HC-10 (MHC I HC) und zur Beladungskontrolle β -Aktin verwendet. Gezeigt ist eins von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

Für eine besser Beurteilbarkeit des Interaktionsverhalten zwischen Tpn/TAP und NeTT/TAP wurde hinter dem Signalpeptid an den N'-Terminus von Tpn und NeTT ein HIS-Tag kloniert (siehe 4.2.1). Mit einem HIS-AK war so eine Unterscheidung zwischen endogenem Tpn und transfiziertem HIS-Tpn und -NeTT möglich.

HIS-epitopmarkiertes Tpn und NeTT wurden transient in HeLa-Zellen exprimiert und anschließend mittels des HIS und anti-Tpn/NeTT AK präzipitiert (Abb. 29). TAP1 wurde sowohl in HIS-Tpn als auch in HIS-NeTT transfizierten Zellen vom HIS AK ko-präzipitiert (A, Spur 2-3). Abermals zeigte sich eine bessere Ko-IP von TAP durch NeTT als durch Tpn. Dabei waren weder die gewählten AK (HIS vs. anti-Tpn/NeTT) entscheidend, noch die Tatsache, dass NeTT eine schwächere Expression aufwies. Dies wurde noch deutlicher durch die quantitative Analyse der Präzipitationsstärken (B). Das Diagramm zeigt für die TAP1 Ko-IP durch HIS-NeTT (B, Balken 6) eine doppelt so starke IP wie durch Tpn (B, Balken 5). Mit dem HIS-AK konnte sogar ein dreifacher Anstieg (B, Balken 3 zu 2) errechnet werden.

Zusätzlich traten zu den erwarteten HIS-Fusionsproteinen weitere Proteine (*) auf (A, Spur 2, 3, 5, 6, 8 und 9). Ursächlich dafür könnte sein, dass der HIS-Tag strukturelle Veränderungen in Teilen des Proteins induziert hat. Eine genauere Identifikation dieser Protein-Detektionen war jedoch nicht möglich.

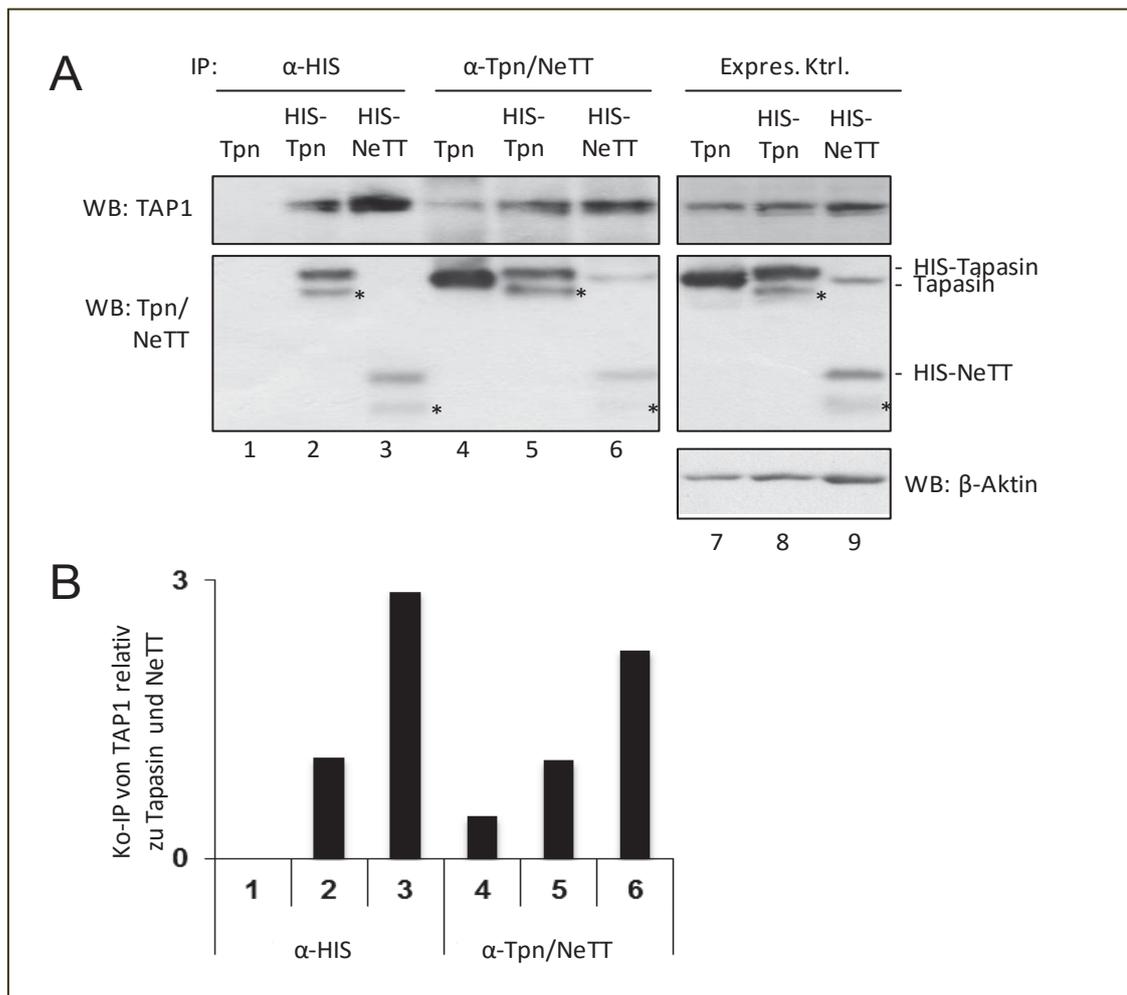


Abb. 29: NeTT präzipitiert TAP besser als Tapasin.

A. IP von HeLa-Zellen (Tpn) und transient transfizierten HIS-Tpn, HIS-NeTT. 24 Std. nach Transfektion wurden die Zellen in digitoninhaltigem Lysisbuffer lysiert und mit anti-HIS oder anti-Tpn/NeTT AK (STC) präzipitiert. Die Proteinauftrennung und Detektion erfolgte im WB mit anti-TAP1, anti-Tpn/NeTT (C-Terminal), β -Aktin AK. (*) markiert eine nicht genauer identifizierbare Proteinbanden. B. Histogramm, quantitative Analyse der Präzipitationsstärken von TAP1 relativ zu Tpn und NeTT Präzipitation, Nummerierung wie in A. Gezeigt ist eins von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

5.4.4 Tapasin und NeTT binden gleichzeitig an einen TAP-Komplex

Die verwendeten anti-Tpn/NeTT AK binden Tpn und NeTT gleichermaßen, da sie gegen Strukturen im Protein gerichtet sind die in beiden Proteinen exprimiert werden. Bei Ko-Expression von Tpn und NeTT war es bislang nicht möglich mit diesen AK zwischen Tpn und NeTT zu unterscheiden. Der monoklonale Tpn AK PaSta.1 hingegen erkennt eine nicht lineare Struktur von Tpn (Dick et al., 2002). Es ist anzunehmen, dass NeTT durch das Fehlen von Exon 3 eine divergente räumliche Struktur aufweist. Deshalb

sollte untersucht werden, ob der PaSta.1 AK NeTT binden kann. Dazu wurden CMT64.5-Zellen mit Tpn, NeTT oder simultan mit Tpn und NeTT transduziert und eine IP mit PaSta.1 und anti-Tpn/NeTT durchgeführt. Während der anti-Tpn/NeTT AK Tpn und NeTT wie erwartet präzipitierte, konnte PaSta.1 nur Tpn präzipitieren (Abb. 30, Spur 5/7). Bei einem Vergleich der Präzipitationsstärken fällt die Spezifität von PaSta.1 für Tpn auf (Spur 5/7 zu 2/4). PaSta.1 kann NeTT nicht bindet (Spur 6).

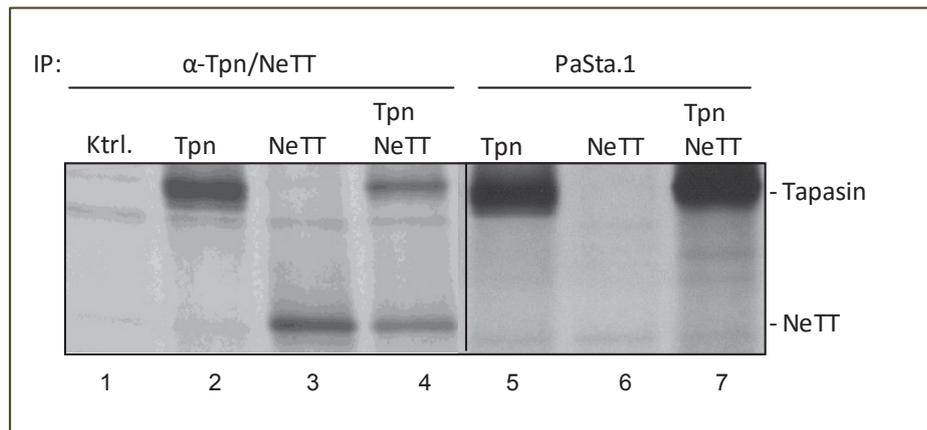


Abb. 30: PaSta.1 bindet nur an Tapasin, erkennt aber nicht NeTT.

TAP- und Tpn-defiziente CMT64.5 Zellen, transduziert mit Ktrl., Tpn und/oder NeTT, wurden für 2 Std. mit [35 S]-Met/Cys metabolisch markiert, in Digitonin lysiert und mit PaSta.1 und anti-Tpn/NeTT AK (STC) präzipitiert. Die Proteinauftrennung erfolgte in einem 11,5% Gradientengel und die Detektion über Autoradiographie. Gezeigt ist eins von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

Die exklusive Spezifität von PaSta.1 für Tpn erlaubt in HeLa-Zellen zu analysieren, ob Tpn und NeTT simultan an einen TAP-Komplex binden können. Dieselben experimentellen Bedingungen wie in Abb. 30 wurden mit stabil transfizierten HeLa-Tpn und HeLa-NeTT Zellen durchgeführt (Abb. 31). Erstaunlicherweise wurde NeTT bei Verwendung des PaSta.1 AK hier detektiert (Abb. 31, Spur 4). Offenbar können Tpn und NeTT indirekt miteinander interagieren. Gegen eine direkte Interaktion spricht, dass NeTT nicht in den simultan transduzierten CMT64.5 Zellen detektiert werden konnte (Abb. 30, Spur 7). CMT64.5 Zellen sind TAP-defizient, während HeLa-Zellen TAP exprimieren, folglich muss eine indirekte Interaktion zwischen Tpn und NeTT durch TAP zustande kommen.

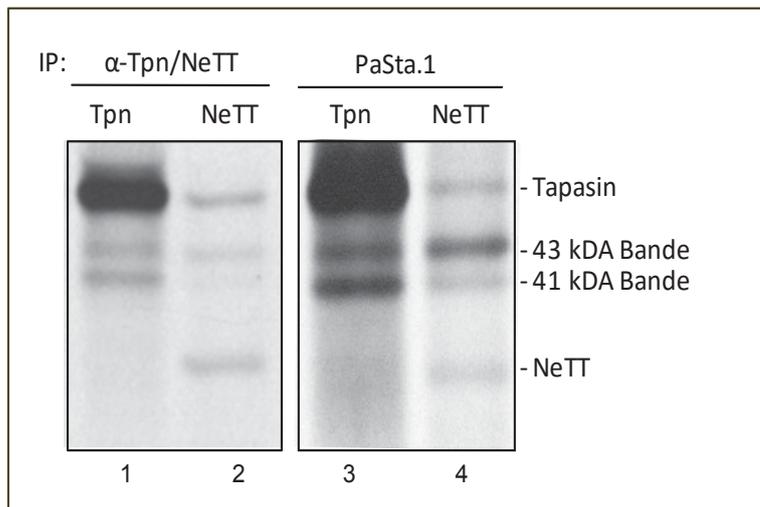


Abb. 31: NeTT wird TAP abhängig präzipitiert.

Experimenteller Aufbau und Durchführung mit stabil trans-fizierte HeLa-Tpn und HeLa-NeTT Zellen wie in Abb. 30. Gezeigt ist eins von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

Wie kürzlich in zwei unabhängigen Studien gezeigt wurde, können zwei Tpn Moleküle an einen TAP-Komplex binden (Panter et al., 2012, Hulpke et al., 2012). Deshalb könnten auch Tpn und NeTT gleichzeitig an einen TAP-Komplex binden. Um das Ergebnis aus Abb. 31 zu bestätigen, wurden einfach und simultan transduzierte CMT64.5-NeTT und CMT64.5-NeTT/Tpn Zellen ÜN mit rekombinanten TAP1 und TAP2 exprimierenden Vaccinia Viren (Halenius et al., 2006) infiziert (Abb. 32; Durchführung des Experimentes mit Hilfe von Alexandra Niepel und Dr. Anne Halenius, Institut für Virologie, HHU, Düsseldorf). Es sollte analysiert werden, ob PaSta.1 NeTT wieder ko-präzipitieren kann, wenn TAP in den CMT64.5-NeTT/Tpn Zellen exprimiert wird.

Die Expres.Ktrl. der infizierten Zellen zeigt mit der schwachen NeTT-Detektion, dass die Vaccinia Viren die Proteinsynthese der Wirtszelle hemmten. Tpn hatte gegenüber NeTT den Vorteil einer deutlich längeren Halbwertszeit, sodass 16 Std. nach Infektion noch genügend Tpn, dagegen kaum noch NeTT, vorhanden war (Abb. 32, Spur 3-4). Durch die TAP Expression in CMT64.5-NeTT/Tpn Zellen wurde NeTT tatsächlich von PaSta.1 ko-präzipitiert (Spur 6). Sowohl Tpn als auch TAP müssen vorhanden sein, damit eine Ko-IP von NeTT durch Tpn stattfinden kann. Dieses Experiment zeigt, dass Tpn und NeTT gleichzeitig an einen TAP-Komplex binden können.

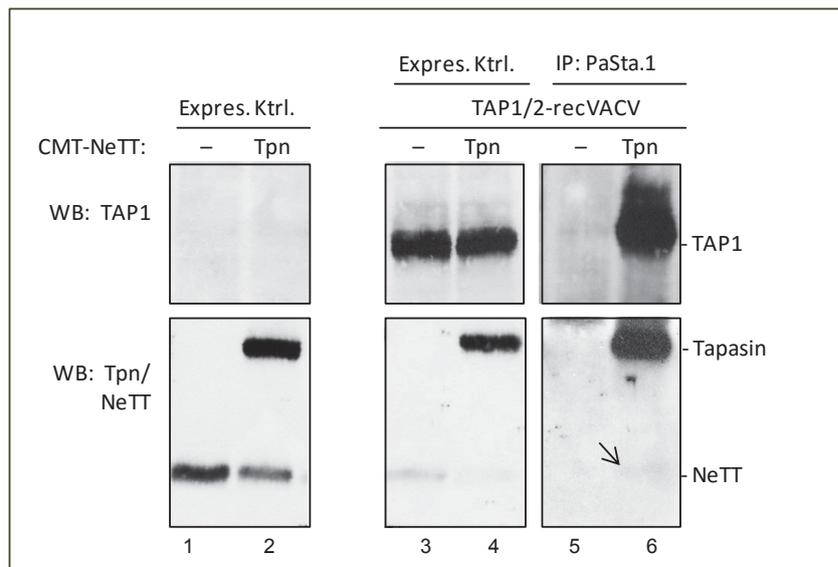


Abb. 32: TAP Expression führt zur Ko-IP von NeTT durch PaSta.1.

CMT64.5-NeTT und CMT64.5-NeTT/Tpn Zellen wurden 16 Std. mit rekombinanten TAP1 und TAP2 exprimierenden Vaccinia Viren (Halenius et al., 2006) infiziert und lysiert. Die IP erfolgte mit PaSta.1 und die Detektion im WB mit anti-TAP1 und anti-Tpn/NeTT AK (C'-Terminus). Gezeigt ist eins von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

5.4.5 Kann NeTT Tapasin aus seiner Interaktion zu TAP verdrängen?

Mehrfach wurde in den bereits gezeigten Experimenten beobachtet, dass die Bindung von NeTT an den TAP-Komplex stärker erschien als die Interaktion zwischen Tpn und TAP (Abb. 27 D; Abb. 28; Abb. 29). Daraus resultierte die Frage, ob NeTT möglicherweise Tpn aus seiner Bindung mit TAP verdrängen und stattdessen seine Interaktionsstelle einnehmen kann. Um diese Fragestellung näher beurteilen zu können, wurden erneut HeLa- und HeLa-NeTT Zellen verwendet. HeLa-NeTT Zellen wurden zusätzlich mit IFN γ stimuliert, um das TAP- und Tpn-Expressionsniveau anzuheben (Abb. 33). Abermals wurde NeTT mit PaSta.1 ko-präzipitiert. Bei IFN γ -Stimulation zeigte sich sogar eine stärkere Ko-IP von NeTT, was auf die stärkere Tpn und TAP Expression zurückgeführt werden konnte (Spur 2-3). Gleiches Ergebnis zeigte die Ko-IP durch anti-TAP1 (Spur 5-6). Interessanterweise konnte NeTT aber, obwohl seine Expression stärker war als die von Tpn, Tpn nicht aus seiner TAP-Bindung komplett verdrängen. Vielmehr wurden gleiche Mengen an Tpn und NeTT von TAP ko-präzipitiert (Spur 5-6). Möglich wäre, dass Tpn und NeTT unterschiedliche Bereiche für

die Interaktion mit TAP haben. Dieser Hypothese konnte aber in dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen werden.

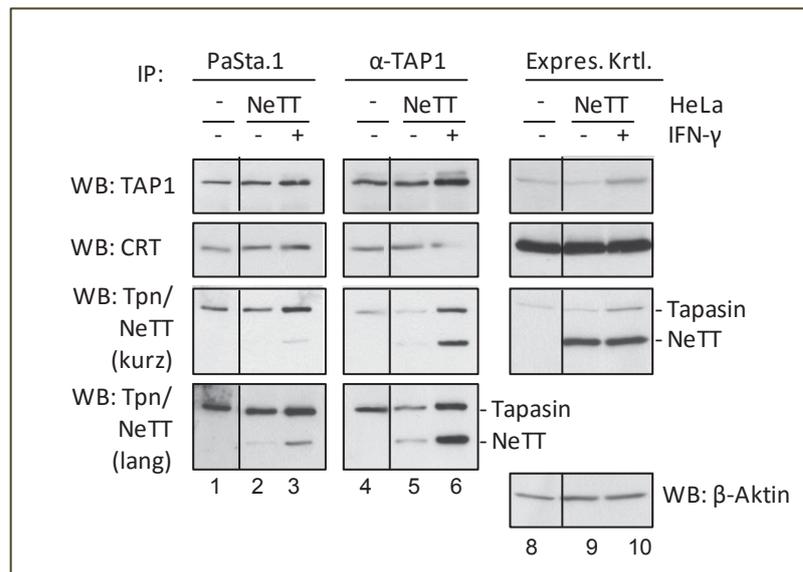


Abb. 33: NeTT kann Tapasin nicht von TAP verdrängen.

HeLa-Ktrl. (-) und HeLa-NeTT (NeTT) Zellen wurden für 14 Std. mit (+) oder ohne (-) IFN γ (200 U/ml) stimuliert. Die IP erfolgte mit anti-TAP1 oder PaSta.1 AK und die Detektion im WB mit anti-TAP1, anti-CRT und anti-Tpn/NeTT AK (C'-Terminus). Die β -Aktin Detektion diente zum Proteinmengenabgleich. ‚Kurz‘ und ‚lang‘ steht für die Länge der Filmexpositionszeit.

Gezeigt ist eins von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

Zusammenfassung:

- PaSta.1 bindet nur Tpn aber nicht NeTT.
- NeTT und Tpn können gleichzeitig an denselben TAP-Komplex binden.
- NeTT interagiert stabil mit TAP, kann aber Tpn weder aus seiner Bindung mit TAP verdrängen noch ersetzen.

5.5 Der Einfluss von NeTT auf die MHC I Moleküle

Eine der Hauptaufgaben von Tpn besteht darin leere MHC I Moleküle zu stabilisieren und diese daran zu hindern das ER zu verlassen. Zusätzlich sorgt Tpn für die MHC I Beladung mit affinen Peptiden. Es wurde bereits gezeigt, dass NeTT die Oberflächenexpression der HLA-B*44:02 Moleküle in Tpn defizienten Zellen nicht wiederherstellen kann, obwohl NeTT transient mit den MHC I-HC interagiert (Abb. 26 B, Spur 3a). Bei nochmaliger Betrachtung der Abb. 31 fallen unterschiedliche Ko-IP Muster für die MHC I-HC Allele (43 kDa und 41 kDa MHC I-HC Banden) in Tpn oder NeTT transfizierten Zellen auf. Dies könnte bedeuten, dass die MHC I Allele in den verwendeten HeLa-Zellen unterschiedlich stark Tpn-abhängig sind, was mit Hilfe von Stabilitätsanalysen untersucht wurde.

5.5.1 NeTT beeinträchtigt die MHC I Stabilität

Aus metabolisch markierten HeLa-Zelllysaten konnten zwei distinkte MHC I-HC Banden (41 kDa und 43 kDa) ko-präzipitiert werden (Abb. 31). Es ist nicht bekannt, welchen MHC I Allelen sie entsprechen, allerdings dauerte ihre Interaktionszeit mit dem PLC unterschiedlich lang. Die 43 kDa MHC I-HC Bande konnte für mehr als 3 Std. im PLC nachgewiesen werden, während die 41 kDa-Bande nur für kurz (ca. 30 Min.) mit dem PLC interagierte (*Pulse chase* Experiment mit Endo H Verdau von Dr. Anne Halenius, Institut für Virologie, HHU, Düsseldorf).

Um den Effekt von NeTT auf die fraglich unterschiedlichen Tpn-abhängigen MHC I Allele genauer zu analysieren, wurden Zelllysate stabil transfizierter HeLa-Tpn und HeLa-NeTT Zellen nach metabolischer Markierung mit anti-Tpn/NeTT, -CRT und -TAP1 gegen den PLC direkt präzipitiert. Anschließend wurden die ko-präzipitierten MHC I-HC Moleküle der HLA-B und -C Allele in einer wiederholten IP mittels des mAB HC-10 AK isoliert (Abb. 34).

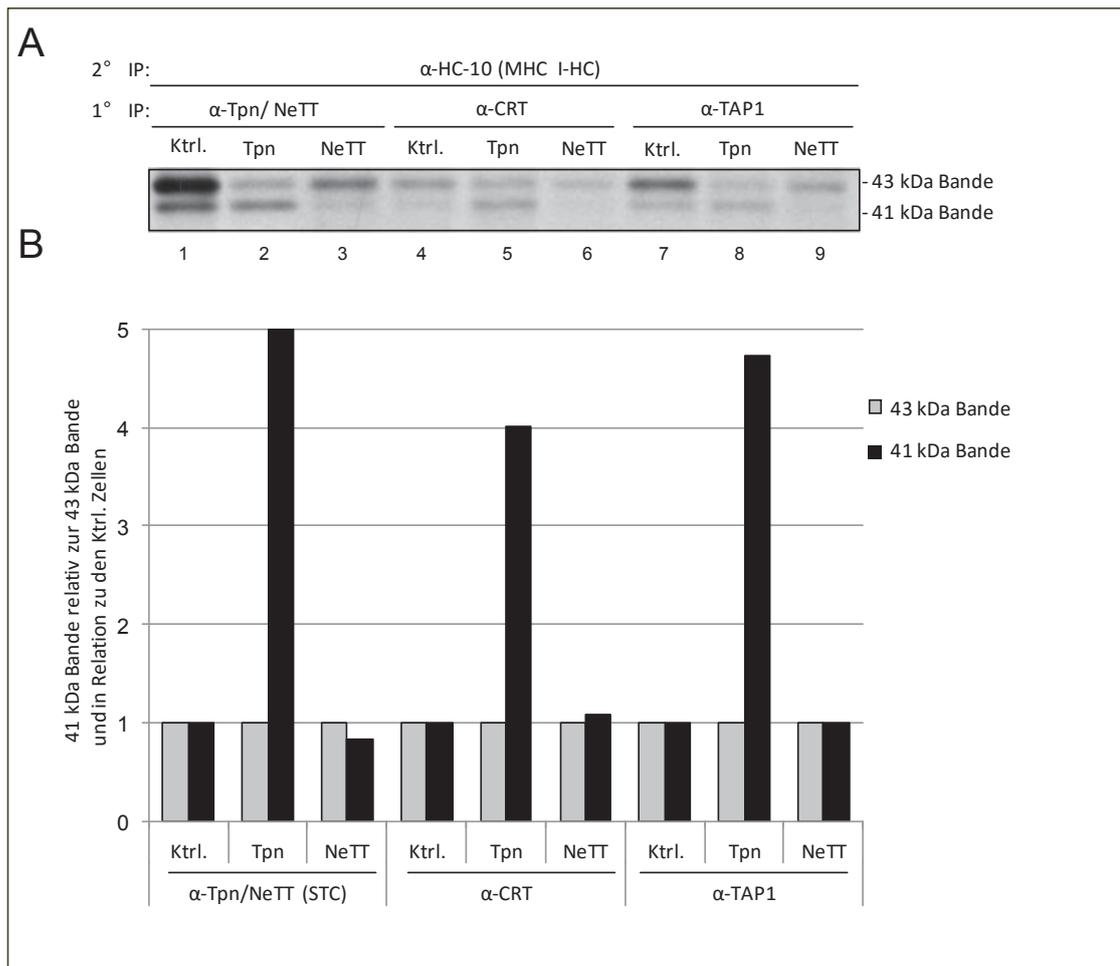


Abb. 34: Die 41 kDa MHC I-HC interagiert stark mit Tapasin.

A. HeLa-Ktrl., -Tpn und -NeTT Zellen wurden für 2 Std. mit [³⁵S]-Met/Cys metabolisch markiert, bevor sie in digitoninhaltigem IP-Lysispuffer lysiert und in einer 1°IP mit den AK anti-Tpn/NeTT (STC), anti-CRT und anti-TAP1 präzipitiert wurden. Die Dissoziation des AK-Protein-Komplexes erfolgte in 1,5% SDS NP40 Lysispuffer bei 65°C. Anschließend erfolgte eine erneute IP (2°IP) mit HC-10-AK. B. Quantifizierung der 43 kDa (grau) und der 41 kDa (schwarz) MHC I-HC Banden in Relation zueinander. Gezeigt ist eins von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

Tpn interagiert deutlich besser als NeTT mit der 41 kDa MHC I-HC Bande, was darauf hindeuten könnte, dass es sich bei den beiden dargestellten Banden um zwei unterschiedliche Tpn-abhängige MHC I-HC Allele handelt (gleiches IP Muster in Abb. 31). Wie bereits erwähnt, interagiert die 41 kDa Bande nur kurz mit Tpn und dem PLC. In dieser Re-IP wurde jedoch für Tpn eine stärkere Präzipitation der 41 kDa Bande gemessen. Es ist anzunehmen dass die Überexpression von Tpn das Interaktionsverhalten modifiziert. Abermals wurde deutlich, dass Tpn und NeTT ein divergentes Interaktionsverhalten mit den MHC I Molekülen besitzen.

Mehrfach wurde in anderen Studien die Qualität der Peptidbeladung mit der Thermostabilität der MHC I Moleküle korreliert (Williams et al 2002, Leonhardt et al., 2005). Je besser ein Peptid in die Bindegroße passt, desto stabiler ist das MHC I Molekül bei erhöhten Temperaturen. Falls NeTT eine optimale Beladung der MHC I Moleküle verhindert, müssten folglich in einem Thermostabilitätsassay die MHC I Moleküle in Gegenwart von NeTT weniger temperaturstabil sein als in Tpn exprimierenden Zellen. Um die Stabilität der MHC I Moleküle zu analysieren, wurden nach metabolischer Markierung Zelllysate stabil transifizierter HeLa-Tpn und HeLa-NeTT Zellen bei unterschiedlichen Temperaturen (4, 37, 50°C) inkubiert. Die verwendeten MHC I-AK unterscheiden sich in ihrer Spezifität. Der W6/32 AK erkennt nur MHC I Moleküle, die als Heterodimere (MHC I-HC/ β_2m) vorliegen (Parham et al., 1979), während der HC-10 AK nur freie MHC I-HC erkennt (Stam et al., 1986). Sind die MHC I Komplexe stabil, kann der W6/32 AK nach der Temperaturerhöhung immer noch MHC I Heterodimere präzipitieren. Sind hingegen die MHC I Komplexe nicht stabil und zerfallen durch den Temperaturanstieg in ihre beiden Untereinheiten, können mehr freie MHC I-HC mit dem HC-10 AK präzipitiert werden. Die Präzipitationsstärken der unterschiedlichen AK wurden ins Verhältnis zueinander gesetzt (Abb. 35).

In HeLa-NeTT Zellen wurden mehr freie MHC I-HC Moleküle als Heterodimere präzipitiert. Der Temperaturanstieg führte zu mehr als doppelt so vielen freien MHC I-HC Molekülen in Gegenwart von NeTT (graue Linie) im Vergleich zu HeLa-Tpn (schwarze Linie) oder HeLa-Ktrl. Zellen (blau Linie). Dies galt sogar für beide MHC I-Banden, wobei die 41 kDa Bande noch stärker mit HC-10 präzipitiert wurde (bei 50°C fast dreimal mehr). NeTT konnte nicht zur Stabilität der MHC I Moleküle beitragen.

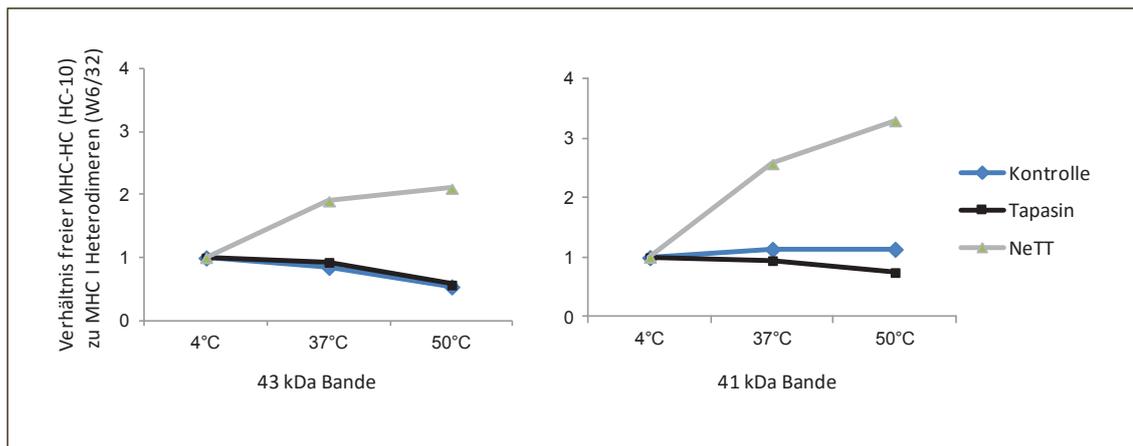


Abb. 35: NeTT sorgt für eine verminderte Thermostabilität von MHC I Molekülen.

HeLa-Ktrl., -Tpn und -NeTT Zellen wurden für 2 Std. mit [³⁵S]-Met/Cys markiert und in NP40 lysiert. Es erfolgte eine 30 Min. Inkubation bei 4, 37 und 50°C. Parallel wurde mit den AK W6/32 und HC-10 eine IP durchgeführt. Dargestellt ist die Quantifizierung der 43 kDa und 41 kDa MHC I-HC Bande von freien MHC I-HC Molekülen (HC-10) verglichen mit der Menge an gesamten MHC I Heterodimeren (W6/32). Grau: MHC I Moleküle aus HeLa-NeTT Zellen. Schwarz: MHC I Moleküle aus Tpn exprimierenden Zellen. Blau: MHC I Moleküle aus Ktrl.-Zellen. Gezeigt ist eins von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

5.5.2 NeTT verzögert den MHC I Transport

Um die Konsequenz der durch NeTT nicht stabilisierten MHC I Moleküle zu erfassen, wurde die Kinetik des MHC I Transportes analysiert. In HeLa-Zellen, die das Tpn-abhängige HLA-B*44:02-Molekül stabil exprimierten, wurde zusätzlich mittels eines pIRES-EGFP Vektors Tpn bzw. NeTT transient exprimiert. Anschließend wurden diese Zellen mit einer sauren Lösung gewaschen. Dieses Vorgehen löste die Peptide aus der Bindegrube, wodurch die MHC I Komplexe instabil und die daraus resultierenden freien MHC I-HC in die endosomalen Kompartimente internalisiert wurden. Die Zelloberfläche sollte damit frei von MHC I Komplexen sein. Dadurch konnte per FACS Analyse die Dauer gemessen werden, die neu gebildete MHC I Komplexe benötigten, um wieder die Oberfläche zu erreichen.

Nach einer Säurebehandlung (2 Min.) wurden die Zellen für 0, 1 und 3 Std. in DMEM inkubiert, danach mit PBS gewaschen und für die FACS-Analyse mit dem TT4-A20 AK gefärbt. Dieser AK erkennt keine endogenen MHC I Allele von HeLa-Zellen, jedoch die HLA-B*44:02 Allele (Abb. 36).

Die zeitabhängige Analyse der HLA-B*44:02 Oberflächenexpression zeigte, dass nicht nur der Transport zur Oberfläche in NeTT transfizierten Zellen verzögert war, auch der Transport der gesamten MHC I Menge war leicht reduziert. Bei den mit Tpn transfizierten Zellen befanden sich schon nach 1 Std. fast 30% mehr HLA-B*44:02 Moleküle auf der Zelloberfläche als in NeTT exprimierenden Zellen und nach 3 Std. waren es bereits 50% (A).

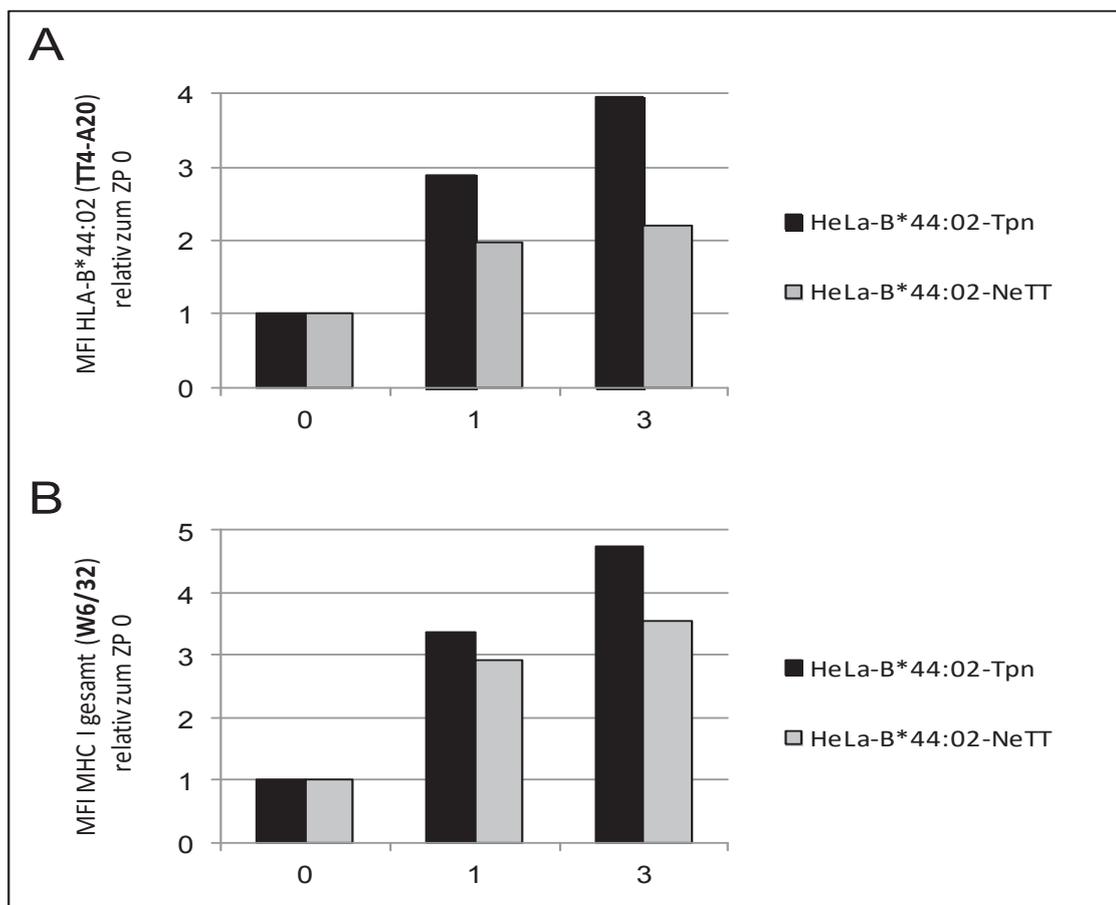


Abb. 36: NeTT verzögert den Transport der HLA-B*44:02 Moleküle.

Stabil transfizierte HeLa-B*44:02 Zellen wurden zusätzlich transient mit dem Tpn- und NeTT-pIRES-EGFP Vektor transfiziert. 24 Std. nach Transfektion wurden diese für 2 Min. mit einer sauren Lösung (pH 3) gewaschen und anschließend für 0, 1, 3 Std. bei 37°C in DMEM-Medium inkubiert (x-Achse). Die Messung der HLA-B*44:02 Moleküle (A) sowie der gesamten MHC I Oberflächenexpression (B) erfolgte nach Färbung mit dem TT4-A20 (A) und W6/32 (B) AK mittels FACS-Analyse (MFI der HLA-B*44:02 (A) und MHC I (B) Expression zum ZP 0). Gezeigt ist eins von mindestens vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit homogenem Ergebnis. Insgesamt jedoch sehr unterschiedliche MFI bedingt durch die Behandlung mit der sauren Lösung.

Die mit NeTT transfizierten HeLa-Zellen exprimierten endogenes Tpn, wodurch der Transport und die Stabilität der HLA-B*44:02 Moleküle eigentlich gewährleistet sein sollte. Die Transport- und Instabilitätsanalysen aus Abb. 35 und Abb. 36 zeigten aber gegenteiliges. So entstand die Annahme, dass NeTT nicht nur die HLA-B*44:02 Oberflächenexpression nicht unterstützte, sondern womöglich sogar einen negativen Einfluss auf Tpn stabilisierende und HLA-B*44:02 editierende Funktion habe.

5.6 NeTT beeinträchtigt die Funktion von Tapasin

Der Einfluss von NeTT auf die HLA-B*44:02 Oberflächenexpression bei gleichzeitiger endogener Expression von Tpn sollte mittels einer FACS-Analyse näher untersucht werden. Um den maximalen inhibitorischen Effekt von NeTT analysieren zu können, wurde ein System gewählt, bei dem nur neu synthetisierte Moleküle in der Oberflächenmessung erfasst wurden. HeLa-Zellen wurden gleichzeitig transient mit Tpn, NeTT oder einem Ktrl.-Vektor und zusätzlich mit dem HLA-B*44:02 Allel transfiziert (Abb. 37 A). Die Färbung der HLA-B*44:02 Oberflächenexpression erfolgte mit dem TT4-A20 AK.

Die Oberflächenexpression der HLA-B*44:02 Moleküle konnte durch die Tpn-Überexpression nur leicht gesteigert werden. Entweder war die endogene Tpn-Menge ausreichend um die Oberflächenexpression optimal zu unterstützen oder der Zeitraum nach Transfektion von Tpn war zu kurz um die Oberflächenexpression zu induzieren (Beutler et al., 2013). Interessanterweise führte die Expression von NeTT zu einer mehr als 50%igen Reduktion der HLA-B*44:02 Oberflächenexpression, während die Expression des Tpn-unabhängigen Allels HLA-B*44:05 und des CD71 Moleküls unverändert blieb (Abb. 37 B).

In einem weiteren Experiment wurde erneut die Assemblierung bzw. die Stabilisierung des HLA-B*44:02 Heterodimeres in Gegenwart von NeTT durch eine metabolische Markierungskinetik untersucht. 16 Std. nach Transfektion wurden die Zellen für 7, 15, 30 und 60 Min. mit [³⁵S]-Met/Cys markiert und anschließend lysiert. Die Präzipitation der HLA-B*44:02 Moleküle erfolgte mit dem TT4-A20 AK (Abb. 38 A).

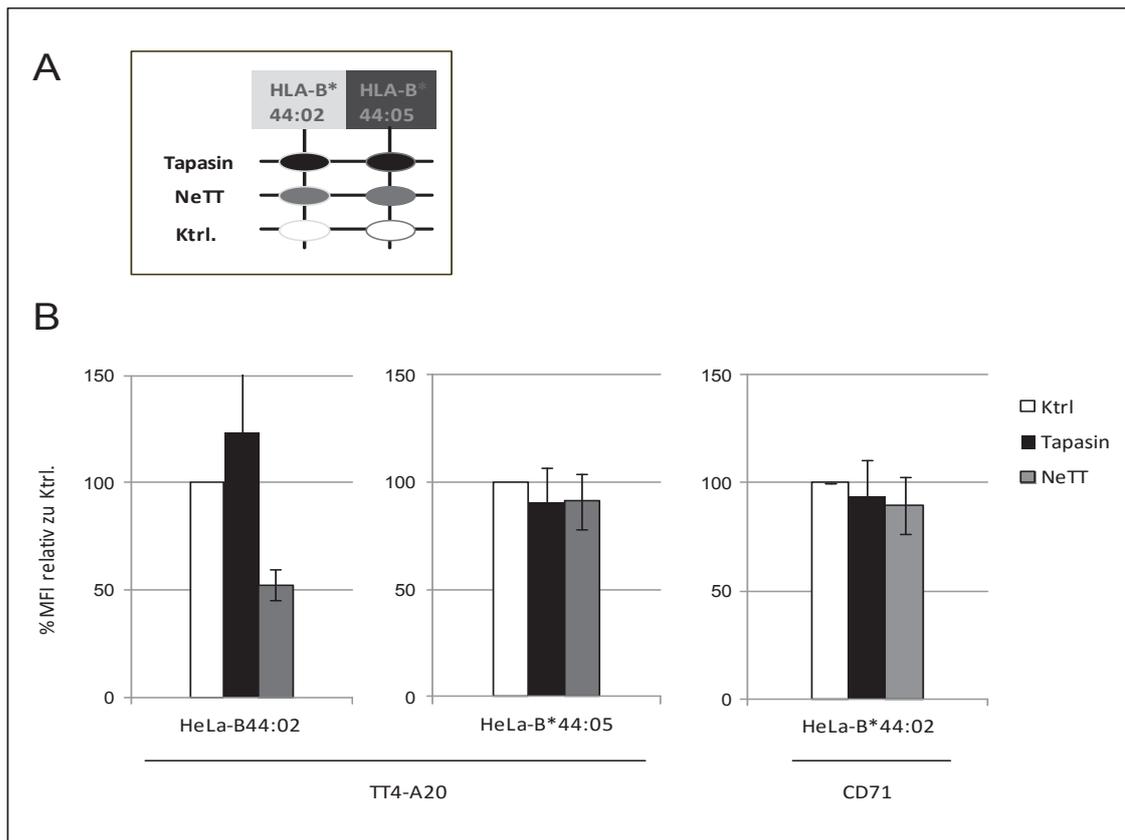


Abb. 37: NeTT inhibiert die Funktion von Tapasin.

A. Transfektionsschema: HeLa-Zellen wurden mit HLA-B*44:02 oder HLA-B*44:05 (in pcDNA3.1) und simultan mit Tpn-, NeTT- oder Ktrl.-pIRES-EGFP Vektor transient ko-transfiziert. B. Histogramm einer FACS-Analyse 16 Std. nach Transfektion, Messung der TT4-A20-Färbung bei EGFP-positiven Zellen, sowie CD71-Färbung als unabhängige MHC I Expres.Ktrl. MFI relativ zu Kontrollzellen, Median und Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

In den Ktrl.- sowie Tpn-transfizierten Zellen konnten ähnliche Mengen an HLA-B*44:02 präzipitiert werden (Abb. 38 A). Im Gegensatz dazu wurden aus NeTT exprimierenden Zellen nur die Hälfte (50%) an HLA-B*44:02 Molekülen präzipitiert (B). Die transfizierten HeLa-NeTT Zellen exprimierten gleichzeitig endogenes Tpn, das eigentlich die Stabilität dieser Moleküle unterstützen sollte. Trotzdem wurden in Gegenwart von NeTT 50% weniger HLA-B*44:02 Moleküle assembliert und präzipitiert. Wird die Tatsache berücksichtigt, dass Tpn und NeTT an einen TAP-Komplex binden, ist es vorstellbar, dass NeTT Tpn indirekt inhibiert, indem es eine Tpn-Bindeseite an TAP blockiert. Da NeTT nicht aktiv an der Peptidbeladung teilnimmt, wird so die Funktion von Tpn beeinträchtigt, aber nicht komplett inhibiert.

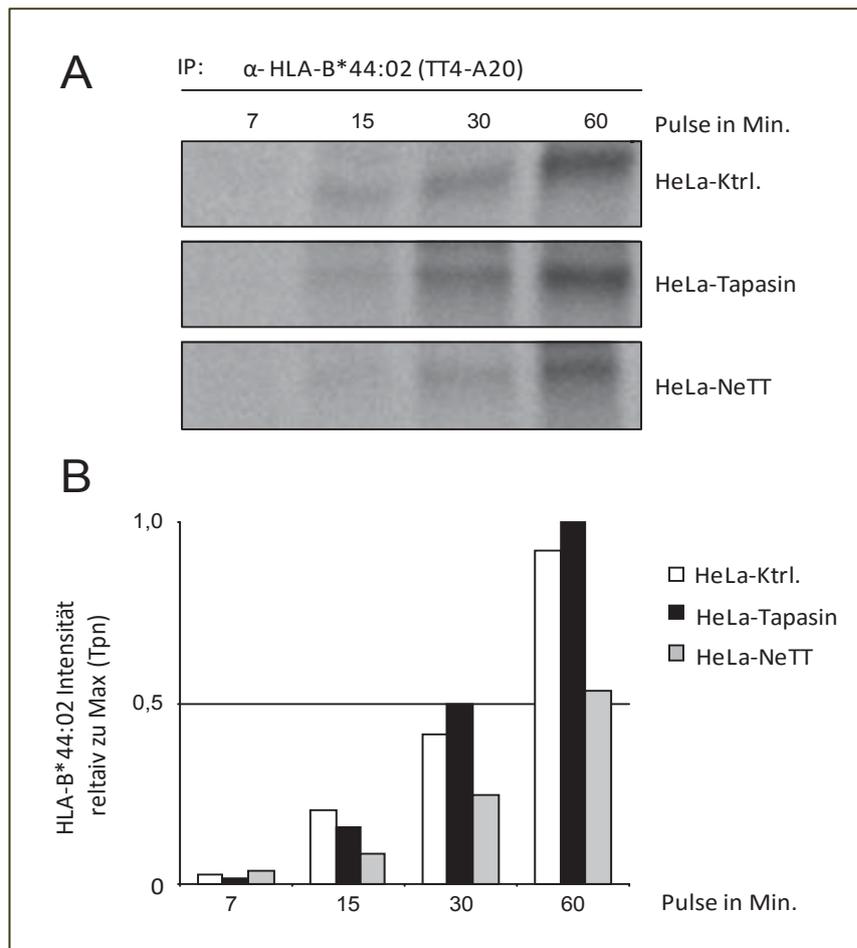


Abb. 38: Die HLA-B*44:02 Stabilisierung ist in Gegenwart von NeTT um 50% reduziert.

A. Transient transfizierte HeLa-Zellen (wie in Abb. 37 A) wurden für 7, 15, 30 und 60 Min. metabolisch markiert. Die Zellyse erfolgte in NP40-IP-Lysispuffer und die HLA-B*44:02 Moleküle wurden mit dem TT4-A20 AK präzipitiert. B. Quantifizierung der Präzipitationsstärken in Relation zur maximalen Intensität. Gezeigt ist eins von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

Zusammenfassung:

- NeTT inhibiert die Oberflächenexpression von HLA-B*44:02 in HeLa-Zellen.
- HLA-B*44:02 Moleküle werden bei NeTT Expression nur eingeschränkt mit Peptiden beladen und stabilisiert.

6 Diskussion

Tpn nimmt eine Schlüsselrolle in der MHC I Antigen Präsentation ein. Im PLC ist es das Bindeglied, direkt oder indirekt, zwischen der Mehrzahl der Komponenten. Tpn gewährleistet, dass eine Vielzahl von polymorphen MHC I Allelen optimal mit affinen Peptiden beladen werden und eine effiziente Antigen Präsentation sowie die daraus resultierende CTL Antwort erfolgen kann.

Dem alternativ gespleißten Tpn Transkript NeTT fehlt Exon 3 und damit Cys95, welches für die optimale Peptidbeladung von MHC I Molekülen essentiell ist (Dick et al., 2002; Wearsch und Cresswell 2007). Das verkürzte Tpn Transkript kodiert ein stabiles Protein (ca. 40 kDa), welches immer noch sehr effektiv mit dem TAP-Komplex interagieren kann, die Interaktion zu den MHC I Molekülen ist jedoch stark beeinträchtigt. NeTT ist dadurch nicht in der Lage, die Oberflächenexpression des Tpn-abhängigen MHC I Allels HLA-B*44:02 in Tpn-defizienten Zellen zu verbessern. Bei simultaner Expression von Tpn und NeTT hebt NeTT sogar den stabilisierenden Effekt von Tpn auf die HLA-B*44:02 Moleküle auf, woraus eine reduzierte Oberflächenexpression resultiert. Gezielte Analysen von NeTT exprimierenden Zellen ergaben eine modifizierte Zusammensetzung des PLC. Diese Befunde sind im Einklang mit dem Modell, dass die zwei Tpn-Bindungsseiten an TAP gleichzeitig von einem Tpn und einem NeTT Molekül besetzt werden können. NeTT kann zwar nicht als ein generell wirksamer dominanter Inhibitor des MHC I Antigen Präsentationswegs eingeschätzt werden, dennoch reduziert es die MHC I Peptidbeladung durch die Blockierung einer Tpn-Bindungsseite an TAP und die Oberflächenexpression Tpn-abhängiger MHC I Allele.

6.1 Der NeTT-PLC

Durch die Detektion von überexprimierten NeTT konnten biochemische Interaktionen von NeTT mit dem PLC analysiert werden. Tatsächlich konnte NeTT als ein Bestandteil des PLC identifiziert werden, obwohl es sich bei diesem *NeTT-PLC* um einen stark modifizierten Komplex handelt.

Exon 3 kodiert die AS 50-137 im Tpn Protein. Dieses Exon fehlt im NeTT Protein, sodass es für NeTT nicht möglich ist, dieselbe L-förmige Struktur wie Tpn sie einnimmt, auszubilden. Bis auf das Fehlen der 86 AS ist die Primärstruktur identisch. Die AS

Sequenz am Beginn des N'-Terminus und die des C'-Terminus von NeTT entspricht der von Tpn, wodurch NeTT von allen AK detektiert werden kann, die gegen die AS am N'- oder C'-Terminus gerichtet sind. NeTT muss aber eine andere Sekundär- sowie Tertiärstruktur als Tpn ausbilden. Deutlich wird dies dadurch, dass PaSta.1 NeTT nicht binden kann. PaSta.1 ist gegen die Ektodomäne von Tpn generiert worden und erkennt somit spezifisch die Struktur bzw. Konformation von Tpn.

Zu den im NeTT Protein fehlenden AS gehören die strukturgebenden AS Cys71 und Cys95. Während Cys95 eine intermolekulare Disulfidbrücke mit ERp57 ausbildet, entsteht zwischen Cys71 und Cys7 eine intramolekulare Disulfidbrücke (Peaper et al., 2005; Dong et al., 2009). Diese intramolekulare Disulfidbrücke sorgt für die Proteinstabilität. Bei Studien von Dick und Kollegen, in denen Halbwertszeiten von Tpn-Mutanten ermittelt wurden, zeigte sich eine ähnliche Halbwertszeit von 20-24 Std. für die Cys95-Mutante und den wt-Tpn. Die hier bestimmte Halbwertszeit von Tpn betrug ca. 15-20 Std. und lag damit nahe an dem in der Literatur berichteten Wert. Für die Tpn-Mutanten, in denen entweder Cys7 oder Cys71 deletiert wurden, war die Halbwertszeit dagegen auf 8 Std. reduziert (Dick et al., 2002). Die mit 2 Std. deutlich kürzere Halbwertszeit von NeTT zeigt, dass nicht nur die intramolekulare Disulfidbrücke Cys7-Cys71 für die Stabilität verantwortlich ist, sondern dass auch weitere Teile im Protein den Faltungszustand und die Tpn-Stabilität zu beeinflussen scheinen. Dies konnte durch die Degradationsanalysen bestätigt werden. Es wurde beobachtet, dass die Degradation von NeTT durch die Behandlung mit BFA beschleunigt wurde. Zwar konnte der genaue Mechanismus nicht geklärt werden, dennoch weist es darauf hin, dass NeTT eine divergente Modifikation erfahren muss.

Tpn-Cys95 stellt eine kovalente Bindung zu ERp57-Cys57 her. NeTT fehlt dieses Cys, weshalb zu erwarten war, dass NeTT nicht mit ERp57 interagiert. Dennoch konnte eine schwache Ko-IP von NeTT durch anti-ERp57 detektiert werden. Auch CRT konnte NeTT ko-präzipitieren, obwohl es über ERp57 und MHC I-HC/ β_2m Heterodimere in den PCL integriert wird. Diese unerwarteten Ko-IPs können durch unterschiedliche Erklärungsansätze diskutiert werden. Es könnte vermutet werden, dass eine residuelle Affinität zwischen NeTT und ERp57, die Cys95 unabhängig ist, existiert. NeTT könnte aber auch über den PLC, d.h. über MHC I-HC/ β_2m Heterodimere, die als Brücke zwischen CRT und NeTT fungieren, ko-präzipitiert worden sein. Alternativ wäre auch denkbar, dass eine

direkte Interaktion zwischen NeTT und CRT außerhalb des PLC stattfindet. NeTT fehlt, durch den Verlust von Cys71, eine strukturstabilisierende intramolekulare Disulfidbrücke zu Cys7 (Chen et al., 2002; Dick et al., 2002). NeTT könnte also direkt mit CRT im Rahmen der Proteinfaltungskontrolle interagiert. Für einige Tpn-Mutanten, die sich nicht optimal falten, wurden solche Interaktionen zu CRT bereits beschrieben (Trombetta et al., 1989; Peterson et al., 1995; Sousa et al., 1992; Vigneron et al., 2009).

Gegenstand vielzähliger Analysen ist noch immer die Frage welche Domänen von Tpn wichtig sind, um mit dem MHC I-HC/ β_2m Heterodimer interagieren zu können. In Interaktionsstudien mit einer Tpn-Mutante, der N'-terminal AS 1-50 fehlten, konnte keine Bindung an MHC I Moleküle nachgewiesen werden (Bangia et al., 1999; Dick et al., 2002). Dem zustimmend zeigten Roder und Kollegen, dass die ersten 87 AS von Tpn für eine Interaktion mit dem MHC I Heterodimer ausreichend sind (Roder et al., 2011). Durch die 2009 entschlüsselte Kristallstruktur des Tpn-ERp57 Heterodimers konnten zusätzliche AS-Reste von Tpn identifiziert werden, die an der Interaktion mit den MHC I Moleküle beteiligt sind. Es wurden unter anderem drei wichtige AS-Reste beschrieben die zum kurzen Teil der L-Struktur gehören und essentiell für die Interaktion mit MHC I sind (Dong et al. 2009). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse aus den Studien von Simone und Kollegen. Sie zeigten, dass die TM-Region von Tpn und die C'-terminale Ig-like Domäne für die Interaktion mit den MHC I-HC/ β_2m notwendig sind (Simone et al., 2012).

Im NeTT Protein sind die ersten N'-terminalen 50 AS sowie die TM-Region und die Ig-like Domäne erhalten, dennoch ist die Interaktion mit den MHC I-HC/ β_2m Heterodimeren nur schwach ausgeprägt. Eine der von Dong und Kollegen identifizierten drei AS-Reste (E72) fehlt in NeTT, womit die beeinträchtigte Interaktion zwischen MHC I und NeTT teilweise erklärt werden könnte (unter der Berücksichtigung, dass diese Studien von Dong und Kollegen mit löslichen Tpn-Mutanten durchgeführt wurden). Die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien zeigen, wie schwierig es ist, die Interaktionsmechanismen zwischen Tpn und den MHC I Heterodimeren zu identifizieren. Demzufolge bleibt vorerst unklar, in wieweit NeTT noch mit der MHC I-HC interagieren kann.

6.2 TAP vereint Tapasin und NeTT in einem PLC

Die Interaktion von Tpn mit TAP erfolgt über die TMD von Tpn (Sadasivan et al., 1996). Stöchiometrisch wird nicht mehr davon ausgegangen, dass bis zu vier Tpn Moleküle an einen TAP-Komplex binden (Ortman et al., 1997), sondern dass nur maximal zwei Tapasin Moleküle an das Heterodimer binden (Rufer et al., 2007). Die TMD von Tpn wird durch Exon 6-8 kodiert (Cabrera 2007), wodurch die Ausbildung der TMD im NeTT Protein nicht beeinträchtigt sein sollte (Abb. 5, Abb. 20). Es war zu erwarten, dass NeTT mit dem TAP-Komplex interagieren kann. Erstaunlicherweise erzeugten Ko-IPs durch NeTT stärkere TAP-Signale als durch Tpn. Das würde bedeuten, dass die N'-terminale Modifizierung im NeTT Protein einen Einfluss auf die Art der Interaktion zu TAP haben könnte.

Studien zeigten, dass TAP Moleküle, denen N'-terminale Anteile der TMD fehlten (ΔN), nicht mehr in der Lage waren mit Tpn zu interagieren (Koch et al., 2004). Daraus wurde geschlussfolgert, dass Tpn ausschließlich über die N'-terminalen TM-Segmente (TMS) der TMD von TAP1 und TAP2 mit TAP interagiert. Leonhardt und Kollegen beschrieben, dass diese N'-terminale TMS von TAP1 und TAP2 unabhängig voneinander Tpn binden können, und dass sich die Bindungen zwischen TAP1/Tpn und TAP2/Tpn nicht identisch sind, so wie auch die N'-terminale TMS von TAP1 und TAP2 nicht identisch sind (Leonhardt et al., 2005). Ein TAP-Komplex aus einem unveränderten TAP1 Molekül und einem um die N-Domäne gekürzten TAP2 Molekül (TAP2- ΔN -Domäne) konnte nicht ausreichend für die Funktionalität des PLC, d.h. für die Qualitätskontrolle der Peptidbeladung, sorgen. Demgegenüber war ein Komplex aus TAP1- ΔN -Domäne und TAP2 weiterhin dazu in der Lage. Die N-Domäne von TAP2 scheint somit essentiell für die Interaktion zwischen TAP2 und Tpn zu sein, während TAP1 eine zusätzliche Bindestelle für Tpn zur Verfügung stellen muss. Alternativ könnte auch die Bindung von Tpn nur an TAP2 ausreichen, um die Funktionalität des PLC aufrecht zu erhalten (Leonhardt et al., 2005). Einige Jahre später zeigten zwei unabhängige Arbeiten, dass die Bindung von einem Tpn Molekül an einen TAP-Komplex ausreichend für die PLC Funktion ist. Dabei wurde aber nicht zwischen einer Bindung an TAP1 oder TAP2 unterschieden. Außerdem zeigten sie, dass die Bindung von zwei Tpn Molekülen an den TAP-Komplex die

MHC I Expression an der Oberfläche verbesserte (Panter et al., 2012, Hulpke et al., 2012).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien mit NeTT und TAP konnten nicht klären, ob NeTT TAP1 oder TAP2 bevorzugt bindet. Es konnte aber belegt werden, dass Tpn und NeTT gleichzeitig an einen TAP-Komplex binden. Mithilfe des konformationsabhängigen Tpn AK Pasta.1, der NeTT nicht erkennt, konnte bei simultaner Expression zwischen Tpn und NeTT unterschieden werden. Im Gegensatz zu HeLa-Zellen konnte NeTT nicht durch PaSta.1 über Tpn in TAP-defizienten CMT64.5 Zellen ko-präzipitiert werden. Dies zeigt zum einen, dass Tpn und NeTT indirekt über TAP miteinander interagieren und zum anderen, dass die zwei Tpn-Bindestellen an TAP gleichzeitig durch Tpn und NeTT besetzt werden. Die Fragestellung, ob auch zwei NeTT Moleküle an einen TAP-Komplex binden können, bleibt zunächst unklar. Es müssten Experimente erfolgen, in denen untersucht wird, ob NeTT eine Bindungspräferenz zu TAP1 oder TAP2 zeigt: z.B. könnten in TAP-defiziente CMT64.5 Zellen TAP1/TAP2- Δ N oder TAP1- Δ N/TAP2 lentiviral exprimiert werden und in einer IP/WB mit dem anti-Tpn/NeTT AK die TAP1 oder TAP2 Ko-IP analysiert werden.

Die Tatsache, dass TAP als eine Art Bindeglied zwischen einer Tpn- und einer NeTT-Bindestelle fungiert, erklärt auch, weshalb NeTT in HeLa-Zellen durch anti-ERp57 und anti-CRT ko-präzipitiert wurde. ERp57 und CRT interagieren mit Tpn, welches wiederum an TAP bindet. Dadurch treten diese Moleküle indirekt mit NeTT in Kontakt und NeTT wird ko-präzipitiert (Abb. 39).

Durch die gleichzeitige Bindung eines Tpn und eines NeTT Moleküls an den TAP-Komplex kann NeTT keinen dominant negativen Einfluss auf die Peptidbeladung ausüben. Tpn kann weiterhin über seine Bindestelle die Peptidbeladung unterstützen. Allerdings ist die Effizienz des PLC eingeschränkt, da Tpn nicht auch noch die zweite Tpn-Bindestelle an TAP besetzen kann.

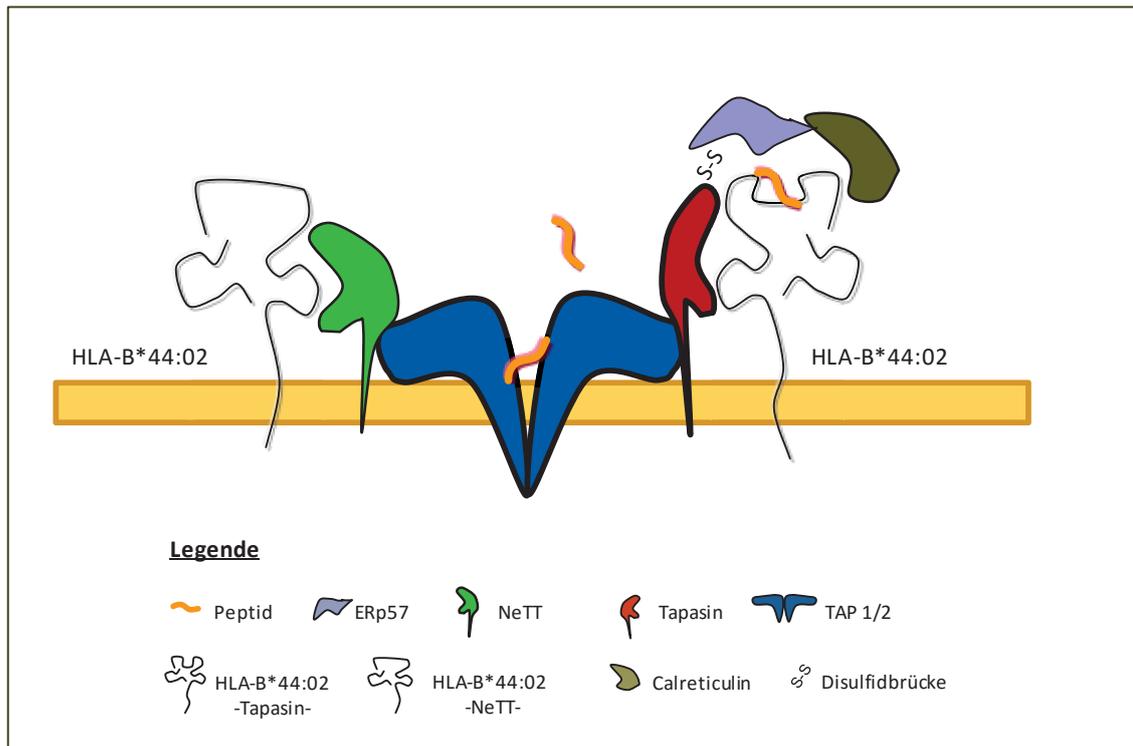


Abb. 39: Modell des alternativen PLC mit Tapasin und NeTT.

Tpn und NeTT binden gleichzeitig an TAP1/2. Dargestellt ist das Tpn-abhängige MHC I Allel, HLA-B*44:02. Über die Tpn-Bindestelle bildet sich der PLC vollständig aus (s-s, Disulfidbrücke zu ERp57, rechts), während über die NeTT-Bindestelle weder ERp57 noch CRT in den PLC integriert werden (links). Außerdem kann die Disulfidbrücke in der α_2 -Domäne der MHC I-HC durch die fehlende Interaktion von NeTT mit ERp57 nicht in einem oxidierten Zustand gehalten werden. Die Disulfidbrücke wird reduziert, wodurch die MHC I Moleküle instabil bleiben und nicht mit Peptiden beladen werden können.

6.3 NeTT inhibiert Tapasin im MHC I Antigen Präsentationsweg

In NeTT exprimierenden Tpn-defizienten Zellen konnte weder eine Stabilisierung der HLA-B*44:02 Moleküle beobachtet werden noch wurde ihre Oberflächenexpression unterstützt. HLA-B*44:02 Allele müssen, um als MHC I-HC/ β_2 m-Heterodimer stabilisiert zu werden, über Tpn in den PLC integriert werden. Erst nachdem ein Peptid bindet, erlangt die Bindegrube eine andere Konformation und das Molekül ist auch ohne die Interaktion mit Tpn stabil (Sieker et al., 2008). Die vollständige Faltung der MHC I Moleküle erfolgt erst nach Assemblierung mit dem PLC. An der Ausbildung der Disulfidbrücke (Cys101-Cys164) in der α_2 -Domäne des MHC I Moleküls sind Tpn und ERp57 als Heterodimer beteiligt (Dick et al., 2002; Peaper und Cresswell 2008).

Dadurch wird die Bindegrube so lange in einem aufnahmebereiten Zustand gehalten bis ein gut passendes Peptid gebunden hat. Das Tpn-ERp57 Heterodimer beschützt den ‚oxidierten‘ Status der Bindegrube. Die Tpn-Cys95-Mutante kann den Redox-Status der HLA-B*44:02 Moleküle nicht bewahren und die Disulfidbrücke in der α_2 Domäne wird reduziert (Peaper und Cresswell 2008). NeTT scheint ebenfalls dieser Aufgabe nicht nachkommen zu können. Infolge der sehr schwachen Interaktion mit dem MHC I Molekül und der fehlenden Interaktion mit ERp57 kann angenommen werden, dass durch NeTT kaum MHC I Moleküle in den PLC rekrutiert werden. Die Disulfidbrücke in der Bindegrube wird nicht vor Reduktion geschützt und die MHC I Moleküle werden weder als Dimere stabilisiert noch findet eine Optimierung der Peptid-Bindung statt.

Wird NeTT anstelle von Tpn exprimiert, kann die Oberflächenexpression des HLA-B*44:02 Allels in .220-Zellen nicht wiederhergestellt werden. Interessanterweise konnte eine um 50% reduzierte HLA-B*44:02 Stabilität und Expression auch in HeLa-Zellen, die endogenes Tpn exprimierten, beobachtet werden. Aber auch wenn NeTT um ein Vielfaches stärker als endogenes Tpn exprimiert wurde, erreichte die Reduktion nie mehr als 50%. Dies entspricht der Vermutung, dass NeTT Tpn nicht vollständig von TAP verdrängen kann. Während NeTT auf der einen Seite des TAP-Komplexes die MHC I Beladung nicht unterstützt, verbleibt Tpn auf der anderen TAP-Seite funktionell. Diese Reduktion konnte allerdings nicht für HLA-B*44:05 Moleküle beobachtet werden. NeTT ist folglich kein genereller Inhibitor der MHC I Antigen Präsentation.

Während der Anfertigung dieser Arbeit, wurde von einer anderen Forschungsgruppe Ergebnisse über das alternativ gespleißte Tpn Transkript publiziert (Belicha-Villanueva et al., 2010). Sie konnten keinen negativen Effekt von NeTT bei gleichzeitiger Expression von Tpn auf die MHC I Antigen Präsentation nachweisen. Dies lag am ehesten daran, dass sie nicht die Tpn-abhängigen MHC I Allele untersuchten (FACS-Analysen wurden mit den AK W6/32 und CR11-351 durchgeführt) und den Einfluss von NeTT in einem stabilen System analysierten. Auch in dieser Arbeit konnte bei stabil transfizierten Zellen kein negativer Einfluss durch NeTT auf die Zelloberflächenexpression von HLA-B*44:02 beobachtet werden. Deshalb wurde für weitere Analysen HeLa-Zellen, die mit dem HLA-B*44:02 Allel sowie Tpn oder NeTT transient ko-transfiziert wurden, verwendet. Dies ermöglichte nur neusynthetisierte Moleküle zu messen und damit die unmittelbare Wirkung von NeTT zu bestimmen. Es ist anzunehmen, dass bei stabil

transfizierten Zellen Tpn zum ZP der Messung den negativen Einfluss von NeTT auf die Peptidbeladung bereits ausgleichen konnte. D.h. NeTT verzögert und hemmt auch hier die Beladung. Da aber die von Tpn gut beladenen MHC I Moleküle sehr stabil sind und für einen langen Zeitraum an der Zelloberfläche verweilen, akkumulieren diese mit der Zeit an der Oberfläche und die Dichte der MHC I Moleküle auf der Plasmamembran erscheint völlig normal.

NeTT ist nicht in der Lage Tpn direkt zu hemmen. Trotzdem ist die MHC I Antigen Präsentation in Anwesenheit von NeTT eingeschränkt. Hierbei konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob NeTT entweder die MHC I Antigen Präsentation inhibiert, weil es mit Tpn um eine TAP-Bindestelle konkurriert und diese für Tpn nicht mehr zur Verfügung steht, oder ob NeTT direkt die Funktion des PLC beeinflusst, indem die Expression von NeTT das Peptid-Repertoire stark einschränkt (Beutler et al., 2013).

6.4 Die biologische Rolle von NeTT

Halenius und Kollegen beschrieben, dass MHC I Moleküle in HCMV-infizierten Fibroblasten länger Endo H sensitiv und damit länger im ER blieben, sodass der Transport zur Zelloberfläche verlangsamt war. Außerdem konnten sie eine reduzierte Interaktion zwischen MHC I Molekülen und dem PLC darstellen, die nicht auf reduzierte MHC I Mengen zurückzuführen und unabhängig von der HCMV vermittelten Unterdrückung der Tpn mRNA Transkription war. Der hierfür verantwortliche Mechanismus konnte bisher nicht gezeigt werden (Halenius et al., 2011).

Die in dieser Arbeit beschriebene NeTT-Expression könnte hingegen einen Erklärungsansatz für den beobachteten Phänotyp liefern. NeTT verhindert durch die Blockierung einer Tpn-Bindestelle an TAP die Integration von MHC I Molekülen in den PLC und deren Peptidbeladung (Beutler et al., 2013). Dadurch wird die MHC I Antigen Präsentation und die CTL Antwort zumindest zeitweise eingeschränkt.

Die Versuche NeTT als endogenes Protein zu detektieren, blieben bisher ohne Erfolg. Auf mRNA Ebene konnte umso mehr NeTT amplifiziert werden, je stärker Tpn durch die HCMV-Infektion herunter reguliert wurde. Möglicherweise reichten die NeTT mRNA Mengen trotzdem nicht aus, dass hinreichend viel NeTT Protein exprimiert wurde, um es im WB detektieren zu können. Vermutlich wurde aber auch nicht der

optimale ZP getroffen, an dem die NeTT Konzentration am höchsten war, insbesondere im Hinblick auf die relativ kurze Halbwertszeit von NeTT.

Sollten weitere Anstrengungen unternommen werden, endogenes NeTT darzustellen, müssen andere HCMV-Zielzellen oder Zellsysteme, die einen immunevasiven Vorteil durch eine verminderten Antigen Präsentation haben (z.B. Tumorzellen), in die Untersuchungen mit einbezogen werden.

Vielleicht muss NeTT auch gar nicht als Protein detektierbar sein. Denn speziell vor dem Hintergrund, dass HCMV die Antigen Präsentation auf so vielfältige Weisen beeinflusst, könnte es sein, dass die vorhandene NeTT Menge bereits ausreichend für eine erfolgreiche Immunevasion ist.

Literaturverzeichnis

- Abarca-Heidemann K., Friederichs S., Klamp T., Boehm U., Guethlein L.A., Ortman B., 2002
Regulation of the expression of mouse TAP-associated glycoprotein (tapasin) by cytokines. *Immunol. Lett.*, (83) 197-207
- Abele R., Tampé R., 2004
The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology*, (19) 216-224
- Ahn K., Gruhler A., Galocha B., Jones T.R., Wiertz E.J.H.J., Ploegh H.L., Peterson P.A., Yang Y., Früh K., 1997
The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity*, (6) 613-621
- Atalay R., Zimmermann A., Wagner M., Borst E., Benz C., Messerle M., Hengel H., 2002
Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fc-gamma receptor homologs. *Journal of Virology (JVI)*, (76) 8596-608
- Bangia N., Lehner P.J., Hughes E.A., Surman M., Cresswell P., 1999
The N-terminal region of Tapasin is required to stabilize the MHC class I loading complex. *European Journal of Immunology (EJI)*, (29) 1858-1870
- Bangia N., Cresswell P., 2005
Stoichiometric Tapasin interactions in the catalysis of major histocompatibility complex class I molecule assembly. *Journal of Immunology (JI)*, (114) 346-353
- Barnden M.J., Ourcell A.W., Groman J.J., McCluskey J., 2000
Tapasin-mediated retention and optimization of peptides ligands during the assembly of class I molecules. *Jl*, (165) 322-330
- Baron U., Gossen M., Bujard H., 1997
Tetracycline controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potentials. *Nucleic Acids Res.*, (25) 2723–2729

- Beismann-Driemeyer S., Tampé R., 2004
Function of the antigen transport complex TAP in cellular immunity. *Angew. Chem. int. ed Engl.*, (43) 4014-4031
- Belicha-Villanueva A., Golding M., McEvoy S., Sarvaiya N., Cresswell P., Gollnick S., Bangia N., 2010
Identification of an alternate splice form of tapasin in human melanoma. *Hum. Immunol.*, (71) 1018-1026
- Beutler N., Hauka S., Niepel A., Kowalewski D.J., Uhlmann J., Ghanem E., Erkelenz S., Wiek C., Hanenberg H., Schaal H., Stevanovic S., Springer S., Momburg F., Hengel H., Halenius A., 2013
A natural tapasin isoform lacking exon 3 modifies peptide loading complex function. *EJL*, (43) 1459-1469
- Britt W.J., Alford C.A., 1996
Cytomegalovirus. *Fields Virology* (3) 2493-2523
- Butaye P., Devriese L.A., Haesebrouck F., 2003
Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well know antibiotics on gram-positiv bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16 (2) 175-188
- Cabrera C.M., 2007
The double role of the ER chaperon Tapasin in peptide optimization of HLA class I molecules. *Review Immunol.*, (65) 487-493
- Chang S.C., Momburg F., Bhutani N., Goldberg A.L., 2005
The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (102) 17107-17112
- Chatterjee A., Harrison C.J., 2001
Cytomegaloviruses. *Encyclopedia of life Sciences*, 1-7
- 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., et al., 1990
Analysis of the protein-coding content of the sequences of human cytomegalovirus strain AD169. *Microbiol. and Immunol.*, (154) 125-169
- Chen M. and Bouvier M., 2007
Analysis of interaction in a Tapasin/class I complex provides a mechanism of peptide selection. *EMBO J.*, (26) 1681-1690

- Chivers P.T., Laboissiere M.C., Raines R.T., 1996
The CXXC Motif: imperatives for formation of native disulfide bonds in the cell. *EMBO J.*, (15) 2659-2667
- Cho S., Ryoo J., Jun Y., Ahn K., 2011
Receptor-mediated ER export of human MHC class I molecules is regulated by the C-terminal single amino acid. *Traffic*, (12) 42-55
- Cresswell P., 2000
Intracellular surveillance: controlling the assembly of MHC class I-Peptide complexes. *Traffic*, (1) 301-305
- Del Cid N., Jeffery E., Rizvi S.M., Staper E., Peters L.R., Brown W.C., Provoda C., Raghavan M., 2010
Modes of CRT Recruitment to the MHC class I assembly Pathway. *Journal of Biological Chemistry (JBC)*, 285 (7) 4520-35
- DeMars R., Rudersdorf R., Chang C., Petersen J., Strandtmann J., Korn N., Sidwell B., Orr H.T., 1985
Mutations that impair a post-transcriptional step in expression of HLA-A and -B antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (82) 8183-8187
- Dick T.P., Bangia N., Peaper D.R., Cresswell P., 2002
Disulfid bond isomerization and the assembly of the MHC class I peptide complex. *Immunity*, (16) 87-98
- Diedrich G., Bangia N., Pan M., Cresswell P., 2001
A role for calnexin in the assembly of the MHC class I loading complex in the endoplasmic reticulum. *Jl*, (166) 1703-09
- Donaldson J.G., Finazzi D., Klausner R.D., 1992
Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature*, (360) 350-52
- Dong G., Wearsch P.A., Peaper P.R., Cresswell P., Reinisch K.M., 2009
Insights into MHC Class I Peptide Loading from the Structure of the Tapasin-ERp57 Thiol Oxidoreductase Heterodimer. *Immunity*, (30) 21-32

Emmerich N.P., Nussbaum A.K., Stevanovic S., Priemer M., Toes R.E., Rammensee H.G., Schild H., 2000

The human 26S and 20S proteasomes generate overlapping but different sets of peptid fragments from a model protein substrate. *JBC*, (271) 21140-48

Franks L.M., Carbonell A.W., Hemmings V.J., Riddle P.N. 1976

Metastasizing tumours from serum-supplemented and serum-free lines from a C57BL mouse lung tumour. *Cancer Res.*, 36 (3) 1049-55

Fujiwara T., Oda K., Yokota S., Takatsuki A., Ikehara Y., 1988

Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *JBC*, 263 (34) 18545-52

Garbi N., Tan P., Diehl A.D., Chambers B.J., Ljunggren H.G., Momburg F., Hämmerling G.J., 2000

Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nature Immunol.*, (1) 234-238

Garbi N., Tiwari N., Momburg F., Hämmerling G.J., 2003

A major role for tapasin as a stabilizer of the TAP peptide transporter and consequences for MHC class I expression. *EJI*, (33) 264-273

Garbi N., Tanaka S., Momburg F., Hämmerling G.J., 2006

Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57. *Nature Immunol.*, (7) 93-102

Garstka M., Borchert B., Al-Balushi M., Parveen P.V.K., Kühl N., Majoul I., Duden R., Springer S., 2007

Peptide-receptive Major Histocompatibility Complex Class I Molecules cycle between ER and cis-Golgi in wild-type Lymphocytes. *JBC*, 282 (42) 30680-90

Ghanem E., Fritzsche S., Al-Balushi M., Hashem J., Ghuneim L., Thomer L., Kalbacher H., van Endert P., Wiertz E., Tampé R., Springer S., 2010

The Transporter associated with Antigen Processing is active in a post-ER compartment. *J. Cell Sci.*, (123) 4271-9

Gorbulev S., Abele R., Tampé R., 2001

Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (98) 3732-37

- Grande A.G.III, Golovina T.N., Hamilton S.E., Sriram V., Spies T., Brutkiewicz R.R., Harty J.T., Eisenlohr L.C., van Kaer L., 2000
Impaired assembly yet normal trafficking of MHC class I molecules in Tapasin mutant mice. *Immunity*, (13) 213-222
- Greenwood R., Shimizu Y., Sedhon G.S., DeMars R., 1994
Novel allele-specific, post-translational reduction in HLA class I surface expression in a mutant B cell line. *Jl*, (153) 5525-5536
- Halenius A., Momburg F., Reinhard H., Bauer D., Lobigs M., Hengel H., 2006
Physical and functional interactions of the cytomegalovirus US6 glycoprotein with the transporter associated with antigen processing. *JBC*, (281) 5383-5390
- Halenius A., Hauka S., Dölken L., Stindt J., Reinhard H., Wiek C., Hanenberg H., Koszinowski U.H., Momburg F., Hengel H., 2011
Human Cytomegalovirus Disrupts the MHC Class I Peptide Loading Complex (PLC) and Inhibits Tapasin Gene Transcription. *JVI*, 85(7) 3473-85
- Hengel H., Koopmann J.O., Flohr T., Muranyi W., Goulmy E., Hämmerling G.J., Koszinowski U.H., Momburg F., 1997
A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity*, (6) 470-476
- Herberg J.A., Sgouros J., Jones T., Copeman J., Humphray S.J., Sheer D., Cresswell P., Beck S., Trowsdale J., 1998
Genomic analysis of the Tapasin gene, located close to the TAP loci in the MHC. *EJI*, (28) 459-467
- Herold und Mitarbeiter, 2009
Innere Medizin, erste Auflage, *Herold Verlag*, 58
- Hulpke S., Baldauf C., Tampé R., 2012
Molecular architecture of the MHC I peptide-loading complex: one tapasin molecule is essential and sufficient für antigen processing. *FASEB J.*, (26) 1-10
- Jenkins C., Abendroth A., Slobedman B., 2004
A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection. *JVI*, 78 (3) 1440-7
- Jones T.R., Sun L., 1997
Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chain. *JVI*, (71) 2970-2979

- Kienast A., Preuss M., Winkler M., Dick T.P., 2007
Redox regulation of peptide receptivity of major histocompatibility complex class I molecules by ERp57 and Tapasin. *Nature Immunol.*, (8) 864-872
- Kisselev A.F., Akopian T.N., Woo K.M., Goldberg A.L., 1999
The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *JBC*, (274) 3363-3371
- Klar D., Hämmerling G.J., 1989
Induktion of assembly of MHC class I heavy chains with β_2 microglobulin by interferon γ . *EMBO J.*, (8) 475-481
- Koch J., Guntrum R., Heintke S., Kyritsis C., Tampé R., 2003
Functional dissection of the transmembrane domains of the transporter associated with antigen processing (TAP). *JBC*, 279 (11) 10142-7
- Kotenko S.V., Sacconi S., Izotova L.S., Mirochnitchenko O.V., Pestka S., 2000
Human cytomegalovirus harbors its own unique I α -10 homolog (cmvIL-10). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 (4) 1695-700
- Lehner P.J., Surman M.J., Cresswell P., 1998
Soluble Tapasin restores MHC class I Expression and function in the tapasin-negative cell line.220. *Immunity*, (8) 221-231
- Lehner P.J., Karttunen J.T., Wilkinson G.W., Cresswell P., 1997
The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (94) 6904-6909
- Leonhardt R.M., Keusekotten K., Bekpen C., Knittler M.R., 2005
Critical role for the Tapasin docking site of TAP 2 in the functional integrity of the MHC class I-peptide-loading complex. *Jl*, (175) 5104-5114
- Lindquist J.A., Jensen O.N., Mann M., Hämmerling G.J., 1998
ER-60, a chaperon with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *EMBO J.*, (17) 2186-2195
- Löffler und Pedrides, 1997
Biochemie und Pathobiochemie, 5.Auflage, Springer Verlag

- Ma W., Lehner P.J., Cresswell P., Pober J.S., Johnson D.R., 1997
Interferon-gamma rapidly increases peptide transporter (TAP) subunits expression and peptide transport capacity in endothelial cell. *JBC*, (272) 16585-16590
- Meyer T. H., van Endert P. M., Uebel S., Ehring B., Tampé R., 1994
Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells. *FEBS Lett*, (351) 443-447
- Momburg F., Tan P., 2002
Tapasin- the keystone of the loading complex optimizing peptide binding by MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Mol. Immunol.*, (39) 217-233
- Nakamura N., Rabouille C., Watson R., Nilsson T., Hui N., Slusarewicz P., Kreis T.E., Warren G, 1995
Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J. Cell Biol.*, (131) 1715-26
- Ortmann B., Copeman J., Lehner P.J., Sadasivan B., Herberg J.A., Grandea A.G., Riddell S.R., Tampé R., Spies T., Trowsdale J., Cresswell P., 1997
A Critical Role for Tapasin in the Assembly and Function of Multimeric MHC Class I- TAP Complex. *Science*, (277) 1306-1309
- Pamer E., Cresswell P., 1998
Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.*, (16) 323-358
- Panter M.S., Jain A., Leonhardt R.M., Ha T., Cresswell P., 2012
Dynamics of Major Histocompatibility Complex Class I Association with the Human Peptide-loading Complex. *JBC*, (287) 31172-84
- Parham P., Barnstable C.J., Bodmer W.F., 1979
Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A, B, C, antigens. *Jl*, 123 (1) 342-349
- Park B., Kim Y., Shin J., Lee S., Cho K., Früh K., Lee S., Ahn K., 2004
Human cytomegalovirus inhibits tapasin-dependent peptide loading and optimization of the MHC class I peptide cargo for immune evasion. *Immunity*, (20) 71-85

- Parvelka M., Roth J., 2005
Funktionelle Ultrastruktur: Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben, Springer Verlag, 66-76
- Paulsson K.M., Kleijmeer M.J., Griffith J., Jevon M., Chen S., Anderson P.O., Sjogren H.O., Li S., Wang P., 2002
Association of tapasin and COP I provide a mechanism of the retrograde transport of MHC class I molecules from the Golgi complex to the endoplasmatic Reticulum. *JBC*, (277) 18266-18271
- Peaper D.R., Cresswell P., 2008
Regulation of MHC MHC I assembly and Peptide Binding. *Annu. Rev. Cell₂ Dev. Biol.*, (24) 343-369
- Peaper D.R., Wearsch P.A., Cresswell P., 2005
Tapasin and ERp57 form a stable disulfide-linked dimer within the MHC class I peptide-loading complex. *EMBO J.*, (24) 3613-3623
- Peterson J.R., Ora A., Van P.N., Helenius A., 1995
Transient lektin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. *Mol. Biol. Cell*, (6) 1173-1184
- Polic B., Hengel H., Krmpotic A., Trogovcich J., Pavic I., Luccaronin P., Jonjic S., Koszinowski U.H., 1998
Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J. Exp. Med.*, 188 (6) 1047-54
- Praveen P.V.K., Yaneva R., Kalbacher H., Springer S., 2010
Tapasin edits peptides on MHC class I molecules by accelerating peptide exchange. *Jl*, (40) 214-224
- Purcell A.W., Gorman J.J., Gracia-Peydro M., Paradela A., Burrows S.R., Talbo G.H., Laham N., Peh C.A., Reynolds E.C., Lopez de Castro J.A., Mc Cluskey J., 2001
Quantitative and qualitative influences of Tapasin on the class I peptide repertoire. *Jl*, (166) 1016-1027
- Raghuraman G., Lapinski P.E., Raghavan M., 2002
Tapasin interacts with the membrane- spanning domains of both TAP subunits and enhances the structural stability of TAP 1 x TAP 2 complexes. *JBC*, (277) 41786-94

- Rajagopalan S., Brenner M.B., 1994
Calnexin retains unassembled major histocompatibility complex heavy chain in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.*, (180) 407-412
- Rock K.L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D., Goldberg A.L., 1994
Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, (78) 761-771
- Roder G., Geirons L., Rasmussen M., Harndahl M., Buus S., Paulsson K., 2011
Tapasin discriminates peptide-human leukocyte antigen-A*02:01 complexes formed with natural ligands. *JBC*, (286) 20547-57
- Rufer E., Leonhardt R.M., Knittler M.R., 2007
Molecular architecture of the TAP-associated MHC class I peptide-loading complex. *Jl*, (179) 5717-27
- Sadasivan B., Lehner P.J., Ortmann B., Spies T., 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
- Saric T., Chang S.C., Hattori A., York I.A., Markant S., Rock K.L., Tsujimoto M., Goldberg A.L., 2002
An IFN-gamma induced aminopeptidase in the ER, ERAP1 trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nature Immunol.*, (3) 1169-1176
- Schmidt und Thews, 1997
Physiologie des Menschen, 27. Auflage, *Springer Verlag*, 435-443
- Schoenhals G.J., Krishna R.M., Grandea A.G.III, Soies T., Peterson P.A., Yang Y., Früh K., 1999
Retention of empty MHC class I molecules by Tapasin is essential to reconstitute antigen presentation in invertebrate cells. *EMBO J.*, (18) 743-753
- Serwold T., Gonzalez F., Kim J., Jacob R., Shastri N., 2002
ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature Immunol.*, (419) 480-483

- Sieker F, Straatsma T.P., Springer S., Zacharias M., 2008
Differential tapasin dependence of MHC class I molecules correlates with conformational changes upon peptide dissociation: A molecular dynamics simulation study. *Mol. Immunol.*, (45) 3714-22
- Siever C.S., Kaiser C.A., 2002
Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, (3) 836-847
- Simone L. C., Georgesen C. J., Simone P. D., Wang X., Solheim J.C., 2012
Productive association between MHC class I and tapasin requires the tapasin transmembrane/cytosolic region and the tapasin C-terminal Ig-like domain. *Mol. Immunol.*, (49) 628–639
- Sousa M.C., Ferrero-Gracia M.A., Parodi A.J., 1992
Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc: glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry*, (31) 97-105
- Stam N.J., Spits H., Ploegh H.L., 1986
Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus H-chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products. *Jl*, (137) 2299-2306
- Stern-Ginossar N., Weisburd B., Michalski A., Le V.T., Hein M.Y., Huang S.X., Ma M., Shen B., Qian S.B., Hengel H., Mann M., Ingolia N.T., Weissman J.S., 2012
Decoding human Cytomegalovirus. *Science*, 338 (6110) 1088-93
- Tahara T., Yang S. Y., Khan R., Abish S., Hämmerling G.J., Hämmerling U., 1990.
HLA antibody responses in HLA class I transgenic mice. *Immunogenetics*, (32) 351-360
- Tan P., Kropshofer H., Mandelboim O., Bulduc N., Hämmerling G.J., Momburg F., 2002.
Recruitment of MHC class I molecules by Tapasin into the transporter associated with antigen processing –associated complex is essential for optimal peptide loading. *Jl*, (168) 1950-1960
- Tector M., Zhang Q., Sakter R.D., 1997
Beta 2-microglobulin and calnexin can independently promote disulfid bond formation in class I histocompatibility proteins. *Mol. Immunol.*, (34) 401-408

- Turnquist H.R., Petersen J.L., Vargas S.E., McIlhane M.M., Bedows E., Mayer W.E., Granda A.G.III, van Kaer L., Solheim J.C., 2004
The Ig-like domain of tapasin influences intermolecular interactions. *Jl*, (172) 2976-2984
- Triezenberg S.J., Kingsbury R.C., McKnight S.L., 1988
Functional dissection of VP16, the transactivator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Devel.*, (2) 718-729
- Trombetta S.E., Bosch M., Parodi A.J., 1989
Glycosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal, and trypanosomatid protozoa microsomal membranes. *Biochemistry*, (28) 8108-8116
- Van Endert P.M., Tampé R., Meyer T.H., Tisch R., Bach J.F., McDevitt H.O., 1994
A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity*, (1) 491-500
- Vigneron N., Pepaer D.R., Leonhardt R.M., Cresswell P., 2009
Functional significance of Tapasin membrane association and disulfide linkage to ERp57 in MHC class I presentation. *Jl*, (39) 2371-2376
- Warburton R.J., Matsui M., Rowland-Jones S.L., Gammon M.C., Katzenstein G.E., Wei T., Edidin M., Zweerink H.J., McMichael A.J., Frelinger J.A., 1994
Mutation of the $\alpha 2$ domain disulfide bridge of the class I molecule HLA-A*0201: effect on maturation and peptide presentation. *Hum. Immunol.*, (39) 261-271
- Walker K.W., Gilbert H.F., 1997
Scanning and escape during protein-disulfid isomerase-assisted protein folding. *JBC*, (272) 8845-8848
- Wearsch P.A., Jakob C.A., Vallin A., Dwek R.A., Rudd P.M., Cresswell P., 2004
Major histocompatibility complex class I molecules expressed with monoglycosylated N-linked glycans bind calreticulin independently of their assembly status. *JBC*, (279) 25112-25121
- Wearsch P.A., Cresswell P., 2007
Selective loading of high-affinity Peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the Tapasin-ERp57 heterodimer. *Nature Immunol.*, 8 (8) 873-81

- Wiertz E.J., Jones T.R., Sun L., Bogyo M., Geuze H.J., Ploegh H.L., 1996
The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell*, (84) 769-779
- Williams A.P., Peh C.A., Purcell A.W., McCluskey J., Elliott T., 2002
Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on Tapasin. *Immunity*, (16) 509-520
- Wright C.A., Kozik P., Zacharias M., Springer S., 2004
Tapasin and other chaperons: models of the MHC class I loading complex. *JBC*, (385) 763-778
- Zernich D., Purcell A.W., McDonald W.A., Kjer-Nielsen L., Ely L.K., Laham N., Crockford T., Mifsud N.A., Bharadwaj M., Chang L., Tait B.D., Holdsworth R., Brooks A.G., Bottomley S.P., Beddoe T., Peh C.A., Rossjohn J., McCluskey J., 2004
Natural HLA class I polymorphism controls the pathway of antigen presentation and susceptibility to viral evasion. *J. Exp. Med.*, 200 (1) 13-24
- Zhang Y., Kozlov G., Pocanschi C.L., Brockmeier U., Ireland B.S., Maattanen P., Howe C., Elliott T., Gehring K., Williams D.B., 2009
ERp57 does not require interactions with calnexin and calreticulin to promote assembly of class I histocompatibility molecules and it enhances peptide loading independently of the redox activity. *JBC*, (284) 10160-10173
- Zarling A.L., Luckey C.J., Marto J.A., White F.M., Brame C.J., Evans A.M., Lehner P.J., Cresswell P., Shabanowitz J., Hunt D.F., Engelhard V.H., 2003
Tapasin is a facilitator, not an editor, of class I MHC peptide binding. *Jl*, (171) 5287-5295

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an:

Prof. Hartmut Hengel: Danke, dass du mir die Möglichkeit gegeben und mich ermutigt hast erste Erfahrungen in der Grundlagenforschung zu sammeln. Es war eine sehr gute Entscheidung!

Dr. Anne Halenius: Danke Sal, dass du vor allem vor Vorträgen und beim Anfertigen dieser Arbeit so viele Stunden mit mir und NeTT verbracht hast. Du hast mich durch viele aufregende Momente und neue Erfahrungen begleitet und mich zu ungeahnten Leistungen gebracht. Ich hatte immer das Gefühl (auch außerhalb des Labors) von dir unterstützt zu werden.

Alexandra Niepel: Alexa, ohne dich und deinen (vor allem emotionalen) Beistand und deine Ausgeglichenheit wäre vieles nicht möglich gewesen, du hast die Laborzeit zu etwas Besonderem gemacht. Danke!

Dr. Henrike Reinhard: Henri, danke fürs Korrekturlesen! Außerdem danke für die ‚after-lab-Laufeinheiten‘ und die schönen Stunden in Hamburg, sowie dein immer offenes Ohr!

Flo, Birke und Anna: Danke für eure Geduld und eure Aufmunterungen während der gesamten Zeit. Danke für eure Freundschaft!

Danke an die Leute aus dem Labor (vor allem Albert und Sebastian) und für die ‚NeTTe‘ Atmosphäre.

Danke an das Graduiertenkolleg Duisburg/Essen für die finanzielle Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

14.01.2014, Nele Beutler

Unterschrift