

**Charakterisierung des molekularen Mechanismus
der Stabilisierung des Peptidtransporters TAP durch
das ER-Glykoprotein Tapasin**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Martina Papadopoulos
aus Esslingen/Neckar

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Martina Papadopoulos
aus Esslingen/Neckar

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Charakterisierung des molekularen Mechanismus der Stabilisierung des Peptidtransporters TAP durch das ER-Glykoprotein Tapasin

Gutachter: Prof. Dr. Günter J. Hämmerling
PD Dr. Harald Kropshofer

Abkürzungsverzeichnis

β_2m	β_2 -Mikroglobulin
ΔC	Carboxyterminale Verkürzung
ΔN	Aminoternale Verkürzung
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	Immunoglobulin-Bindungsprotein
BSA	Rinderserumalbumin
BZR	B-Zellrezeptor
$CaCl_2$	Calciumchlorid
cDNA	Komplementäre DNA
CDR	Komplementaritätsbestimmende Region
CLIP	<i>Class-II-associated invariant-chain peptide</i>
CNX	Calnexin
CP	Verbindungspeptid
cpm	<i>Counts per minute</i>
CRT	Calretikulin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl) tetra-essigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERp57	Endoplasmatisches Retikulum Protein mit einem Molekulargewicht von 57 kDa
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FCS	Fötales Kälberserum
h	Human-
H-2	MHC der Maus
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure-Natriumsalz
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
LPS	Lipopolysaccharid
m	Maus-, Murin-
M	Molar (mol/Liter)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MgCl_2	Magnesiumchlorid
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
NaCl	Natriumchlorid
NaN_3	Natriumazid
NaOH	Natronlauge
$\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	Natriumbisulfid
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
r	Ratten-
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAP	<i>Transporter associated with Antigen Processing</i>
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethyldiamin
T_H	T-Helferzelle
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TM	Transmembranhelix
TMD	Transmembrandomäne
Tpn	Tapasin (<i>TAP-associated glycoprotein</i>)
Tpn-R-Protein	Tpn-verwandtes-Protein
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TZR	T-Zellrezeptor
Upm	Umdrehung pro Minute

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	1
II. Summary	3
III. Einleitung	5
1. Das Immunsystem	5
2. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)	10
3. Antigenprozessierung und -präsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle	12
3.1 Komponenten des MHC-Klasse-I-Weges	12
3.1.1 Das MHC-Klasse-I-Molekül	12
3.1.1.1 Struktureller Aufbau	12
3.1.1.2 Peptidbindungsgrube	12
3.1.2 Der Peptidtransporter TAP	14
3.1.3 Das Immunoglobulin-Bindungsprotein (BiP)	17
3.1.4 Tapasin	17
3.1.5 Calnexin und Calretikulin	21
3.1.6 ERp57	24
3.2 Antigenprozessierung im Zytosol	25
3.2.1 Das Proteasom	26
3.2.2 Zytosolische Peptidasen	28
3.3 Peptidtransport ins ER	29
3.4 Assemblierung des Peptidbeladungskomplexes und Optimierung der Peptidbeladung im ER	34
3.5 Peptidbindung an MHC-Klasse-I-Moleküle	36
3.6 Export und Rezeptorbindung an MHC-Klasse-I-Moleküle	39
4. Zielsetzung	40
IV. Material und Methoden	43
1. Material	43
1.1 Geräte	43
1.2 Verbrauchsmaterialien	44
1.3 Chemikalien	44
1.4 DNA	46
1.4.1 Vektor	46
1.4.2 cDNA	46
1.4.2.1 Ratten (r)-TAP-cDNAs	47

1.4.2.2 Murine (m) TAP-cDNAs	47
1.4.2.3 humane (h) Tpn-cDNAs	48
1.4.2.4 mTpn-cDNAs	48
1.4.2.5 Primer-Liste	50
1.5 Proteine	52
1.5.1 Enzyme	52
1.5.2 Antikörper	53
1.5.2.1 Primärantikörper	53
1.5.2.2 Sekundärantikörper	54
1.5.3 Peptid	54
1.6 Bakterienstamm	54
1.7 Kits	54
1.8 Puffer und Lösungen	55
1.8.1 Molekularbiologie	55
1.8.1.1 DNA-Gelelektrophorese	55
1.8.1.2 Restriktionsverdau	55
1.8.1.3 Medium für Bakterien	55
1.8.2 Zellbiologie	55
1.8.2.1 Zellkultur	55
1.8.2.2 FACS-Färbungen	56
1.8.3 Proteinchemie	56
1.8.3.1 Allgemeine Puffer	56
1.8.3.2 Proteingele	57
1.8.3.3 Western Blotting	57
1.8.3.4 Peptidtranslokationsuntersuchung	58
1.9 Zelllinien	59
2. Methoden	60
2.1 Molekularbiologische Methoden	60
2.1.1 Restriktionsverdau und Erzeugung von glatten Enden der Plasmid-DNA	60
2.1.2 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	60
2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	61
2.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten und Transformation von Bakterien	61
2.1.5 Plasmidisolierung	62
2.1.5.1 Mini-Präparation	62
2.1.5.2 Maxi-Präparation	63
2.1.6 Bestimmung der DNA-Konzentration	63
2.1.7 PCR	63
2.1.8 DNA-Sequenzierung und Ethanolfällung der DNA	64
2.2 Zellbiologische Methoden	64

2.2.1 Zellkultur	64
2.2.1.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen	64
2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	64
2.2.1.3 Zellzahlbestimmung	64
2.2.1.4 Transfektion eukaryontischer Suspensionszellen mittels Elektroporation	65
2.2.1.5 Transfektion eukaryontischer und adhärenter Zellen mit Lipofektamine™ 2000	65
2.2.1.6 Lyse von Zellen	66
2.2.2 FACS-Analyse	66
2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie	67
2.3 Proteinchemische Methoden	67
2.3.1 Bestimmung der Endoglykosidase H-Resistenz von Proteinen	67
2.3.2 Western Blot	67
2.3.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	67
2.3.2.2 Semi-dry Blotting von Proteinen	68
2.3.2.3 Immun-Blotting	69
2.3.3 Peptidjodierung und Peptidtranslokationsuntersuchung	69
V. Ergebnisse	71
1. Vergleich der TAP1- und TAP2-Abhängigkeit von Tpn bezüglich einer stabilen Expression	71
1.1 Generierung von TAP1- und TAP2-Deletionsmutanten	71
1.2 Expression der EGFP-markierten TAP1- und TAP2-Untereinheiten in Tpn-defizienten und TAP1-defizienten Zellen	72
1.2.1 TAP- und Tpn-Expression in Tpn-defizienten und TAP1- defizienten Zellen	72
1.2.2 TAP1/2-EGFP-Expression und MHC-Klasse-I-Expression in MCB6TAP1 ^{-/-} -Zellen	73
1.3 Expression der TAP1- und TAP2-Deletionsmutanten in Tpn- defizienten MC4- und MCB6TAP1 ^{-/-} -Zellen	75
1.4 Western Blot-Analyse der TAP2- und ΔN-TAP2-Expression in Tpn-kompetenten MCB6TAP1 ^{-/-} -Zellen	77
1.5 Peptidtransport des Kern-TAP-Komplexes	78
2. Analyse des molekularen Mechanismus der TAP-Stabilisierung durch Tpn	79
2.1 Vergleich von Tpn-Sequenzen verschiedener Spezies	79
2.2 Generierung von mTpn-Chimären und m/hTpn-Mutanten	81

2.3 Analyse von Einzel- und Doppel-Mutationen in der TMD bzw. im CP von mTpn	82
2.4 Zelluläre Lokalisation von mTpn-Y439A/W440L	84
2.5 Die Rolle des sauren Motivs im CP des Tpn-Moleküls und weiterer Aminosäurereste in der Tpn-TMD bei der TAP2-Stabilisierung	85
2.6 Der Einfluss einer verkürzten mTpn-TMD und von TMDs aus heterologen Tpn-Molekülen	88
2.7 Der Einfluss von multiplen Mutationen in der TMD von mTpn auf die TAP2-Stabilisierung	90
2.8 MHC-Klasse-I-Induktion durch mTpn-Mutanten	93
2.9 Punktmutationen in der TMD von hTpn	95
VI. Diskussion	97
1. Die TAP2-Stabilisierung ist von TAP1 und Tpn abhängig	97
2. Die Tpn-vermittelte TAP-Stabilisierung	99
2.1 Die Rolle ausgewählter Aminosäuren in der TMD bzw. im CP von Tpn bei der TAP2-Stabilisierung	99
2.2 Das saure Motiv im CP von Tpn ist nicht ausreichend für die TAP2-Stabilisierung	102
2.3 Ein räumliches Motiv in der TMD von Tpn ist zusammen mit der Aminosäure E414 im CP an der TAP2-Stabilisierung beteiligt	103
2.4 Induktion der MHC-Klasse-I-Expression durch mTpn-Mutanten	105
VII. Literaturverzeichnis	107
VIII. Danksagung	126

I. Zusammenfassung

Haupthistokompatibilitäts-(MHC)Klasse-I-Moleküle präsentieren den CD8⁺-T-Lymphozyten intrazellulär prozessierte Antigene. Die Präsentation ist durch eine Vielzahl an Hilfsproteinen einschließlich Tapasin (Tpn) und dem *Transporter associated with Antigen Processing* (TAP), der aus den nicht kovalent verknüpften TAP1- und TAP2-Untereinheiten besteht, reguliert. Das ER-residente Glykoprotein Tpn hat eine duale Chaperonfunktion, indem es die Peptidfracht der MHC-Klasse-I-Moleküle innerhalb des TAP-assoziierten Peptidbeladungskomplex optimiert und unabhängig davon das Expressionsniveau von TAP reguliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stabilität der TAP-Untereinheiten in Anwesenheit und Abwesenheit von Tpn untersucht. Dazu wurden TAP1- und TAP2-Untereinheiten voller Länge und N-terminal verkürzte TAP1- und TAP2-Untereinheiten, die jeweils C-terminal mit EGFP markiert waren, entweder in TAP1/2-defizienten und Tpn^{-/-}-MC4-Zellen oder in Tpn-kompetenten MCB6TAP1^{-/-}-Zellen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die N-Domäne von TAP2 für die Tpn-vermittelte Stabilisierung des TAP1/TAP2-Heterodimers wichtig ist. TAP1 war in Abwesenheit von Tpn dagegen stabil. Die TAP2-Untereinheit war daher das geeignete Indikatormolekül, um den kaum verstandenen molekularen Mechanismus der Tpn-vermittelte TAP-Stabilisierung in Tpn-transfizierten MC4-Zellen detailliert zu untersuchen. Hierfür wurden einerseits in der Transmembrandomäne (TMD) und/oder im N-terminal angrenzenden Verbindungspeptid (CP) von Maus(m)-Tpn einzelne oder multiple konservierte Aminosäuren ausgetauscht und andererseits mTpn-TMD-Chimären hergestellt in denen die TMD von mTpn durch heterologe TMD ausgetauscht wurden. Zunächst stellte sich heraus, dass ausgewählte einzelne konservierte Aminosäuren in der TMD von mTpn keine signifikante Rolle bei der TAP-Stabilisierung spielen. Nur die Substitution eines hochkonservierten sauren Motivs (E414/D415) im CP reduzierte die TAP2-Stabilisierung drastisch. Allerdings funktionierte das saure Motiv nicht unabhängig von der Tpn-TMD. Durch weitere Mutationsanalysen konnte zum ersten Mal eine einzelne Aminosäure im CP identifiziert werden, die an der TAP-Stabilisierung beteiligt ist und zwar Glu in der Position 414. Die Ergebnisse des Austausches multipler Aminosäuren innerhalb der TMD zeigte, dass die TAP-Stabilisierungsfunktion von Tpn nicht durch einzelne, sondern durch ein räumliches Motiv an einer Flanke der membranquerenden Helix von Tpn bestehend aus den konservierten Aminosäuren F420, F424, G428, K431 und W435 ausgeübt wird. Der kombinierte Austausch von E414 im CP und des räumlichen Motivs erbrachte einen kompletten Verlust der Tpn-vermittelten TAP2-Stabilisierung und zeigte damit eine kooperative Wirkung dieser funktionsbestimmenden Aminosäuren auf. Die konservierten Aminosäuren des räumlichen Motivs befinden sich hauptsächlich im N-terminalen Teil der TMD von

Tpn und interagieren vermutlich mit einer oder mehreren Transmembranhelices innerhalb der N-Domänen von TAP. Dagegen interagiert die ER-luminal exponierte Aminosäure E414 möglicherweise mit einer basischen Aminosäure in einer ER-exponierten Schleife innerhalb der N-Domänen von TAP. Die beschriebenen konservierten Aminosäuren scheinen zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Tpn-Funktion zu sein, da sie sich nicht in die TMD von Calnexin transplantieren ließen. Der Sequenzkontext innerhalb der TMD von Tpn liefert vermutlich zusätzliche essentielle Informationen. In Anwesenheit von verschiedenen Tpn-Mutanten konnte gezeigt werden, dass bereits deutlich reduzierte TAP2-Mengen ausreichen, um die peptidtransportabhängige MHC-Klasse-I-Expression zu induzieren. Die MHC-Klasse-I-Induktion war in guter Korrelation mit der TAP2-Stabilisierung.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die konservierten Aminosäuren F420, F424, G428, K431 und W435, die ein räumliches Motiv innerhalb der TMD bilden, und die saure Aminosäure E414 im CP für die Tpn-vermittelte Stabilisierung von TAP2 notwendig sind. Für die TAP1-Stabilisierung scheint Tpn keine entscheidende Rolle zu spielen.

II. Summary

Presentation of intracellular processed antigens by major histocompatibility (MHC) class I molecules to CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes is regulated by a variety of accessory proteins including Tapasin (Tpn) and the Transporter associated with antigen processing (TAP) composed of the non-covalently linked subunits TAP1 and TAP2. The ER-resident glycoprotein Tpn has a dual chaperone function as it optimizes the peptide cargo of class I molecules within the TAP-associated loading complex and independently stabilizes the steady state expression level of TAP.

In the present thesis the stability of the TAP subunits in the presence or absence of Tpn was analyzed. Full length and N-terminally truncated TAP1 and TAP2 EGFP-tagged subunits were expressed either in TAP1/2- and Tpn-deficient MC4 cells or in Tpn-competent MCB6TAP1^{-/-} cells. It could be shown that the N-domain of TAP2 is essential for the Tpn-mediated stabilization of the TAP1/TAP2 heterodimer while TAP1 is stable in the absence of Tpn. Therefore, the TAP2 subunit was utilized to explore in detail the poorly understood molecular mechanism of the Tpn-mediated TAP stabilization in Tpn-transfected MC4 cells. For this purpose single or multiple conserved amino acids in the transmembrane domain (TMD) and/or in the connecting peptide (CP) of mouse (m) Tpn, which locates adjacent to the Tpn TMD, were substituted on the one hand and mTpn TMD chimeras were generated in which the entire mTpn TMD was replaced by heterologous TMDs on the other hand. Initially it turned out that selected single conserved amino acids within the TMD of mTpn are not critical for the TAP stabilization. Only the substitution of the conserved acidic motif E414/D415 in the CP reduced the TAP2 stabilization dramatically. However, the acidic motif did not function independently of the Tpn TMD. Our mutational studies identified for the first time the single amino acid E414 in the CP as being crucial for the TAP stabilization. The results of exchanges from multiple amino acids within the TMD revealed that the TAP-stabilizing function of Tpn is exerted by a spatially arranged motif composed of the conserved amino acids F420, F424, G428, K431 and W435 which seem to function cooperatively with the amino acid E414 in the CP in order to stabilize the TAP2 protein. The conserved amino acids of the spatial motif reside mainly in the N-terminal portion of the TMD. These amino acids may interact with one or multiple transmembrane helices within the hydrophobic N-domains of TAP. In contrast, the ER-luminal exposed amino acid E414 may interact with a basic residue in an ER-exposed loop of the N-domains of TAP. However, the conserved amino acids appear to be necessary but not sufficient for Tpn function as we were unable to transfer the motif onto the unrelated TMD of calnexin. The sequence context of the TMD of Tpn presumably contributes essential additional information. It was shown that in the presence of different mTpn mutants clearly reduced amounts

of TAP2 were sufficient to induce the peptide transport-dependent induction of MHC class I molecules. Class I induction was in good correlation with TAP2 stabilization. In this thesis it is shown for the first time that the conserved amino acids F420, F424, G428, K431 and W435 which form a spatially arranged motif within the TMD and the acidic amino acid E414 in the CP is essential for the Tpn-mediated stabilization of TAP2. Tpn does not seem to play a crucial role for TAP1 stabilization.

III. Einleitung

1. Das Immunsystem

Im Laufe der Evolution hat sich das Immunsystem zu einem komplexen Abwehrsystem entwickelt. Es schützt den Organismus vor Infektionen durch Pathogene (Bakterien und Viren) und vor entarteten körpereigenen Zellen (Tumoren). Zur Abwehr von infektiösen Pathogenen werden einerseits unspezifische (angeborene Immunität) und andererseits spezifische (erworbene Immunität) Immunantworten ausgelöst. Beide Systeme arbeiten ergänzend zusammen und verfügen sowohl über humorale (antikörpervermittelte) als auch über zellvermittelte Komponenten (Übersicht in Janeway et al., 2002).

Die Eintrittsstellen für Krankheitserreger in Vertebraten sind vor allem die Haut (Insektenstiche, Wunden) und Schleimhäute des Atemepithels, des Verdauungstraktes und der Geschlechtsorgane. Das Immunsystem reagiert auf Pathogene, denen es gelungen ist, diese Barriere zu überwinden, innerhalb weniger Stunden mit unspezifischen Abwehrmechanismen. Diese auch als angeborene Immunantwort bezeichnete Reaktion umfasst die Erkennung von konservierten molekularen Strukturen, wie Kohlenhydrat- und Lipidgruppen, die von Mikroorganismen exprimiert werden. Zu solchen mustererkennenden Rezeptoren auf Monozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zählen z.B. TLRs (*Toll-like receptors*), die u.a. Lipopolysaccharide (LPSs), doppelsträngige RNA oder bakterielle DNA erkennen. Makrophagen können zahlreiche eingedrungene Pathogene durch ihre Rezeptoren erkennen und durch Phagozytose aufnehmen. Dadurch kommt es zu einer Entzündungsreaktion, die zu einer Akkumulation von Plasmaproteinen und phagozytischen neutrophilen Zellen an der Infektionsstelle führt. Außerdem werden NK-Zellen als Reaktion auf endogenes Interferon (IFN)- α - und - β -Produktion oder dem von aktivierten Makrophagen sezernierten Zytokin IL-12 aktiviert und wirken dadurch zytotoxisch. Zu den Plasmaproteinen gehören die Komponenten des Komplementsystems. Das Komplement wird direkt durch Krankheitserreger oder indirekt durch die an Pathogene gebundenen Antikörper aktiviert. Dies führt zu einer Kaskade von proteolytischen Reaktionen, die auf der Oberfläche von Krankheitserregern abläuft und aktive Komponenten mit verschiedenen Effektorfunktionen erzeugt. Die drei wichtigsten Folgen der Komplementaktivierung sind das Anlocken von Phagozyten, die Opsonisierung und Lyse von Pathogenen. Falls Erreger die angeborenen Abwehrmechanismen des Wirtes überwinden oder umgehen, ist eine spezifische, adaptive Immunantwort notwendig, die nur Vertebraten besitzen und ungefähr 4 Tage nach Infektion induziert wird. Die spezifische adaptive Immunantwort ist gekennzeichnet durch Produktion antigenspezifischer T- und B-Lymphozyten, durch somatische

Genumlagerung und die Fähigkeit zur Generierung langlebiger Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt eine schnellere und effizientere Immunantwort auslösen. B- und T-Zellen kommen in den sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz, darmassoziierte bzw. bronchienassoziierte lymphatische Gewebe) mit antigenpräsentierenden Zellen (APZ; dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten) in Kontakt.

Die Antigenerkennung durch B-Zellen erfolgt durch den B-Zellrezeptor (BZR). Der BZR ist ein membrangebundenes Immunglobulin(Ig)-Molekül und besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die über Disulfidbrücken verknüpft sind. Die leichten und schweren Ketten bestehen aus konstanten und variablen Regionen, die durch somatische Genumlagerung zusammengesetzt werden. Die Signaltransduktion erfolgt über den BZR-assoziierten $\text{Ig}\alpha$ - und $\text{Ig}\beta$ -Korezeptor. Die Spezifität eines Antikörpers wird durch drei hypervariable Bereiche (komplementaritätsbestimmende Regionen, CDRs) in den variablen Domänen bestimmt, die die Antikörperbindungsstelle bilden. Die Vielfalt des Repertoires an Immunglobulinen entsteht durch somatische Rekombination in der variablen Region von V- (*variable*), J- (*joining*) und D- (*diversity*)-Gensegmenten. Zusätzliche Vielfalt (kombinatorische Vielfalt) entsteht aus der zufälligen Rekombination von separaten V-, D- und J-Gensegmenten zu einer vollständigen variablen Region. Außerdem erhöht sich die Variabilität an den Verknüpfungsstellen zwischen den Segmenten durch den Einbau einer zufälligen Anzahl an P- und N-Nukleotiden und durch variables Entfernen von Nukleotiden an den Enden einer kodierenden Sequenz. Das Aneinanderlagern der verschiedenen variablen Regionen der leichten und schweren Kette bei der Bildung der Antigenbindungsstelle erhöht ebenfalls die Vielfalt. Nachdem ein Immunglobulin exprimiert worden ist, kommt es bei Stimulation der B-Zelle durch ein Antigen auch zur Modifikation durch somatische Hypermutation. Durch all diese Mechanismen entsteht aus einer begrenzten Zahl von Genen ein riesiges Repertoire an Rezeptorenspezifitäten (ungefähr 10^{11}).

T-Zellen erkennen über ihren T-Zellrezeptor (TZR) Antigene in Form von Proteinfragmenten, die von MHC-Molekülen (Haupthistokompatibilitätsmoleküle) auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Das TZR-Heterodimer besteht aus den Transmembranglykoproteinketten α und β , die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Der extrazelluläre Teil jeder Kette besteht aus zwei variablen und zwei konstanten Regionen, die ebenfalls durch somatische Genumlagerung zusammengesetzt werden. Die Antigenbindungsstelle wird durch drei hypervariable Bereiche (CDRs) in den variablen Domänen gebildet. Die Vielfalt der TZR-Spezifität (etwa 10^{11}) wird durch die gleichen Mechanismen, wie bereits bei dem BZR beschrieben, erzeugt. Jedoch findet in den V-Genen des TZR nach der Umlagerung keine somatische Hypermutation statt. Die Signaltransduktion wird durch den TZR-assoziierten CD3-Komplex vermittelt.

Um naive T-Zellen bzw. B-Zellen mit einem unterschiedlichen Repertoire an Antigenrezeptoren zu erzeugen, verlassen T-Zellen das Knochenmark und wandern in den Thymus, während B-Zellen im Knochenmark bleiben und sich dort entwickeln. Fehler bei der Genumlagerung führen zum Verlust von B- bzw. T-Zellen bevor ein Antigenrezeptor an der Oberfläche exprimiert wird. Unreife naive B-Zellen werden eliminiert, wenn sie einen Antigenrezeptor besitzen, der einen multivalenten Liganden erkennt. Diesen Vorgang nennt man klonale Deletion. Diese Zellen durchlaufen ein Rezeptor-Editing oder den programmierten Zelltod (Apoptose). Wenn sich unreife B-Zellen an lösliche Autoantigene binden, die den BZR quervernetzen können, werden sie anergisch und reagieren daher auf kein Antigen in der Peripherie. Wenn sie in der Peripherie mit anderen B-Zellen konkurrieren, gehen sie dort schnell verloren. Nur die unreifen naiven B-Zellen, die mit geringer Affinität an lösliches Autoantigen oder monovalente Antigene binden, empfangen bei dieser Wechselwirkung kein Signal. Sie reifen normal heran und exprimieren IgM und IgD auf der Zelloberfläche. Solche reifen B-Zellen sind potenziell autoreaktiv und werden als klonal ignorant eingestuft, da ihr Ligand zwar vorhanden ist, sie aber nicht aktivieren kann. Unreife naive B-Zellen, die in diesem frühen Stadium kein Antigen treffen, reifen normal heran. Sie wandern zur Peripherie und werden zu zirkulierenden reifen B-Zellen, die IgM und IgD exprimieren.

Die Mehrzahl der unreifen $CD4^+/CD8^+$ -doppelt positiven Thymozyten ist unfähig, Selbst-Peptid-Selbst-MHC-Moleküle zu erkennen, erhalten somit kein Überlebenssignal und sterben. Nur die Thymozyten überleben, die im Thymus-Kortex über ihren TZR Selbst-Peptid-Selbst-MHC-Moleküle auf thymischen Epithelzellen mit geringer Affinität binden. Diese positive Selektion führt dazu, dass sich die doppelt positiven Thymozyten in MHC-I-restringierte $CD8^+$ -T-Zellen oder MHC-II-restringierte $CD4^+$ -T-Zellen entwickeln und den Thymus als reife naive T-Zellen verlassen. Doppelt positive oder einzeln positive Thymozyten, deren TZRs eine zu hohe Affinität gegenüber Selbst-Peptid-Selbst-MHC-Molekülen aufweisen, sterben durch Apoptose. Durch diese negative Selektion, die in der thymischen Medulla durch dendritische Zellen, Makrophagen und medulläre thymische Epithelzellen stattfindet, werden potentiell autoreaktive T-Zellen eliminiert. Die reifen, einfach positiven naiven T-Zellen, die den Thymus verlassen haben, zirkulieren zwischen Blut und Lymphe. T-Zellen benötigen zwei Signale, um aktiviert zu werden. Durch Bindung des Peptid-MHC-Komplexes der APZ an den TZR und den $CD4^+/CD8^+$ -Korezeptor erhält die T-Zelle das erste Signal. Die Aktivierung der naiven T-Zelle erfordert ein kostimulierendes Signal von derselben APZ. Zu den kostimulierenden Molekülen seitens der APZ zählen B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Der Ligand für B7 ist CD28, das auf einer naiven T-Zelle exprimiert wird. Fehlt das kostimulierende Signal von der APZ gerät die T-Zelle in einen Zustand der Anergie, in dem sie auf eine Aktivierung durch ein Antigen nicht mehr reagiert. Auf diese Weise lösen körpereigene Antigene bei T-Zellen in der Peripherie eine Toleranz aus.

Die aktivierten reifen naiven T-Zellen unterstützen ihre Proliferation durch Sekretion von IL-2 und Expression eines hochaffinen IL-2-Rezeptors. Die Proliferation und Differenzierung von aktivierten CD8⁺-T-Zellen zu Effektorzellen wird durch das selbst sezernierte IL-2 gefördert. Begegnet diese zytotoxische T-Zelle einer Zielzelle mit einem Peptid-MHC-Klasse-I-Komplex, der von seinem TZR erkannt wird, so wird die Zielzelle durch Apoptose vernichtet. Dazu werden die in den Granula gespeicherten Proteine, Perforine und Granzyme (Serinproteasen), nach der Antigenerkennung freigesetzt. Perforin polymerisiert und bildet eine Pore in der Zielmembran. Durch diese Pore gelangen die Granzyme in das Zytoplasma der Zelle und lösen Apoptose aus. Ein anderer Mechanismus, um Apoptose einzuleiten, ist die Induzierung eines FAS-Liganden auf der infizierten Zielzelle und dem entsprechenden Rezeptor FAS auf der zytotoxischen T-Zelle. Die Bindung des FAS-Liganden und FAS genügt, um eine Caspasen-Kaskade zu aktivieren und dadurch den programmierten Zelltod herbeizuführen.

Die von CD8⁺-T-Zellen erkannten Antigene stammen von intrazellulären Pathogenen (Viren, intrazelluläre Bakterien) und entarteten körpereigenen Zellen (Tumoren), die im Zytosol durch einen multikatalytischen Proteasekomplex, dem Proteasom, proteolytisch degradiert werden. Die resultierenden Peptide werden durch den *Transporter associated with Antigen Processing* (TAP) in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert und binden dort an freie MHC-Klasse-I-Moleküle (Momburg und Hämmerling, 1998). Der Peptid-MHC-Klasse-I-Komplex wird über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert und anschließend den CD8⁺-T-Zellen präsentiert (Pamer und Cresswell, 1998).

Pathogene lösen bei Makrophagen oder dendritischen Zellen, die ihrerseits NK-Zellen dazu anregen können IFN- γ zu produzieren, die Sekretion von IL-12 aus. Aufgrund der Aktivierung der naiven CD4⁺-T-Zelle durch IL-12 und IFN- γ differenziert diese zu einer T-Helferzelle 1 (T_H1). IL-4 wird von NK-Zellen, aktivierten T_H2-Zellen und Mastzellen sezerniert und ist für die Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen zu T_H2-Zellen von Bedeutung. Das Töten der infizierten Zielzellen durch zytotoxische CD8⁺-T-Zellen und die Aktivierung von Makrophagen durch T_H1-Zellen bilden zusammen die zellvermittelte Immunität. Trifft eine T_H1-Zelle auf einen infizierten Makrophagen, so sezerniert sie IFN- γ und exprimiert den CD40-Liganden. Die IFN- γ -Sekretion und CD40-CD40L-Interaktion aktivieren den Makrophagen. Dieser aktivierte Makrophage steigert die Expression von CD40- und TNF-Rezeptoren und sezerniert TNF- α . Dieser autokrine Stimulus bewirkt zusammen mit dem von T_H1-Zellen sekretierten IFN- γ eine größere antimikrobielle Wirkung des Makrophagen. Hierzu gehören die Degradation von phagozytierten Pathogenen in Lysosomen und die Produktion von reaktiven Mediatoren wie Stickstoffoxid oder Sauerstoffradikalen. T_H1-Zellen sezernieren ebenfalls IL-2, was zu einer Proliferation von T-Zellen führt und die Freisetzung von weiteren Zytokinen verstärkt. IL-3 und GM-CSF stimulieren die Bildung neuer Makrophagen durch Einwirkung auf die Stammzellen im

Knochenmark, welche durch die Wirkung von $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{TNF-}\beta$ auf das Endothel an die Infektionsstelle gelockt werden. Ein Chemokin mit makrophagenanlockender Aktivität (MCP-1) lockt Makrophagen zur Infektionsstelle.

Die Aktivierung von B-Zellen durch $\text{T}_\text{H}2$ -Zellen bewirkt eine Bildung verschiedener Antikörper für die humorale Immunität und benötigt ebenfalls zwei Signale. Durch Quervernetzung des BZR erhält die B-Zelle das erste Signal. Bei thymusabhängigen Antigenen wird das zweite Signal von der $\text{T}_\text{H}2$ -Zelle vermittelt. Diese erkennt den Peptid-MHC-Klasse-II-Komplex auf den B-Zellen durch ihren TZR. Die Wechselwirkung zwischen dem CD40-Liganden auf der T-Zelle und dem CD40 auf der B-Zelle stellt das zweite Signal dar. Bei thymusunabhängigen Antigenen stammt das zweite Signal von dem Antigen selbst oder von akzessorischen Zellen außerhalb des Thymus. $\text{T}_\text{H}2$ -Zellen sezernieren die B-zellstimulierenden Zytokine IL-4, IL-5 und IL-6, die die Proliferation und Differenzierung der B-Zelle zur antikörperproduzierenden Plasmazelle fördern. Die Bindung von bakteriellen Toxinen durch IgG-Antikörper oder die Bindung von Viren durch IgG- und IgA-Antikörper bewirkt eine Neutralisierung und schützt die Zelle vor toxischen Wirkungen oder einer Infektion. Nach Aggregation von IgG-Antikörpern auf der Oberfläche eines Erregers können Fc-Rezeptoren quervernetzt werden (Opsonisierung). Dadurch werden Makrophagen aktiviert und die Erreger phagozytiert und zerstört. IgG-Antikörper, die eine Zielzelloberfläche bedecken, werden auch durch Fc-Rezeptoren auf NK-Zellen erkannt. Die Quervernetzung der Fc-Rezeptoren signalisiert der NK-Zelle die Zielzelle zu töten (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, ADCC). Außerdem aktivieren IgM- oder IgG-Antikörper das Komplementsystem durch Bindung an den Komplementfaktor C1q.

Die von CD4^+ -T-Zellen erkannten Antigene stammen von extrazellulären Bakterien oder Toxinen, die durch Endozytose aufgenommen und in Endosomen abgebaut werden. MHC-Klasse-II-Moleküle assoziieren zunächst im ER mit der invarianten Kette. Die invariante Kette blockiert die Bindung von Peptiden im ER sowie während des Transports der MHC-Klasse-II-Moleküle in Endosomen. In diesen späten Endosomen spalten Proteasen die invariante Kette so, dass das CLIP (*Class-II-associated invariant-chain peptide*)-Fragment am MHC-Klasse-II-Molekül gebunden bleibt. HLA-DM/HLA-2M bindet an den MHC-Klasse-II-CLIP-Komplex und katalysiert damit die Freigabe des CLIP-Fragments und die Bindung des Antigens (Brocke et al., 2002). Der Peptid-MHC-Klasse-II-Komplex wandert über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche und wird den CD4^+ -T-Zellen präsentiert.

Effektorzellen (B- und T-Zellen) haben nur eine begrenzte Lebensdauer. Wenn das Antigen eliminiert ist, differenziert ein Teil der klonal expandierten Zellen zu langlebigen Gedächtniszellen, die schnell auf einen erneuten Infekt reagieren können. Die restlichen Effektorzellen durchlaufen Apoptose.

2. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, *major histocompatibility complex*) ist ein großer, etwa 4×10^6 Basenpaare umfassender Genkomplex mit zahlreichen Loci. Seine Gene (ungefähr 200 beim Menschen) kodieren für zahlreiche in der Immunantwort, insbesondere der Prozessierung und Präsentation von Antigenen, beteiligten Proteine (Abb. III. 1).

Die im MHC kodierten Gene wurden schon früh als Ursache für Abstoßungsreaktionen gegen Hauttransplantate identifiziert. Die Empfänger stießen das übertragene Gewebe ab, das als fremd erkannt wurde. Spätere Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass eine Immunreaktion gegen das Transplantat eintritt, weil antigene Peptide zur Stimulation der T-Zellen des Empfängers führen. Die schnelle Abstoßung von Hauttransplantaten entsteht also durch Unterschiede in einer einzigen genetischen Region. Da diese Gene die Verträglichkeit (Kompatibilität) von Transplantaten bestimmen und die eng gekoppelten, polymorphen Gene die Histokompatibilität bestimmen, entstand die Bezeichnung Haupthistokompatibilitätskomplex.

Nur Wirbeltiere besitzen MHC-Moleküle. Der MHC kodiert für zwei Hauptklassen von peptidbindenden Membran-Molekülen: MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle, die in der MHC-I- bzw. MHC-II-Region kodiert sind. Zwischen diesen Regionen liegt die MHC-Klasse-III-Region mit einer Reihe von Genen, die u.a. für immunologisch relevante Proteine kodieren (Komplementkomponenten C2, C4 und Faktor B; TNF- α ; TNF- β), jedoch nicht direkt an der Antigenpräsentation beteiligt sind. Ein MHC-Klasse-I-Molekül besteht aus einer großen Untereinheit, der schweren α -Kette und einer kleinen Untereinheit, dem β_2 -Mikroglobulin (β_2m). In der polygenen MHC-Klasse-I-Region auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 sind beim Menschen die Gene der schweren α -Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls lokalisiert. Hier sind in drei Loci die klassischen, hoch polymorphen MHC-Moleküle HLA-A, -B, -C (*Human Leucocyte Antigens*) und weitere Gene für nicht polymorphe HLA-E, -F, -G und -H kodiert. Es wurden 250 HLA-A-, 490 HLA-B- und 119 HLA-C-Allele in der gesamten menschlichen Population identifiziert (Marsh et al., 2002). Der Genlocus der nicht polymorphen kleinen Untereinheit, β_2m , befindet sich auf dem menschlichen Chromosom 15. In der Maus werden die drei hoch polymorphen MHC-Klasse-I-Moleküle H-2D, H-2K und H-2L auf Chromosom 17 kodiert und weitere Gene für nicht polymorphe H2-Q, H2-T und H2-M. β_2m mit sieben Allelen wird auf Chromosom 2 kodiert. Alle kernhaltigen Zellen exprimieren MHC-Klasse-I-Moleküle.

Die Genstruktur eines MHC-Klasse-I-Schwerketten-Moleküls lässt sich folgendermaßen beschreiben (Goldsby et al., 2000): Ein einzelnes Exon am 5'-Ende kodiert das Signal-Peptid, welches die Translokation des MHC-Klasse-I-Moleküls in das Lumen des ER bewirkt. Das Signalpeptid wird nach beendeter Translation durch

proteolytische Enzyme im ER entfernt. Es folgen auf drei getrennten Exons die drei extrazellulären Domänen α_1 , α_2 , α_3 . Das nächste Exon kodiert die Transmembranregion des Proteins. Drei kleine Exons am 3'-Ende kodieren die zytoplasmatische Region.

In der polygenen MHC-Klasse-II-Region liegen die Gene für die α - und β -Ketten der MHC-Klasse-II-Moleküle. Dies sind HLA-DR, -DQ, -DP im menschlichen und H-2A und H-2E im murinen Genom. Diese Gene zeichnen sich ebenfalls durch einen hohen Polymorphismus mit bis zu 200 Allelen pro Locus aus. Die Gene des MHC-Klasse-II werden von APZs und epithelialen Zellen des Thymus exprimiert.

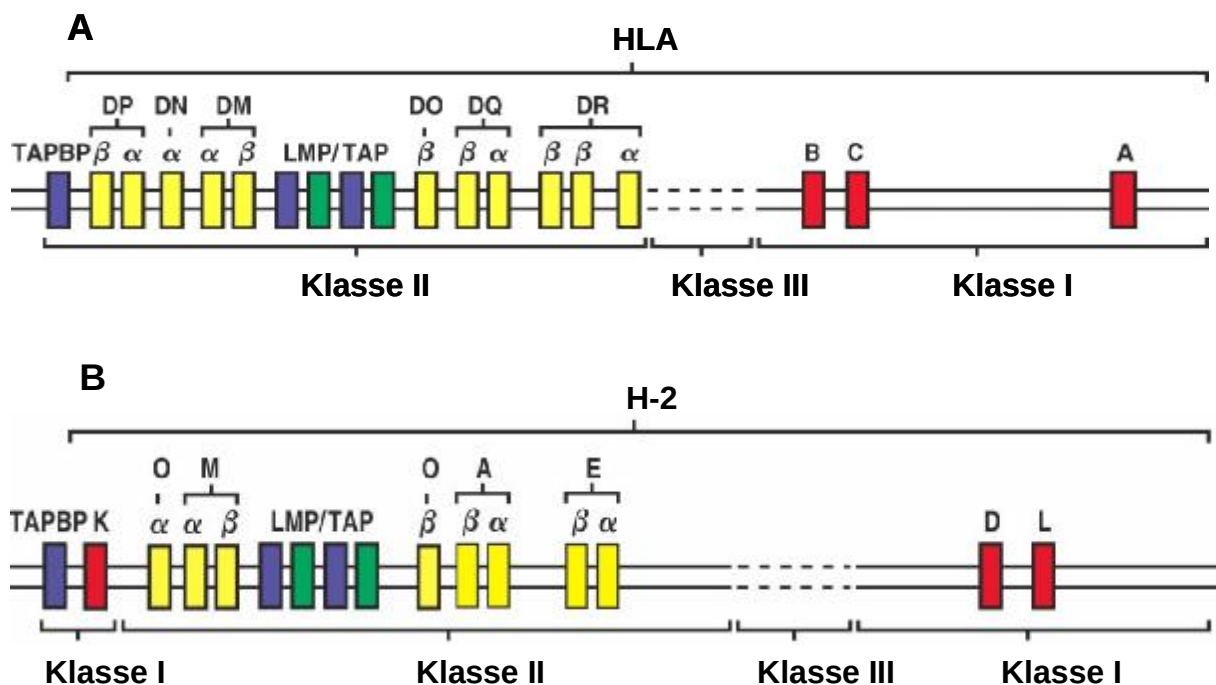


Abb. III. 1: Genkarte des humanen (A) und murinen (B) MHC (links ist die zentromerische, rechts die telomerische Seite)

A) Der humane MHC nimmt etwa 4 Mb auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 ein. Vom Zentromer zum Telomer sind hintereinander die MHC-II-, MHC-III- und MHC-I-Region angeordnet. In der MHC-I-Region des Menschen sind die Gene der klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle HLA-A bis HLA-F kodiert. In der MHC-II-Region sind sowohl die Gene für Proteine der MHC-Klasse-II-Antigenpräsentation (HLA-DR, -DQ, -DP, -DM, und -DO) als auch weitere wichtige Gene, die bei der Antigenpräsentation von MHC-Klasse-I-Molekülen eine Rolle spielen. Dazu zählen TAP1 und TAP2, Tapasin (TAPBR), LMP2 und LMP7 (Untereinheiten des Proteasoms). B) Der murine MHC-Komplex auf Chromosom 17. Die MHC-I-Region ist in zwei Bereiche geteilt, in denen Tapasin und die klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle H-2K, H-2D und H-2L liegen. In der MHC-Klasse-II-Region werden TAP1, TAP2, LMP2, LMP7, H-2O und H-2M kodiert (nach Janeway et al., 2005).

Die Aufgabe der MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle besteht darin, von Pathogenen und entarteten körpereigenen Zellen hergeleitete Peptidfragmente auf der Oberfläche zu präsentieren, wo sie von geeigneten T-Zellen erkannt werden. Durch den polygenen (mehrere MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Gene, die kodominant exprimiert werden) und stark polymorphen (zahlreiche Allele für ein Gen innerhalb einer Population) Charakter der MHC-Moleküle ergibt sich eine hohe Vielfalt an Peptidbindungsspezifitäten eines Individuums und einer Population. Dadurch kann das Immunsystem zahlreichen und sich schnell verändernden Pathogenen erfolgreich begegnen.

3. Antigenprozessierung und -präsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle

3.1 Komponenten des MHC-Klasse-I-Weges

3.1.1 Das MHC-Klasse-I-Molekül

3.1.1.1 Struktureller Aufbau

Das MHC-Klasse-I-Molekül ist ein nicht kovalent verknüpftes Heterodimer einer schweren α -Kette (43 kDa), die sich durch die Membran erstreckt und mit dem löslichen β_2m (12 kDa) assoziiert ist. Die schwere Kette ist ein Typ-I-Glykoprotein und faltet sich in die drei extrazellulären Domänen α_1 , α_2 , α_3 . An die extrazellulären Domänen schließt sich die Transmembrandomäne und der zytoplasmatische Teil an. Röntgenstrukturanalysen zeigten, dass die membranproximale α_3 -Domäne und β_2m eine immunglobulinähnliche Faltung aufweist. Die Peptidbindungsgrube wird durch die α_1 - und α_2 -Domänen gebildet (Abb. III. 2). Der Boden der Grube wird durch acht antiparallele β -Faltblätter gebildet, der durch zwei α_1 - und α_2 -Helices begrenzt wird. In den α_2 - und α_3 -Domänen und im β_2m befinden sich intramolekulare Disulfidbrücken, die die Struktur stabilisieren. Humane MHC-Klasse-I-Schwerketten sind in der α_1 -Domäne an der Position 86, die sich in der Nähe des C-terminalen Endes des Peptids befindet, N-glykosyliert. Murine MHC-Klasse-I-Schwerketten tragen einen weiteren Zuckerrest an Position 176, der sich etwa gegenüber am anderen Ende der Grube in der α_2 -Domäne befindet.

3.1.1.2 Peptidbindungsgrube

Aus der Kristallstruktur eines MHC-Klasse-I-Moleküls (HLA-A2) von Bjorkman und Kollegen (1987a) konnte man erstmals folgern, dass die Bindung eines Peptides in

einer speziell geformten Grube erfolgt. Die Peptidbindungsgrube ist aufgrund ihrer beiden α_1 - und α_2 -Helices an beiden Seiten begrenzt, so dass nur Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren binden können (Madden, 1995). MHC-Klasse-I-Moleküle binden das Peptid in einer ausgestreckten Konformation. Der N- und C-Terminus des Peptidrückgrats wird dabei durch ein Netzwerk an Wasserstoffbrücken, sowie ionischen Wechselwirkungen an konservierten Resten in der Peptidbindungsgrube stabil verankert. Eine Gruppe von Tyr-Resten, die alle MHC-Klasse-I-Moleküle besitzen, bilden die Wasserstoffbrücken zum Aminoende des gebundenen Peptids. Eine zweite Gruppe von Resten formt Wasserstoffbrücken

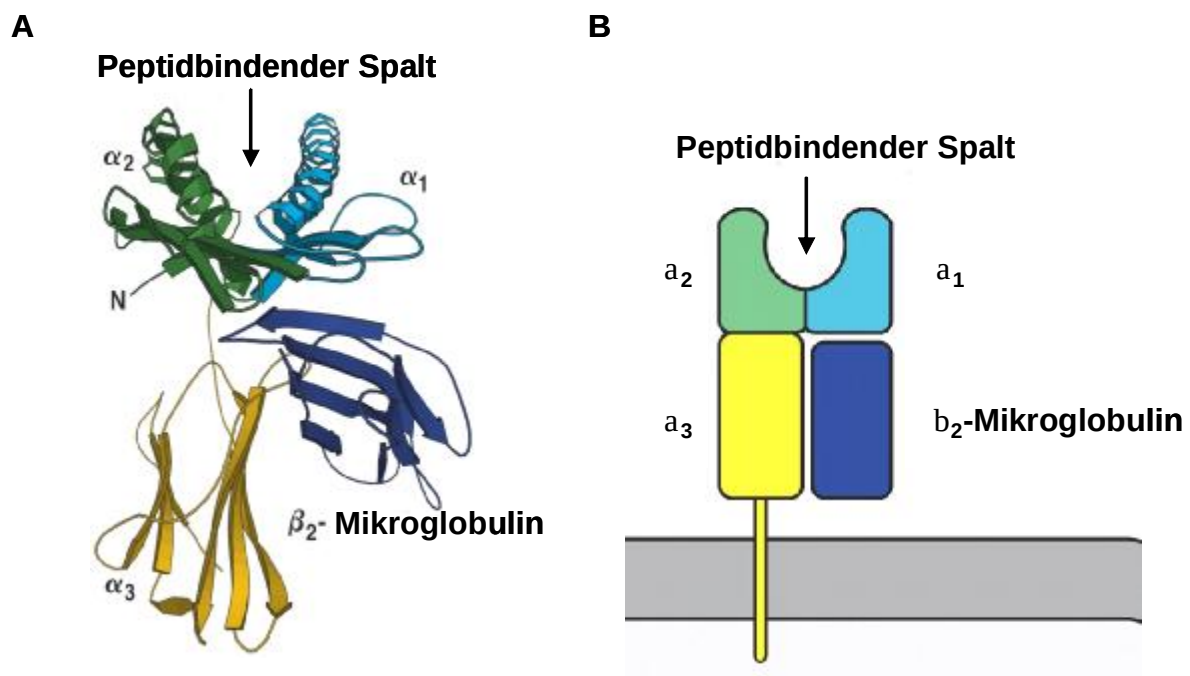


Abb. III. 2: Die Struktur eines MHC-Klasse-I-Moleküls

A) Banddiagramm der Peptidbindungsgrube. B) Schematische Darstellung der Domänenstruktur (nach Janeway et al., 2005).

und ionische Wechselwirkungen mit dem Carboxylende. Die Peptidbindungsgrube wird in 6 Bindungstaschen (A, B, C, D, E und F) unterteilt. MHC-Klasse-I-Moleküle sind hochgradig polymorph. Die polymorphen Reste befinden sich am Boden und an den Seiten der Peptidbindungsgrube (Bjorkman et al., 1987a; Zhang et al., 1998). Diese verschiedenartigen, polymorphen Seitenketten bestimmen die Eigenschaften der Bindungstaschen in der Peptidbindungsgrube, die einen engen Kontakt mit der Peptidseitenkette herstellt. Dadurch wird die Allel-spezifische Bindung von Peptiden

mit geeigneter Sequenz ermöglicht. Die C-terminalen Reste eines Peptids dienen als Anker für die C-terminale Bindungstasche F. Die Reste 2, 3 oder 5 dienen als N-terminale Anker (Rammensee et al., 1993). Die Position der N-terminalen Ankerreste in der Bindungstasche variiert. In Menschen sind die C-terminalen Ankerreste eines Peptids hydrophob oder basisch. In der Maus dagegen wurden nur hydrophobe C-terminale Ankerreste beschrieben (Rammensee et al., 1993).

Aus der Peptidbindungsgrube herausragende Aminosäureseitenketten des gebundenen Peptids, die nicht an der Wechselwirkung mit der MHC-Bindungsgrube beteiligt sind, bilden zusammen mit den erreichbaren Elementen der beiden α_1 - und α_2 -Helices das Epitop für die Peptid-MHC-Klasse-I-spezifische Bindung durch den TZR.

3.1.2 Der Peptidtransporter TAP

TAP ist ein Mitglied der ABC-Transportersuperfamilie (*ATP-binding cassette transporter superfamily*). Die meisten Mitglieder der Familie der ABC-Transporter transportieren unter ATP-Verbrauch ein weites Spektrum an Substraten (z.B. Ionen, Aminosäuren, hydrophobe Drogen, Peptide, Kohlenhydrate) und sind in Eukaryonten und Prokaryonten ubiquitär verbreitet (Higgins, 1992; Holland und Blight, 1999). Alle ABC-Transporter haben einen ähnlichen Aufbau aus mindestens vier Domänen. Zwei Domänen stellen die hydrophoben Transmembrandomänen (TMDs) dar, die für die Substratbindung und den Substratdurchgang verantwortlich sind. Zwei weitere sind auf der zytosolischen Membranseite lokalisiert und formen die hydrophilen Nukleotidbindungsdomänen (NBDs). Die TMDs innerhalb der ABC-Transporter weisen nur eine geringe Sequenzhomologie auf, während die NBDs eine Sequenzhomologie von mehr als 25 % besitzen. In der NBD liegen drei für ABC-Transporter charakteristische und hochkonservierte Motive. Die Walker-A- und -B-Motive bilden die hochkonservierte ATP-Bindungskassette. Die C-Schleife mit dem Sequenzmotiv LSGGQ ist zwischen den Walker-A- und -B-Motiven lokalisiert (Higgins, 1992).

In *E.coli* exportiert z. B. der Hämolyisin-B-Transporter das 110 kDa große Toxin α -Hämolyisin über die Außenmembran (Felmlee et al., 1985). Beispiele für ABC-Transporter in Mammalia sind der CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), der als Chloridionen-Kanal fungiert (Collins, 1992; Welsh und Smith, 1993), sowie das P-Glykoprotein, das hydrophobe Drogen exportiert (Lautier et al., 1996; Gottesman und Pastan, 1993).

Der TAP-Transporter besteht aus zwei Untereinheiten, TAP1 und TAP2, die nichtkovalent verknüpft sind (Abb. III. 3). Jede Untereinheit enthält eine NBD und eine TMD. Die Sequenzidentität zwischen TAP1 und TAP2 beträgt etwa 40 %. Die Gene für humanes TAP1 und TAP2 sind in dem MHC-II-Lokus auf Chromosom 6 lokalisiert und ihre Expression ist durch IFN- γ induzierbar. Beide Gene umfassen

ungefähr 10 kb und besitzen jeweils 11 Exons (Hanson and Trowsdale, 1991). Humanes TAP1 ist ein Protein mit einer berechneten Molekularmasse von 81 kDa (748 Aminosäuren). Dagegen hat humanes TAP2 ein Molekulargewicht von 75 kDa (686 Aminosäuren). Die Gene für Ratten- und Maus-TAP1 und -TAP2 liegen ebenfalls in der MHC-Klasse-II-Region (Momburg und Hämmerling, 1998). TAP1- bzw. TAP2-Untereinheiten in Mensch, Ratte oder Maus weisen eine Sequenzhomologie von 72 % bis 91 % auf. Das Molekulargewicht für Maus- und Ratten-TAP1 beträgt 79 kDa, während TAP2 in Ratte ein Molekulargewicht von 77,7 kDa und in Maus von 77,4 kDa hat. Diese Zahlen sprechen zusammen mit der Tatsache, dass sich die TAP1- und TAP2-Sequenzen untereinander nur zu etwa 40 % ähneln, für eine evolutionär frühe Trennung von TAP1 und TAP2 aus einem Vorläufer TAP-Gen vor der Entwicklung speziesspezifischer TAP-Moleküle (Powis et al., 1993).

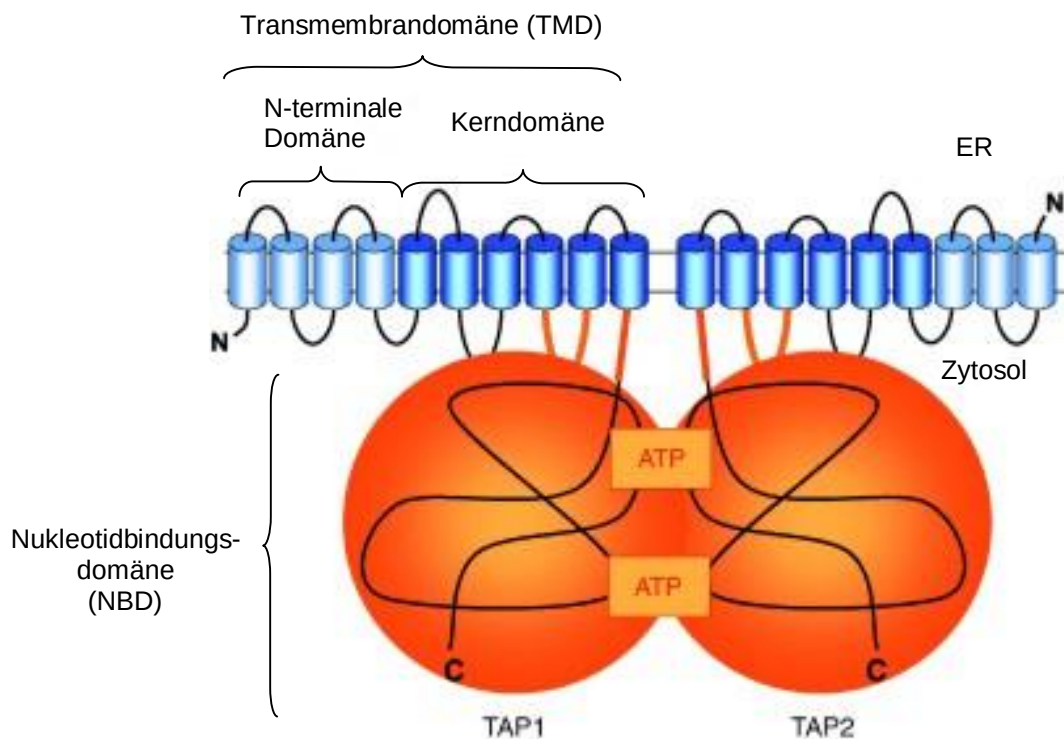


Abb. III. 3: Membrantopologie des TAP-Komplexes

Die vermeintlichen Transmembranhelices in der N-terminalen Domäne in TAP1 (TMs 1-4) bzw. TAP2 (TMs 1-3) sind hellblau. Die aus 6 + 6 Transmembranhelices (TAP1: TMs 5-10; TAP2: TMs 4-9) bestehende Kerndomäne des TAP-Komplexes bildet vermutlich die Translokationspore und ist dunkelblau. Die Peptidbindungsregion ist orange dargestellt (nach Beismann-Driemeyer und Tampé, 2004).

Die MHC-Klasse-I-abhängige Antigenpräsentation wurde durch Transfektion von TAP-defizienten Zelllinien mit einem oder beiden TAP-Genen (abhängig, ob der Defekt in einem oder beiden Genen war) wieder hergestellt (Powis et al., 1991; Spies und DeMars 1991). Es konnte außerdem gezeigt werden, wenn in sonst TAP-defizienten Hefe und Insekten-Zellen TAP1 und TAP2 transfiziert wurden, dass TAP1 und TAP2 notwendig und ausreichend für den Peptidtransport in das ER waren (Spies and DeMars 1991; Meyer et al., 1994; Urlinger et al., 1997). Diese Resultate deuten an, dass TAP1 und TAP2 einen funktionellen, heterodimeren Transportkomplex bilden. Quervernetzungsexperimente und Elektronenmikroskopieanalysen zeigten, dass TAP als Heterodimer organisiert ist (Lacaille and Androlewicz., 1998; Velarde et al., 2001). Immunelektronen- und Immunfluoreszenzmikroskopiestudien zeigten auch, dass der Transportkomplex nur in der ER- und der cis-Golgi-Membran lokalisiert ist, obwohl kein ER-Retentionssignal identifiziert werden konnte (Kleijmeer et al., 1992; Meyer et al., 1994). Hydrophobizitätsberechnungen und Vergleiche mit anderen ABC-Transportern ergab, dass TAP1 zehn und TAP2 neun Transmembranhelices (TMs) besitzen (Momburg et al., 1996; Nijenhuis und Hämmerling, 1996, Elliott, 1997; Abele und Tampé, 1999) (Abb. III. 3). Dies deutet darauf hin, dass der N-Terminus von TAP1 in Richtung des Zytoplasmas orientiert und der N-Terminus von TAP2 im ER lokalisiert ist. Vor kurzem konnte experimentell gezeigt werden, dass TAP1 aus zehn TMs besteht und der N- und C-Terminus im Zytoplasma lokalisiert ist (Schrodt et al., 2006). Aufgrund eines Strukturvergleichs mit anderen ABC-Transportern wird postuliert, dass die Translokationspore durch die 6 symmetrisch angeordneten C-terminalen TMs (TMs 5-10 bei TAP1 und TMs 4-9 bei TAP2) gebildet wird (Abele and Tampé, 1999). Diese 6 + 6 TM-Kerndomäne des TAP-Komplexes ist ausreichend für den Zusammenbau des Heterodimers, die Peptidbindung und den Peptidtransport (Koch et al., 2004). Die hydrophobe TMD ist funktionell mit der NBD verbunden, welche die konservierten Walker-A- und -B-Motive für die ATP-Bindung und -Hydrolyse enthält (Walker et al., 1982). Die zwischen den beiden Walker-A- und -B-Motiven liegende C-Schleife interagiert mit einem EAA-ähnlichen Motiv, dass sich in der letzten zytosolischen Schleife der Membrandomäne befindet (Cotten et al., 1996).

Studien mit Verkürzungsmutanten zeigten, dass die N-terminalen Domänen des TAP1/TAP2-Heterodimers für die Tapasin-Bindung notwendig sind (Koch et al., 2004. Procko et al., 2005, Leonardt et al., 2005). Aufgrund von strukturellen Daten der ABC-Transporter P-Glykoprotein und MsbA (Loo und Clarke, 2000; Chang, 2003) wird spekuliert, dass die N-terminalen Domänen von TAP1 und TAP2 im Heterodimer gegenüberliegen, wenn die Kerndomänen gepaart sind. Mittels Peptidphotoquervernetzungsstudien konnte gezeigt werden, dass TAP1 und TAP2 an der Bildung der Peptidbindungsstelle beteiligt sind (Androlewicz und Cresswell,

1994). Die Peptidbindungsregion wurde durch Peptidphotoquervernetzung, Verdau durch Trypsin und/oder Bromocyan und nachfolgender Immunopräzipitation mit Antikörpern, die gegen verschiedene Epitope von TAP1/TAP2 gerichtet sind, kartiert (Nijenhuis and Hämmerling, 1996). Die Analyse der photoquervernetzten Fragmente ergab, dass TAP1 und TAP2 ähnliche Peptidbindungsregionen besitzen. Diese umfassen die zytosolischen Schleifen zwischen TM 8 und TM 9 in TAP1 bzw. TM 7 und TM 8 in TAP2 und einem C-terminalen Abschnitt von etwa 15 Aminosäuren, die die TM 10 in TAP1 bzw. die TM 9 in TAP2 mit der NBD verbindet.

3.1.3 Das Immunoglobulin-Bindungsprotein (BiP)

BiP ist ein Mitglied der Hitzeschockproteinfamilie 70. Die Funktion dieses ER-Chaperons ist die Stabilisierung von neu synthetisierten Polypeptiden während der Faltung, Vermittlung der Retention im ER, Verhinderung von Aggregation und Ausbildung von nicht nativen Disulfidbindungen (Gething und Sambrook, 1992). Außerdem ist BiP an der Translokation von neu synthetisierten Proteinen in das ER und bei der Degradation von fehlgefalteten Proteinen involviert.

3.1.4 Tapasin

Im Jahr 1994 wurde erstmals ein etwa 48 kDa großes Protein beschrieben, das nach Lyse von humanen B-lymphoblastoiden Zellen im milden Detergenz Digitonin mit dem Peptidtransporter TAP kopräzipitiert werden konnte (Ortmann et al., 1994). Das Protein wurde als Akronym von „*TAP-associated glycoprotein*“ Tapasin (Tpn) benannt. Hohe mRNA-Niveaus von Tpn werden in T-Zellen, Knochenmark, Thymus, Darm, Lunge und Niere nachgewiesen. Die Tpn-Expression ist häufig in Karzinom- und Melanom-Zelllinien reduziert, allerdings kann diese durch IFN- γ -Behandlung oder eine Kombination aus IFN- β und TNF- α wieder hergestellt werden (Ritz et al., 2001; Seliger et al., 2001 a, b).

Erste Untersuchungen konnten eine Verbindung des Gens für Tpn mit der MHC-Region auf dem humanen Chromosom 6 zeigen (Grande et al., 1995; Ortmann et al., 1997). Das Tpn-Gen wurde anschließend an das zentromerische Ende der humanen, murinen und Huhn-MHC-II-Region kartiert, an eine Stelle, die zentromerisch von den HLA-DP-Genen in der menschlichen MHC-II-Region liegt (Herberg et al., 1998) und entsprechende Positionen in der murinen, Ratten- und Huhn-MHC-II-Region (Herberg et al., 1998; Grande et al., 1998; Frangoulis et al., 1999; Jacob et al., 2000). Das Tpn-Gen wird während Immunantworten durch IFN- γ hochreguliert. Acht Exons kodieren das 448 Aminosäuren lange humane ER-residente Typ-I-Transmembranglykoprotein, dessen überwiegender Teil im Lumen des ER lokalisiert ist (Abb. III. 4). Dem luminalen, N-terminalen Bereich (Aminosäuren 1-393) folgt eine TMD (Aminosäuren 394-416) und ein relativ kurzer

zytoplasmatischer C-Terminus (Aminosäuren 417-428). Nach der Abspaltung der Signalsequenz im ER entsteht das reife Tpn-Protein. Der von Exon 2 kodierte N-terminale Pro-reiche Bereich hat keine Homologie zu bekannten Proteinsequenzen (Reste 1-50). Das Exon 3 kodiert für eine teilweise Ig-ähnliche Domäne (Aminosäuren 51-136), während die V-SET-Ig-ähnliche Domäne (Aminosäuren 137-270) von Exon 4 kodiert wird und nur bei Huhn-Tpn zwei Cys-Reste enthält, die eine Disulfidbrücke bilden (Herberg et al., 1998; Frangoulis et al., 1999). Zusätzlich befindet sich eine Domäne (Reste 271- 383) im luminalen Teil von Tpn, die eine Homologie mit der C1-SET-Ig-Superfamilie aufweist und von Exon 5 kodiert wird (Ortmann et al., 1997; Herberg et al., 1998). Das Verbindungspeptid (Reste 384-393) wird von Exon 6 kodiert. Die TMD wird dagegen von Exon 7 und teilweise von Exon 6 kodiert. Die von Exon 7 und 8 kodierte zytoplasmatische Domäne hat keine signifikante Homologie (ausgenommen Maus- und Ratten-Tpn) zu anderen Spezies, endet jedoch immer mit einem ER-Retensionssignal (KKXX) (Ortmann et al., 1997; Li et al., 1997, 1999; Grandea et al., 1998; Frangoulis et al., 1999). Die in der membranproximalen C1-SET-Ig-ähnlichen Domäne befindlichen Cys (C295 und C362) bilden eine sekundäre intramolekulare Disulfidbrücke aus (Ortmann et al., 1997; Turnquist et al., 2004). Deshalb zählt Tpn zur Ig-Superfamilie. Eine weitere Disulfidbrücke bildet sich zwischen C7 und C71 aus (Dick et al., 2002; Turnquist et al., 2004). Das Cys an Position 95 in Tpn ist an der Rekrutierung des ER-Proteins mit einem Molekulargewicht von 57 kDa (ERp57) in den Beladungskomplex beteiligt (Dick et al., 2002). Ein einzelnes N-Glykan ist in allen Tpn-Molekülen außer bei Huhn-Tpn vorhanden (N233).

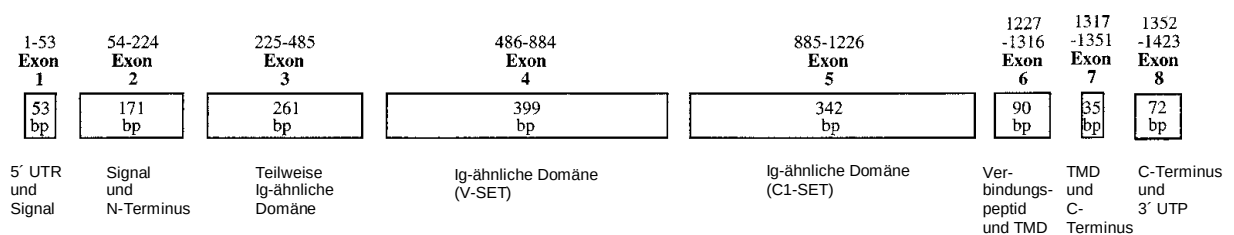


Abb. III. 4: Schematische Darstellung der Exon- und Intron-Struktur des humanen Tpn-Gens

Die Positionen der Introns in der Sequenz sind oberhalb der Exon-Nummern angegeben. Das murine Tpn hat eine fast identische genomische Struktur. Im Gegensatz zu humanem Tpn (Signalpeptid: 20 Aminosäuren; zytoplasmatische Domäne: 12 Aminosäuren) ist das murine Signalpeptid 23 Aminosäuren und die zytoplasmatische Domäne 26 Aminosäuren lang (nach Herberg et al., 1998).

Es gibt Hinweise, dass Tpn mit COP-I (*coat-protein complex I*)-Vesikeln assoziiert und als Frachtrezeptor fungiert, um nicht korrekt gefaltete MHC-Klasse-I-Moleküle vom cis-Golgi-Netzwerk in das ER zurück zu transportieren (Paulsson et al., 2002). Der Transport von peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Molekülen vom ER zum cis-Golgi-Netzwerk über COP-II-Vesikel wird vermutlich durch den Bap (*B cell associated protein*) 31 Frachtrezeptor reguliert (Spiliotis et al., 2000; Paquet et al., 2004). Bap 31 kann unabhängig von MHC-Klasse-I mit Tpn interagieren und rekrutiert MHC-Klasse-I-Moleküle zu ER-Austrittsstellen. Bap31 überprüft so bereits im Peptidbeladungskomplex auf eine potentielle Fracht (Paquet et al., 2004).

Tpn spielt eine wichtige Rolle beim Peptidbeladungsprozess von MHC-Klasse-I-Molekülen. Es konnte gezeigt werden, dass Tpn unabhängig an TAP bzw. MHC-Klasse-I/ β_2m -Komplexe binden kann (Sadasivan et al., 1996). Eine Transfektion von humanem Tpn in die humane Tpn-defiziente B-lymphoblastoide Zelllinie 721.220 (.220) stellt die MHC-Klasse-I-Assoziation mit TAP und eine normale MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression wieder her (Ortmann et al., 1997; Lewis et al., 1998; Tan et al., 2002). Tpn dient demnach als Brückenmolekül und verkürzt die Entfernung von Peptidtransporter und peptidbindenden MHC-Klasse-I-Rezeptor. Stöchiometrieanalysen ergaben, dass durchschnittlich vier Tpn-, vier MHC-Klasse-I-Schwerketten-, vier Calretikulin-, vier ERp57-Moleküle und etwa ein Calnexin-Molekül mit einem TAP1/TAP2-Heterodimer assoziiert sind (Ortmann et al., 1997). Chemische Quervernetzungsexperimente zeigten darüber hinaus, dass ein Tpn-Molekül mit einem MHC-Klasse-I-Molekül interagiert (Bangia und Cresswell, 2005). Sowohl in .220-Zellen (Sadasivan et al., 1996; Ortmann et al., 1997; Tan et al., 2002; Greenwood et al., 1994; Barnden et al., 2000; Purcell et al., 2001; Williams et al., 2002) als auch in Tpn-knockout Mäusen (Garbi et al., 2000; Grandea et al., 2000) wurde eine verminderte MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression und Stabilität der MHC-Klasse-I-Moleküle beobachtet. Diese MHC-Klasse-I-Moleküle sind entweder leer oder mit suboptimalen Peptiden beladen, zerfallen an der Oberfläche sehr schnell und werden abgebaut. Studien konnten zeigen, dass Tpn leere MHC-Klasse-I-Moleküle bis zur Peptidbeladung im ER zurückhält (Schoenhals et al., 1999; Barnden et al., 2000; Grandea et al., 2000). Außerdem optimiert Tpn die Peptidbindung, was zu einer erhöhten Stabilität der MHC-Klasse-I-Komplexe führt (Lewis und Elliot, 1998; Garbi et al., 2000; Purcell et al., 2001, Tan et al., 2002; Zarling et al., 2003; Howarth et al., 2004). Es wird angenommen, dass Tpn dabei die Funktion eines Peptid-Editors übernimmt, indem niedrigaffin gebundene Peptide im Peptidbeladungskomplex durch hochaffine Peptide ausgetauscht werden (Howarth et al., 2004). Durch die Bindung eines hochaffinen Peptids wird der MHC-Klasse-I-Komplex stabilisiert und im MHC-Klasse-I-Molekül eine Konformationsänderung induziert. Diese Konformationsänderung bewirkt wahrscheinlich die Dissoziation des Beladungskomplexes und den Transport des MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexes an die Zelloberfläche.

N-terminale Tpn-Deletionsmutanten, denen 50 bis 300 Aminosäuren fehlen, interagierten weiterhin mit TAP. Allerdings assoziierten diese nicht mit HLA-B8 und die HLA-B8-Oberflächenexpression war stark reduziert (Bangia et al., 1999). Außerdem war keine Assoziation von Calretikulin mit Tpn oder der schweren Kette zu beobachten (Bangia et al., 1999). Die Verkürzung der N-terminalen Domäne von Tpn um 19 Aminosäuren resultierte in einem Verlust der Hochregulation von HLA-B8-Molekülen in .220-Zellen (Momburg und Tan, 2002). Diese Ergebnisse deuten an, dass strukturelle Elemente der N-terminalen Domäne entscheidend für die Tpn-MHC-Klasse-I-Interaktion sind. Strukturelle Elemente können C7 und C71 sein, da Mutationen von einer der beiden Cys zu einer reduzierten Stabilität und beeinträchtigten Tpn-Funktion führen (Dick et al., 2002). Die oberflächenexponierten Aminosäuren (334-342) in der membranproximalen Ig-ähnlichen Domäne von Tpn sind ebenfalls an der Interaktion mit MHC-Klasse-I beteiligt (Turnquist et al., 2001, 2004). Diese Region interagiert möglicherweise mit einer exponierten Schleife (222-229 mit den sauren Aminosäuren D227 und E229) in der α_3 -Domäne von MHC-Klasse-I (diese Schleife interagiert auch mit CD8) (Carreno et al., 1995; Wright et al., 2004). Eine exponierte Schleife der MHC-Klasse-I- α_2 -Domäne (Aminosäuren 128-137) interagiert mit der N-terminalen Domäne von Tpn (Yu et al., 1999; Wright et al., 2004). Zusätzlich sind die beiden Reste Q115 und D122 in der α_2 -Domäne von MHC-Klasse-I an der Interaktion mit der N-terminalen Domäne von Tpn beteiligt (diese Aminosäuren interagieren ebenfalls mit CD8) (Beissbarth et al., 2000). Die beiden Aminosäuren befinden sich am Boden der Peptidbindungsgrube und kontaktieren β_2m .

Murine MHC-Klasse-I-Moleküle sind bezüglich ihrer Oberflächenexpression und Stabilität abhängig von Tpn. Im Gegensatz dazu existieren für allelische HLA-Moleküle unterschiedliche Grade an Abhängigkeiten von Tpn. Die Bindung der Seitengruppe der C-terminalen Aminosäure im Peptid ist stark durch die polymorphen MHC-Klasse-I-Aminosäuren 114 und 116, die nach oben vom Boden der F-Tasche der Peptidbindungsgrube zum Peptid zeigen, bestimmt (Bjorkman et al., 1987b). Die Beladung von allelischen HLA-Molekülen mit Peptiden ist bei dem HLA-B4402-Molekül stark, bei HLA-B8 mittelmäßig und bei HLA-B2705 kaum Tpn-abhängig (Peh et al., 1998). Wenn E114 in dem stark Tpn-abhängigen HLA-B4402 durch His ersetzt wird, ist HLA-B4402 fähig, hochaffine Peptide zu binden und die Oberflächenexpression ist ohne Tpn normal. Eine His zu Glu Substitution an Position 114 ist ausreichend, um das sonst kaum Tpn-abhängige HLA-B2705 Tpn abhängig zu machen (Park et al., 2003). Auch konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von S116 (eher als F116 oder Y116) in HLA-B-Subtypen mit einer ineffizienten Assoziation des Peptidbeladungskomplexes und ebenso ineffizienten MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression einhergeht (Neisig et al., 1996; Turnquist et al., 2000). Auch wenn Tpn-unabhängige MHC-Klasse-I-Allele ohne Tpn Peptide effizient binden und präsentieren können, wird in Anwesenheit von Tpn das gebundene Peptidspektrum

verändert und die MHC-Klasse-I-Reifung und -Stabilität verbessert (Peh et al., 1998; Purcell et al., 2001; Zernich et al., 2004). Die Oberflächenexpression des Tpn-unabhängigen Allels B4405 (Y116), das in den Peptidbeladungskomplex nicht nennenswert integriert wird, war weniger beeinträchtigt durch den viralen TAP-Inhibitor ICP47 als B4402 (N116) (Zernich et al., 2004). Dies deutet darauf hin, dass Tpn-unabhängige Allele sich während der Evolution entwickelt haben könnten die Antigenpräsentation aufrecht zu erhalten, wenn Viren den Peptidbeladungskomplex angreifen.

Tpn interagiert sowohl mit MHC-Klasse-I als auch mit TAP. Eine lösliche Tpn-Mutante mit einer Deletion der TMD und zytoplasmatischen Domäne assoziierte nicht mehr mit TAP, jedoch noch mit HLA-B8 (Lehner et al., 1998). Dies zeigt, dass die TMD und zytoplasmatische Domäne für die Interaktion von Tpn mit TAP notwendig ist. Tpn erhöht außerdem das TAP-Expressionsniveau (Lehner et al., 1998; Li et al., 2000; Tan et al., 2002; Garbi et al., 2003). Der genaue molekulare Mechanismus der TAP-Stabilisierung durch Tpn ist jedoch kaum charakterisiert. Drei lösliche Tpn-Varianten und die Tpn-Mutante (L410F), die TAP schlecht bindet, haben die Fähigkeit der Bindung eines optimalen Peptidspektrums verloren (Tan et al., 2002). Darüberhinaus wurde gezeigt, dass Human- bzw. Maus-Tpn mit einer mutierten Aminosäure K408 eine verminderte TAP-Stabilisierung aufweist (Petersen et al., 2005). Eine Interaktion zwischen geladenen Aminosäuren in der TMD ist bereits vom TZR bekannt (Cosson et al., 1991).

3.1.5 Calnexin und Calretikulin

Calnexin und Calretikulin sind homologe ER-lokalisierte Glykoproteine, die bei der Faltung von neu synthetisierten Glykoproteinen im ER assistieren. Calnexin ist ein 65 kDa Typ-I-Transmembranprotein und Calretikulin ist ein 46 kDa großes, lösliches luminales ER-Protein. Beide Lektine besitzen eine N-Domäne, die eine globuläre β -Sandwichstruktur aufweist, welche eine Signatur der kohlenhydratbindenden Domäne der Lektine von Hülsenfrüchtlern darstellt. Die darauffolgende Pro-reiche Domäne (P-Domäne) formt eine lange Haarnadel, die bei Calnexin länger als bei Calretikulin ist (Schrag et al., 2001; Ellgaard et al., 2001). Die C-terminale Domäne von Calnexin und Calretikulin ist reich an sauren Aminosäuren. Bei Calnexin endet die C-terminale Domäne mit einem KXRRX-ER-Lokalisationssignal, bei Calretikulin dagegen mit einem KDEL-ER-Retentionssignal (Bergeron et al., 1994; Helenius and Aebi, 2004). Sowohl die P-Domäne als auch die C-terminale Domäne sind Calciumbindungsstellen.

Calnexin und Calretikulin spielen zusammen mit ERp57 eine wichtige Rolle bei der ER-Glykoprotein-Qualitätskontrolle (Hebert et al., 2005). Während der Translokation durch den Sec61-Kanal ins ER wird ein Asn-verknüpftes Glykan ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) durch die Oligosaccharyltransferase auf die wachsende Glykoproteinkette

kotranslationell auf die Asn-Seitenkette in der Asn-X-Ser/Thr-Konsensus-Sequenz übertragen. Der äußere Glukoserest wird durch die Glukosidase-I entfernt. Danach entfernt die Glukosidase-II die mittlere Glukose. Calnexin und Calretikulin erkennen und binden mit der N-Domäne an nahezu alle Glykoproteine im ER, die dieses monoglukosylierte Glykan besitzen (Zapun et al., 1997; Shusta et al., 2000; Kapoor et al., 2003). Diese dienen als Chaperone, die eine Aggregation und den Export von nicht vollständig gefalteten oder falsch gefalteten Ketten im ER verhindern. Außerdem schützen sie Zwischenprodukte gegen verfrühte Degradation und bewirken die Bindung von ERp57 an die P-Domäne von Calnexin/Calretikulin (Rajagopalan et al., 1994; Hebert et al., 1996; Vassilakos et al., 1996; Frickel et al., 2002). ERp57 ist eine thiolabhängige Oxidoreduktase, die bei der Ausbildung von korrekten Disulfidbrücken während des Faltungsprozesses vermutlich beteiligt ist. Die Entfernung des dritten Glukoserestes durch die Glukosidase-II bewirkt die Dissoziation von Calnexin/Calretikulin. Das Protein nimmt nun seine endgültige Konformation an. Korrekt gefaltete Glykoproteine werden von Mannosidase-I und -II getrimmt und vom Mannose-bindenden Lektin ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*)-53 erkannt, in COP-II enthaltende Vesikel verpackt und vom ER zum Golgi transportiert. Der Transportrezeptor ERGIC-53 rezykliert zwischen ER und Golgi. Bei unvollständiger Faltung kann das Substrat durch die UDP-Glukose:Glykoprotein-Glukosyltransferase reglukosyliert werden, was wiederum die Bindung von Calnexin/Calretikulin bewirkt. Nicht korrekt gefaltete Proteine verlieren möglicherweise durch die Mannosidase-I einen Mannoserest, was die Dissoziation von Calnexin/Calretikulin und die Bindung an das Lektin EDEM (*ER degradation enhancing α -mannosidase like protein*) bewirkt (Jacob et al., 2001; Hosokawa et al., 2001). EDEM-gebundene Substrate werden über den Sec61-Kanal in das Zytosol zurücktransportiert und dort degradiert.

Calnexin interagiert über seine Lektin-ähnliche N-Domäne und Peptidbindungsstelle in der P-Domäne sofort mit der schweren Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls, nachdem etwa 30 Aminosäurereste das ER-Lumen durch den Sec61-Kanal erreicht haben (Zang et al., 1995; Leach et al., 2002; Leach and Williams, 2004). Jedoch scheint Calnexin für die frühe Faltung, die Peptidbeladung und den ER-Export von MHC-Klasse-I entbehrlich zu sein. Studien mit humanen Calnexin-defizienten Zelllinien zeigten keine offensichtlichen Defekte in der MHC-Klasse-I-Faltung, Peptidbeladung oder Peptidpräsentation (Sadasivan et al., 1995; Scott and Dawson, 1995). Bei murinen Glukosidase-II-defizienten Zellen ist die Bindung von Calnexin an die schwere Kette beeinträchtigt. Es konnte allerdings eine vermehrte Bindung von BiP beobachtet werden, was darauf hinweist, dass BiP die Rolle von Calnexin übernimmt (Balow et al., 1995). ERp57 bindet im frühen Calnexin-assoziierten Stadium an die unvollständig oxidierte schwere Kette (Farmery et al., 2000) und ist möglicherweise an der Ausbildung einer Disulfidbrücke in der α_2 - und α_3 -Domäne beteiligt. Die Bindung der β_2m an die vollständig oxidierte schwere Kette induziert

den Austausch von Calnexin gegen Calretikulin. In Maus und Mensch bindet Calretikulin dabei das N-Glykan (N86), das sich in der α_1 -Helix der schweren Kette befindet (Sadasivan et al., 1996). Calretikulin bindet in murinen Zellen an das Dimer aus Schwereketten/ β_2m , ohne dass Calnexin dissoziiert und verbleibt bis in späte Stadien der MHC-Klasse-I-Reifung, einschließlich des TAP-Beladungskomplexes, assoziiert (Carreno et al., 1995; Suh et al., 1996). Die schwere Kette von Maus hat in der α_2 -Domäne eine zusätzliche N-Glykosylierungsstelle an Position 176, was zu einer vermehrten Calnexin- und verminderten Calretikulin- Interaktion führt (Zhang and Salter, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Calretikulin-assoziierte Schwereketten/ β_2m -Dimere peptidfrei waren oder zumindest keine hochaffinen Peptide gebunden hatten (Sadasivan et al., 1996; Li et al., 1999). Die meisten Calretikulin-assoziierten MHC-Klasse-I-Schwerketten wurden im Komplex mit TAP gefunden (Diedrich et al., 2001). Diese Korrelation kann dadurch erklärt werden, dass die Bindung von Tpn, welches das MHC-Klasse-I-Molekül mit TAP verknüpft, und die Assoziation von Calretikulin an die MHC-Klasse-I-Schwerkette ein kooperativer Prozess ist. Punktmutationen in MHC-Klasse-I, die eine Interaktion mit Tpn und TAP verhindern, führten ebenfalls zu einer Aufhebung der Interaktion mit Calretikulin. Allerdings war die Assoziation mit Calnexin nicht beeinträchtigt (Solheim et al., 1997; Lewis und Elliott, 1998, Yu et al., 1999; Momburg und Tan, 2002). Mehrere Studien konnten zeigen, dass in Tpn-defizienten .220-Zellen oder in Anwesenheit von N- oder C-terminal verkürzten Tpn-Varianten die Assoziation mit MHC-Klasse-I und Calretikulin reduziert oder nicht mehr nachweisbar war (Lewis und Elliott, 1998; Harris et al., 2001; Bangia et al., 1999; Tan et al., 2002). Dies verdeutlicht, dass Tpn die Assemblierung von Calretikulin fördert. Die Assoziation von Tpn-TAP mit MHC-Klasse-I-Molekülen war beeinträchtigt, wenn MHC-Klasse-I-Mutanten verwendet wurden, die eine Bindung von Calretikulin an das α_1 -Domäne Glykan (N86) verhindern (Sadasivan et al., 1996; Yu et al., 1999; Harris et al., 2001). Dies lässt vermuten, dass die Assemblierung von Tpn mit dem Schwereketten/ β_2m -Dimer auch von Calretikulin abhängig ist. Analysen mit Zellen von Calretikulin-defizienten Mäusen zeigten auf, dass Calretikulin eine wichtige Rolle während der Peptidbeladung spielt (Gao et al., 2002). Die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen war in Abwesenheit von Calretikulin um 70-75% reduziert. Außerdem war die Präsentation von bestimmten T-Zell-Epitopen beeinträchtigt und der ER-Export von MHC-Klasse-I-Molekülen erhöht. Dies deutet darauf hin, dass Calretikulin und Tpn eine wichtige Rolle bei der ER-Retention von leeren oder suboptimal beladenen Schwereketten/ β_2m -Dimeren spielt.

3.1.6 ERp57

ERp57 ist eine im ER lokalisierte, 57 kDa große, thiolabhängige Oxidoreduktase und gehört, wie die Proteindisulfidisomerase (PDI) der Thioredoxin-Familie an. Entsprechend der Ausbildung von Disulfidbrücken in monoglukosylierten Glykoproteinen wird angenommen, dass ERp57 an der Calnexin/Calretikulin-abhängigen Qualitätskontrolle beteiligt ist (Helenius und Aeby, 2001; Oliver et al., 1999). Sie besitzt vier Thioredoxin-ähnliche Domänen mit der Anordnung a, b, b', a' und ist daher homolog zu PDI organisiert (Hirano et al., 1995). Die N- (C57/C60) und C- (C406/C409) terminalen Domänen haben charakteristische CXXC-Motive als aktive Redoxstellen (Sevier und Kaiser, 2002). Das Lys-reiche C-terminale Ende von ERp57 ist basisch und hat ein QDEL-Retentionssignal. Studien zeigten, dass das basische Ende mit den C-terminalen b'-und a'-Domänen von ERp57 eine Rolle bei der Interaktion mit dem sauren Endstück der P-Domäne von Calnexin und Calretikulin spielt (Pollock et al., 2004). Eine Calcium-abhängige Konformationsänderung in ERp57 ist aufgrund der Interaktion von Calretikulin oder Calnexin mit ERp57 möglich (Oliver et al., 1999; Corbett et al., 1999).

ERp57 bindet an die unvollständig oxidierte schwere Kette während der frühen Calnexin-assoziierten Stadien (Lindquist et al., 1998). Die schwere Kette besitzt Cys an den Positionen 101 und 164 in der α_2 -Domäne und an den Positionen 203 und 259 in der α_3 -Domäne. Diese sind vollständig oxidiert, wenn die schwere Kette den Peptidbeladungskomplex erreicht (Dick et al., 2002). Diese Oxidierung wird vermutlich durch ERp57 katalysiert. Studien zeigten, dass Calnexin und ERp57 an einen vorher entstandenen TAP-Tpn-Komplex binden. Dieser intermediäre Komplex assoziiert mit dem Schwereketten/ β_2m -Dimer und Calretikulin bei gleichzeitigem Verlust von Calnexin in menschlichen Zellen und bildet den Peptidbeladungskomplex (Diedrich et al., 2001). Der exakte molekulare Mechanismus der Bindung des MHC-Klasse-I-Moleküls an ERp57/Tpn und die Rekrutierung in den Peptidbeladungskomplex sind unbekannt. In ERp57-defizienten B-Zellen war die Assoziation der MHC-Klasse-I-Moleküle mit dem TAP-Komplex reduziert, jedoch nicht die Tpn-TAP-Interaktion. Diese MHC-Klasse-I-Moleküle verließen den Beladungskomplex außerdem schneller als Wildtyp-Zellen (Garbi et al., 2006). ERp57 wird in den Beladungskomplex durch die Ausbildung einer labilen Disulfidbrücke zwischen C57 von ERp57 und C95 von Tpn rekrutiert (Dick et al., 2002). Es wird vermutet, dass das kovalent an Tpn gebundene ERp57 eine Konformationsänderung im N-terminalen Bereich von Tpn hervorruft. Dadurch könnte Tpn mit der schweren Kette des MHC-Klasse-I besser assoziieren und diese stabil in den Peptidbeladungskomplex rekrutieren. Erst die Peptidbindung induziert möglicherweise erneut eine Konformationsänderung in Tpn. Dies würde wiederum den nukleophilen Angriff auf die ERp57-C57/Tpn-C95-Bindung durch C97 in ERp57 und die Dissoziation des MHC-Klasse-I-Moleküls ermöglichen. Die Mutation der

Aminosäure C95 von Tpn zerstörte die Disulfidbrückenbildung und die Assoziation mit ERp57 (Dick et al., 2002; Howarth et al., 2004). Allerdings wurden bei Verwendung dieser Mutante Unterschiede in der Rekrutierung von MHC-Klasse-I in den Peptidladungskomplex beobachtet. Die Rekrutierung von H-2L^d-Molekülen war, wie in ERp57-defizienten B-Zellen, beeinträchtigt (Turnquist et al., 2004; Garbi et al., 2006). Dagegen assoziierte HLA-B4402 mit TAP, Calretikulin und Tpn normal (Dick et al., 2002). Eine Erklärung hierfür wäre, dass ERp57 für die Rekrutierung von MHC-Klasse-I-Molekülen in Maus notwendig, aber in Mensch entbehrlich ist. Das Vorhandensein von ERp57 im Peptidbeladungskomplex lässt vermuten, dass Disulfidbindungsisomerisierungen für eine optimale Peptidbindung und Freisetzung des MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexes vom Beladungskomplex erforderlich sein könnten. In Anwesenheit einer Tpn-Mutante (C95A), die unfähig war ERp57 zu binden, war die schwere Kette von HLA-B4402 im Peptidbeladungskomplex unvollständig oxidiert und die Oberflächenexpression von HLA-B4402-Molekülen leicht vermindert (Dick et al., 2002). Die Abwesenheit eines Peptids in der Bindungsgrube könnte die Disulfidbrücke (C101-C164) in der α_2 -Domäne für reduzierende Agenzien im ER, wie z.B. Glutathion zugänglich machen. ERp57 könnte zusammen mit Tpn die Disulfidbrücke (C101-C164) in der α_2 -Domäne der schweren Kette reoxidieren oder dessen Reduktion von vornherein verhindern. Die Disulfidbindung in der α_3 -Domäne der schweren Kette von MHC-Klasse-I wird vermutlich nicht im Peptidbeladungskomplex reduziert, da diese im schwer zugänglichen hydrophoben Kern der Ig-ähnlichen α_3 -Domäne begraben ist. In ERp57-defizienten Maus-B-Zellen wurde allerdings keine Veränderung des Redoxstatus von K^b-Molekülen beobachtet (Garbi et al. 2006). Dies deutet darauf hin, dass HLA-B4402- und H2-K^b-Moleküle unterschiedliche Voraussetzungen für ERp57 haben könnten. Allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Rolle von ERp57 im Peptidbeladungskomplex vollständig zu klären.

3.2 Antigenprozessierung im Zytosol

Die Peptidgenerierung ist für den Prozess der Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle essentiell. Das zytosolische Proteasom übernimmt diese Aufgabe. Substrate für das Proteasom sind beschädigte und oxidierte Proteine am Ende ihres Bestehens, deglykosylierte ER-Proteine, sowie DRiPs (*defective ribosomal products*). Die Entsorgung dieser Wirtsproteine ist notwendig, um ein Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Protein Entfernung zu gewährleisten. Die ständige Präsenz von Substraten für das Proteasom bzw. zytosolische Peptidasen in allen Zellen ermöglicht die Generierung von Wirtspeptiden, die durch MHC-Klasse-I-Moleküle in allen zellkernhaltigen Zellen präsentiert werden. Um eine schnelle Immunantwort während einer Virusinfektion zu gewährleisten, kann das Immunsystem nicht darauf warten, bis virale Proteine aufgrund ihres Alters

degradiert werden. DRiPs sind fehlgefaltete Proteine, die ihre native Struktur aufgrund von Fehlern bei der mRNA-Synthese und beim Spleißen, bei der Translation am Ribosomen, sowie durch posttranslationelle Fehlfaltung oder fehlerhafte Assemblierung nicht erreichen (Yewdell, 2001). Diese neu synthetisierten Peptide stellen die größte Quelle für MHC-Klasse-I-Epitope dar. Außerdem ermöglichen DRiPs, dass das Immunsystem die Proteinsynthese überwacht und dadurch die Antigen synthese mit der Antigenpräsentation zeitlich koppelt (Khan et al., 2001).

3.2.1 Das Proteasom

Das Proteasom ist ein multikatalytischer Proteinkomplex, der im Zellkern und Zytosol aller eukaryontischen Zellen vorkommt. Das 26S-Proteasom besteht aus einem katalytischen 20S-Kern-Proteasomkomplex und zwei ATP-abhängigen 19S-Regulatorkomplexen (P700) (Abb. III. 5). Das konstitutive 20S-Proteasom besteht aus vierzehn nichtidentischen Untereinheiten, die vier Ringe aus jeweils sieben Untereinheiten bilden. Die sieben unterschiedlichen, aber verwandten Untereinheiten α_1 - α_7 bilden die zwei äußeren Ringe. Dagegen werden die beiden inneren Ringe durch die sieben unterschiedlichen Untereinheiten β_1 - β_7 gebildet (Kloetzel, 2001). Die proteolytisch aktiven Stellen sind in beiden β -Ringern auf das Lumen des Zylinders beschränkt und werden durch β_1 , β_2 und β_5 gebildet (Groll et al., 2000), während die anderen β -Untereinheiten enzymatisch inaktiv sind. Diese insgesamt sechs aktiven Stellen innerhalb des Kernkomplexes unterscheiden sich in Ihrer proteolytischen Aktivität. β_5 schneidet bevorzugt nach hydrophoben Resten (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität), β_2 nach basischen Resten (Trypsin-ähnliche Aktivität) und β_1 nach sauren Resten (Caspase-ähnliche Aktivität) (Kisselev et al., 2003). Die generierten Peptide bestehen aus 3-22 Aminosäuren und haben eine durchschnittliche Länge von 8-10 Aminosäuren (Rock et al., 2004). Die katalytisch aktiven Untereinheiten besitzen N-terminale Thr-Reste als aktive Nukleophile. Deshalb ist das Proteasom ein Mitglied der N-terminalen Nukleophil-Hydrolasefamilie.

Während einer Immunantwort werden die konstitutiv exprimierten β_1 -, β_2 - und β_5 -Untereinheiten durch die INF- γ induzierbaren β -Untereinheiten β_{1i} (LMP2), β_{5i} (LMP7) und β_{2i} (MECL) ersetzt. LMP2 und LMP7 werden in der MHC-Klasse-II-Region kodiert, während MECL auf Chromosom 16 kodiert wird. Diese aktiven Immununtereinheiten werden in das 20S-Proteasom eingebaut, um das so genannte Immunoproteasom (19S-20S(LMP2, LMP7, MECL)-19S) zu bilden (Abb. III. 5) (Griffin et al., 1998). INF- γ induziert auch die Synthese des Proteasomaktivators PA28 (11S-Regulator). PA28 ist ein heptamerischer Komplex bestehend aus drei identischen PA28 α - und vier identischen PA28 β -Untereinheiten, die durch INF- γ induziert werden.

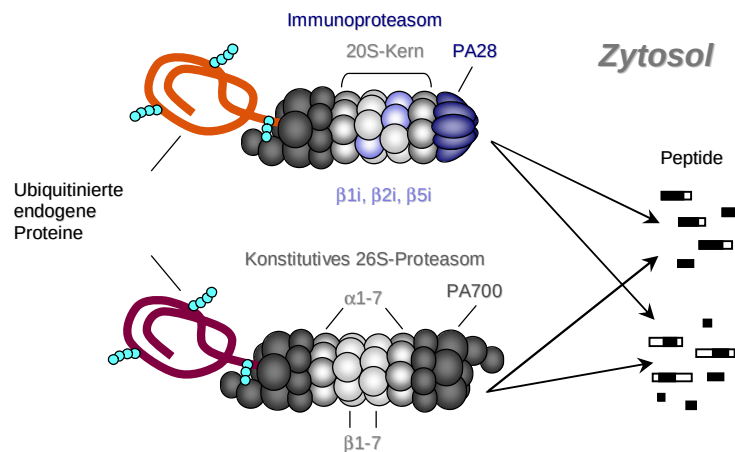


Abb. III. 5: Das konstitutive 26S-Proteasom und ein Immunoproteasom
(Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. F. Momburg, DKFZ, Heidelberg)

Diese Untereinheiten binden an die äußeren zwei α -Ringe des 20S-Komplexes (LMP2, LMP7, MECL), um das 19S-20S-11S- oder 11S-20S-11S-Immunoproteasom zu bilden. Der PA28-Regulator stimuliert die Peptidhydrolyse beträchtlich, allerdings ohne den Stoffumsatz von zellulären nativen Proteinen zu beeinflussen (Knowlton et al., 1997; Dubiel et al., 1992). Außerdem erhöht PA28 die Häufigkeit, mit welcher bestimmte Spaltungsstellen benutzt werden. Die Bindung von PA28 bewirkt, dass sich die N-terminalen Enden der 20S- α -Untereinheit nach oben in den Kernhohlraum von PA28 drehen. Dadurch wird der Eingang zu den beiden äußeren α -Ringen des 20S-Kernkomplexes unabhängig von ATP vollständig geöffnet und Substrate können leichter ein- oder ausströmen (Stohwasser et al., 2000). Die Bindung induziert zusätzlich eine strukturelle Änderung im Kernkomplex, die einen besseren Zugang der Substrate zu den aktiven Stellen erlaubt (Kloetzel, 2004). Überexpression von PA28 resultiert in einer erhöhten Präsentation bestimmter MHC-Klasse-I-Liganden (Groettrup et al., 1996). Im Vergleich zum konstitutiven 20S-Kernproteasom schneidet das 20S-Immunoproteasom bevorzugt nach hydrophoben und basischen Resten, während saure Reste weniger häufig als Schnittstellen verwendet werden (Toes et al., 2001). Demnach werden durch das Immunoproteasom hauptsächlich hydrophobe und basische C-terminale Peptide generiert, die präferenziell durch TAP transportiert werden und an MHC-Klasse-I binden. Außerdem wird das Peptidspektrum erweitert, das der Degradationsmaschinerie eine schnellere Anpassung an einen erhöhten Bedarf einer Antigenpräsentation während einer Infektion ermöglicht.

Fehlgefaltete, beschädigte oder unvollständige Proteine werden mit mindestens vier Ubiquitinen markiert, bevor diese durch das Proteasom degradiert werden (Kostova

und Wolf, 2003). Das 76 Aminosäuren große Ubiquitin ist in einer Isopeptid-Verknüpfung über sein C-terminales Gly mit dem Lys-Rest des Zielproteins verbunden. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) initiiert die Kaskade über eine ATP-abhängige Aktivierung von Ubiquitin durch Bildung einer Thiolester-Verknüpfung der C-terminalen Carboxylgruppe des Ubiquitins mit dem Cys-Rest des E1. Das aktivierte Ubiquitin wird auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) durch eine Trans-Veresterungsreaktion auf das Cys der aktiven Stelle übertragen. Die Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) bringt E2 in die Nähe des Substrates und katalysiert die Ubiquitinbindung an das Substrat durch Ausbildung einer Thiolester-Verknüpfung. E3 ist zusätzlich für die Polyubiquitinierung des Substrates zuständig. Um ein polyubiquitiniertes Substrat zu erzeugen wird an einem Lys-Rest des vorhergehenden Ubiquitins ein neues Ubiquitin angeheftet.

Die Funktionen des 19S-Regulationskomplexes sind die Erkennung, Bindung, Entfaltung und Deubiquitinierung von ubiquitinierten Proteinsubstraten. Eine weitere Aufgabe des 19S-Komplexes besteht darin den normalerweise durch die N-Termini der sieben α -Untereinheiten geschlossenen Eingang zu öffnen. Der Regulatorkomplex besteht aus einem „Basis“- und „Deckel“-Subkomplex. Die „Basis“ wird aus einem Ring von sechs ATPasen der AAA-Familie (*ATPases associated with a variety of cellular activities*) gebildet, die an den α -Ring des 20S-Komplexes bindet, und drei Nicht-ATPase-Untereinheiten. Die Funktionen dieser ATPasen sind die ATP-abhängige Öffnung des Eingangs, was den Eintritt von Substraten in den proteolytischen 20S-Kernkomplex ermöglicht, sowie die Entfaltung von ubiquitinierten Substraten (Braun et al., 1999). Der „Deckel“ besteht aus acht Nicht-ATPase-Untereinheiten (Glickman et al., 1998). Dieser ist für die Erkennung und Bindung von polyubiquitinierten Proteinen wichtig, sowie für die Deubiquitinierung und das Recycling des Polyubiquitins durch Hydrolasen.

3.2.2 Zytosolische Peptidasen

Das Proteasom generiert meistens den korrekten C-Terminus eines Peptides (Sijts et al., 2000), während der N-Terminus weniger präzise erzeugt wird. Diese N-terminal verlängerten Epitope müssen daher in vielen Fällen auf die korrekte Länge durch ER- oder zytosolisch lokalisierte Peptidasen getrimmt werden (Rock et al., 2004).

Tripeptidylpeptidase-II (TPPII) ist eine große, ubiquitär vorkommende Serinprotease (> 3,5 MDa), die als membrangebundene oder zytosolische Form existieren kann. TPPII bevorzugt Substrate mit einer Länge von mehr als 16 Aminosäuren (Reits et al., 2004). Es entfernt die ersten 3 N-terminalen Aminosäuren gleichzeitig. TPPII hat ebenso eine Endopeptidasefunktion, indem es mehr als 9 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt und zwar nach Lys- oder Arg-Resten (Seifert et al., 2003). Dadurch scheint TPPII auch an der Generierung korrekter C-Termini von solchen Peptiden beteiligt zu sein, die nicht vom Proteasom erzeugt werden. Die Funktion

von TPPII besteht auch in der Prozessierung von längeren Proteasomprodukten (16-25 Aminosäuren), da nur die Endo- und Aminopeptidaseaktivität von TPPII Peptide mit mehr als 16 Aminosäuren schneidet (Reits et al., 2004). Die ubiquitär vorkommende zytosolische Metalloendopeptidase Thimet-Oligopeptidase (TOP) degradiert Peptide mit einer Länge von 8-17 Aminosäuren (Saric et al., 2001). Dabei schneidet TOP 4-10 Aminosäuren vom N-Terminus eines Peptids ab (Oliveira et al., 2001). Die Inhibition der TOP-Expression durch RNAi führte zu einer erhöhten MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression, was darauf hin deutet, dass TOP unter normalen Bedingungen MHC-I-Liganden zerstört (York et al., 2003). Die Leucin-Aminopeptidase (LAP) ist eine zytosolische Zinkmetallopeptidase, die durch IFN- γ induzierbar ist und N-terminal verlängerte Peptide zu MHC-Klasse-I-Epitopen trimmt (Beninga et al., 1998). Die Puromycin-sensitive-Aminopeptidase (PSA) ist eine Zinkmetallopeptidase, während die Bleomycin-Hydrolase (BH) eine Cysteinprotease ist. Beide zytosolischen Aminopeptidasen sind nicht durch IFN- γ induzierbar, werden konstitutiv in den meisten Zellen exprimiert und trimmen einige N-terminal verlängerte Peptide (Stoltze et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass lange Peptidvorstufen zu reifen Peptiden getrimmt werden, indem zuerst TPPII und anschließend PSA agiert (Levy et al., 2002). Analysen von Knockout-Mäusen werden weiteren Aufschluß über die funktionelle Relevanz der verschiedenen Amino- und Endopeptidasen für den MHC-Klasse-I-Weg geben.

In lebenden Zellen beträgt die Halbwertszeit eines 9 Aminosäuren langen Peptides weniger als 10 s aufgrund der Aktivität von zytosolischen Peptidasen (Reits et al., 2003). Mehr als 99 % der neu synthetisierten und im Zytosol frei diffundierenden Proteasomprodukte werden daher zerstört, bevor diese an TAP binden können. Das zytosolische Chaperonin TRiC hat vermutlich die Funktion, N-terminal verlängerte Peptidzwischenstufen zu binden und diese dadurch vor Zerstörung durch Peptidasen zu schützen (Kunisawa und Shastri, 2003).

3.3 Peptidtransport ins ER

Der Peptidtransport vom Zytosol in das Lumen des ER durch TAP geschieht in mehreren Schritten. Studien mit dem Virusprotein ICP47, das die Peptidbindung an TAP inhibiert, belegen, dass die Peptidbindung keine Voraussetzung für die ATP-Bindung ist (Tomazin et al., 1996). Daher scheinen Peptide und Nukleotide unabhängig voneinander an TAP zu binden. Die NBDs von TAP wandeln die Energie der ATP-Hydrolyse für den Peptidtransport um. Die NBDs bilden die Form eines „L“. Dabei wird der längere Arm-I aus α - β -Strukturen aufgebaut und enthält die Walker-A- und -B-Motive, sowie die hochkonservierte D-Schleife und H-Schleife (Switch Region). Der kürzere Arm-II besteht aus einer α -helicalen Domäne, die die Q-Schleife und C-Schleife einschließt. Die ATP-Bindung induziert die Bildung eines NBD-Sandwich-Dimers (Loo et al., 2002; Smith et al., 2002). Dieser Schritt ist

möglicherweise der eigentliche Antrieb, der die Bindungsenergie von ATP in mechanische Arbeit umsetzt (Hopfner et al., 2000; Smith et al., 2002). Mit Hilfe von kinetischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Peptide über einen Zweistufenmechanismus an TAP binden, bestehend aus einem schnellen Assoziationsschritt und einer langsamen Isomerisierung des TAP-Komplexes (Neumann und Tampé, 1999). Der Isomerisierungsschritt geht mit einer erheblichen Konformationsänderung einher, bei der etwa ein Viertel aller TAP-Reste umgeordnet werden (Neumann et al., 2002). Es wird spekuliert, dass die strukturelle Neuordnung ein molekularer Schalter ist, der die ATP-Hydrolyse induziert. ATP-Hydrolyse ist eine Voraussetzung für einen (anhaltenden) Peptidtransport. Die Stimulierung der ATPase-Aktivität ist direkt mit der Peptidbindung korreliert (Gorbulev et al., 2001). Sterisch anspruchsvolle Peptide, die an TAP binden, aber nicht transportiert werden, stimulieren die ATP-Hydrolyse nicht (Gorbulev et al., 2001). Studien zeigten, dass die NBDs von beiden TAP-Untereinheiten an der ATP-Hydrolyse beteiligt sind (Chen et al., 2003). Möglicherweise besteht die Funktion der ATP-Hydrolyse darin, den Transporter für weitere Translokationszyklen in den Grundzustand zurückzusetzen. Allerdings ist bislang unklar, wie die Translokation von Peptiden über die ER-Membran exakt erfolgt.

Innerhalb eines Transferzyklus wird an beiden NBDs ATP hydrolysiert (Chen et al., 2003). Die Nichtäquivalenz beider Untereinheiten wurde durch Mutationsanalysen ermittelt. Die Mutation des hochkonservierten Lys-Restes im Walker-A-Motiv von TAP2 (ATP-Bindungsstelle-II) führte zum Verlust des Peptidtransports, während die gleiche Mutation in TAP1 (ATP-Bindungsstelle-I) eine verminderte Transportaktivität zeigte (Karttunen et al., 2001; Lapinski et al., 2001). Die ATP-Bindungsstelle-I und -II ist definiert als die ATP-Bindungstasche bestehend aus den Resten der Walker-A- und -B-Motive von NBD1 und der C-Schleife von NBD2 und umgekehrt. Der Grund, weshalb TAP zwei funktionell unterschiedliche NBDs (funktionelle Asymmetrie) enthält, ist derzeit nicht geklärt. Allerdings deuten Mutationsanalysen darauf hin, dass die ATP-Hydrolyse an TAP1 möglicherweise nicht essentiell ist (Karttunen et al., 2001). Untersuchungen der ATP-Abhängigkeit des TAP-Komplexes zeigten, dass der Transporter auch durch GTP, CTP und UTP energetisiert werden kann, während ADP dazu nicht in der Lage ist (Müller et al., 1994). Die Nichtäquivalenz beider NBDs wird in Sequenzvariationen von hoch konservierten Regionen der ABC-Transporter wiedergespiegelt. Durch Sequenzvergleich der an der ATP-Bindung beteiligten Regionen von NBD1 und NBD2 mit anderen NBDs wurde gezeigt, dass die meisten Differenzen in der ATP-Bindungsstelle-I liegen. In TAP1-Sequenzen ist das Glu, das direkt auf das Walker-B-Motiv folgt und in allen ABC-Transportern stark konserviert ist, gegen ein Asp ausgetauscht. Es wird angenommen, dass dieser Rest als katalytische Base an der ATP-Hydrolyse beteiligt ist. Daher könnte die Variation dieses katalytischen Restes einen Einfluss auf die unterschiedliche ATPase-Aktivität von TAP1 und TAP2 haben. Außerdem hat die TAP1-Sequenz ein Gln anstelle eines

His in der H-Schleife. Das His kontaktiert das γ -Phosphat des ATPs und ist essentiell für den Substrattransport in verschiedenen ABC-Transportern (Shyamala et al., 1991; Hung et al., 1998). Die C-Schleife von TAP2 enthält in Mensch und Gorilla die Sequenz LAAGQ anstelle LSGGQ. Der einzige in allen TAP-Sequenzen streng konservierte Rest in diesem Motiv ist die vierte Aminosäure (Gly), die wie das Ser im Konsensmotiv LSGGQ Wasserstoffbrücken zum γ -Phosphat des ATPs bildet (Smith et al., 2002). Mutationsstudien an anderen ABC-Transportern zeigten, dass der konservierte zweite C-Schleifenrest (Ser) für die ATP-Hydrolyse notwendig ist (Schmees et al., 1999; Szakacs et al., 2001). Außerdem wurde in weiteren Mutationsanalysen deutlich, dass die zweite Position der C-Schleife, die in allen bekannten TAP-Sequenzen entweder ein Ser oder ein Ala ist, die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse und des Peptidtransporters in TAP und möglicherweise auch in anderen ABC-Transportern beeinflusst (Beismann-Driemeyer und Tampé, 2004).

TAP bindet Peptide mit einer Länge von 8-16 Aminosäuren bevorzugt. Allerdings werden Peptide mit einer Länge von 8-12 Aminosäuren am effizientesten transportiert (Momburg et al., 1994a; Heemels and Ploegh, 1994). Dies entspricht der bevorzugten Länge von Peptiden, die durch MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden werden (8-10 Aminosäuren; Elliott et al., 1993). Es wurde in vitro auch beobachtet, dass Peptide mit bis zu 40 Aminosäuren transportiert werden, allerdings mit geringer Effizienz (Koopmann et al., 1996). Peptide, die länger als die an MHC-Klasse-I-Moleküle gebundenen Peptide sind, müssen nach dem Transport im ER durch Proteasen zurechtgeschnitten werden.

Mithilfe von kombinatorischen Peptidbibliotheken konnte gezeigt werden, dass TAP die größte Spezifität für die drei N-terminalen (Position 1-3) und den C-terminalen Rest (Position 9) eines 9 Aminosäuren langen Peptides aufweist (Uebel et al., 1997). Am C-Terminus werden basische (Arg) und hydrophobe (Phe, Tyr) Aminosäuren bevorzugt. An Position 1 werden die Aminosäuren Lys, Arg und Asn bevorzugt, während an Position 2 die Aminosäure Arg favorisiert wird. An Position 3 werden hauptsächlich aromatische Aminosäuren (Trp und Tyr) gefunden. Die sauren Reste Asp und Glu an den Positionen 1 und 3 reduzieren die Bindungsaffinität. Pro an Position 2 oder 3 hat den stärksten Destabilisierungseffekt. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das Peptidrückgrat an dieser Position ebenfalls zur Bindungsaffinität beiträgt (Uebel et al., 1997). Der Einfluss des Peptidrückgrats wurde durch „Positionsabtastung“ genauer untersucht (Uebel et al., 1997). Dafür wurden D-Aminosäuren in Peptiden unterschiedlicher Länge an jeder Position eingefügt. D-Aminosäuren an den Positionen 1 bis 3 und am C-Terminus reduzierten die Bindungsaffinität. Das Rückgrat an diesen Positionen ist also an der Bindung beteiligt. Die Peptide werden möglicherweise außerdem durch Wasserstoffbrücken von den freien N- und C-Termini fixiert (Uebel und Tampé, 1999). Es werden aber auch sterisch ungünstige Peptide, z. B. Peptide mit langen, sperrigen Seitenketten oder Fluoreszenzfarbstoffe, von TAP gebunden und transportiert (Gromme et al.,

1997, Neumann und Tampé, 1999). Die Peptidbindungstasche und Translokationspore scheinen daher flexibel zu sein.

Aufgrund der vorliegenden Daten wird davon ausgegangen, dass Peptide durch Wasserstoffbrücken an ihren freien N- und C-Termini in der Bindungstasche fixiert werden und dass das Rückgrat sowie die Seitenketten der drei N-terminalen Aminosäuren und des C-terminalen Restes zur Gesamtbindungsaffinität beitragen. Die internen Aminosäuren scheinen dagegen nur unbedeutende Wechselwirkungen zur Bindungsstelle auszubilden oder können bei langen oder sterisch anspruchsvollen Peptiden sogar in das Lösungsmittel ragen. Dadurch wird Flexibilität (Peptidgröße und -struktur) mit Spezifität in Bezug auf die N- und C-terminalen Ankerreste kombiniert. Der TZR interagiert im Wesentlichen mit den Resten 5-8 eines an MHC-I gebundenen Nonapeptids, dem Bereich größter Variabilität bei TAP. Deshalb wird die Diversität der vom MHC-I präsentierten und mit dem TZR wechselwirkenden Peptid durch den TAP-Komplex nicht eingeschränkt (Garboczi et al., 1996).

Aufgrund von dimorphen Positionen sind für humanes TAP1 fünf verschiedene Allele und für humanes TAP2 sechzehn bekannt (Powis et al., 1993). Murine TAP1 (b, d, f, k, g7(NOD), cas, und NON) und TAP2 (b, d, f, k, g7, cas, und sw)-Allele sind dimorph an sieben verschiedenen Sequenzpositionen (Marusina et al., 1997). Obwohl diese TAP-Gene polymorphisch sind, wurde ein funktioneller Polymorphismus nur für das Ratten-TAP beobachtet (Powis et al., 1992). Ein gewisser Grad an Polymorphismus wurde für Allele der Ratten-TAP1-Sequenz (a, c, dv1, k, l, n, und u) beobachtet. Zwölf Positionen mit allelischem Dimorphismus befinden sich in diesen sieben Sequenzen (Momburg und Hämmerling, 1998). Das Ratten-TAP2-Molekül zeigt einen signifikanten allelischen Polymorphismus. Durch genomische Typisierung von 14 RT1-Haplotypen konnte gezeigt werden, dass sieben der TAP2-A-Gruppe (a, d, f, g, l, q, s) und sieben der TAP2-B-Gruppe (b, c, h, k, m, n, u) angehören (Joly et al., 1994). Die Sequenzen der TAP2-A- und TAP2-B-Allele unterscheiden sich in 25 Aminosäuren, die sich häufiger in der N-terminalen Hälfte befinden (Powis et al., 1992).

Die allelischen Formen von Ratten-TAP2 weisen unterschiedliche Spezifitäten für die C-terminalen Aminosäuren eines Peptides auf. Ratten-TAP1/TAP2^u- und alle anderen Ratten-TAP1/2-B-Transporter transportieren bevorzugt Peptide, die hydrophobe Aminosäuren am C-Terminus besitzen. Im Gegensatz dazu, transportiert der Ratten-TAP1/TAP2^a- und die anderen Ratten-TAP1/2-A-Transporter auch Peptide mit basischen C-terminalen Aminosäureresten (Heemels et al., 1993; Momburg et al., 1994b). Die Spezifität des murinen TAP entspricht dem restriktiven Ratten-TAP2-B, während humanes TAP und Ratten-TAP2-A die gleiche Spezifität haben und permissiv für Peptide mit hydrophoben und basischen C-Termini sind (Momburg et al., 1994b). Die Sequenzselektion von TAP korrespondiert mit den Präferenzen von menschlichen MHC-Klasse-I-Molekülen, die bevorzugt Peptide mit

hydrophoben oder basischen C-Termini binden. Diese werden von dem permissiven humanen TAP zur Verfügung gestellt. Die C-terminale Ankerposition des MHC-Klasse-I-bindenden Peptids in der Maus ist immer hydrophob. In Übereinstimmung damit transportiert der murine Transporter bevorzugt Peptide mit hydrophobem C-Terminus. In der Ratte weisen die RT1A^a-MHC-Klasse-I-Moleküle eine starke Präferenz für basische Aminosäuren am C-Terminus auf (Powis et al., 1996). Sie werden vom permissiven TAP1/TAP2^a-Transporter mit entsprechenden Peptiden bedient, während die Oberflächenexpression von RT1A^a in Kombination mit dem restriktiven TAP1/TAP2^u-Transporter absinkt, weil die Peptidbelieferung limitierend ist (Powis et al., 1996). Aus den Daten lässt sich schließen, dass sich die Substratspezifitäten von TAP und MHC-Klasse-I-Molekülen koevolutionär entwickelt haben. Der Sequenzpolymorphismus von TAP-Transportern ist in Maus und Mensch gering und zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Substratspezifität (Obst et al., 1995). Zur Identifizierung der spezifitätskontrollierenden Aminosäuren wurden sechzehn verschiedene Ratten-TAP2^axTAP2^u-Hybridmoleküle mit dem TAP1^a-Molekül in TAP-defizienten T2-Zellen exprimiert. Die Analyse der Substratselektion ergab, dass die zytoplasmatisch gelegenen Aminosäuren an Position 217/218 und 374/380 die Spezifität bestimmen (Momburg et al., 1996). In humanem TAP befinden sich die Peptidbindungsstellen in den letzten beiden zytoplasmatischen Schleifen und in einem C-terminalen Abschnitt vor der NBD (Nijenhuis et al., 1996; Nijenhuis and Hämmerling, 1996). Diese identifizierten Regionen schließen die Aminosäuren 374/380 ein, die an der Kontrolle der Substratspezifität beteiligt sind. Die Aminosäuren 217/218 sind nach dieser Studie nicht an der Peptidbindung beteiligt und üben wahrscheinlich einen indirekten Einfluss aus. Die Beteiligung der Aminosäure 374 an der Substratspezifität konnte auch durch eine entsprechende Punktmutation im humanen TAP2 bestätigt werden, die eine veränderte Transportspezifität aufwies (Armandola et al., 1996).

MHC-Klasse-I-Moleküle sind in Abwesenheit von Peptiden instabil. Daher zeigen TAP1-defiziente Mäuse eine ungefähr 90-fach reduzierte MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression und eine etwa 20-fach verringerte CD8⁺-T-Zellzahl (Garbi et al., 2005). Die Generierung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zell-Antworten ist ebenfalls reduziert und zwar in ähnlicher Weise wie die CD8⁺-T-Zellzahl (Van Kaer et al., 1992; Garbi et al., 2000). Auch das Repertoire an CD8⁺-T-Zellen ist in TAP1-defizienten Mäusen beeinträchtigt. Diese Daten deuten an, dass von TAP transportierte Peptide wichtig für einen positiven Einfluss auf die positive Selektion im Thymus sind. Die Tatsache, dass TAP1-defiziente Mäuse ein unterschiedliches CD8⁺-T-Zellrepertoire und CD8⁺ zytotoxische T-Zell-Antwort generieren können (Aldrich et al., 1994), spricht für das Vorhandensein von TAP-unabhängigen Wegen, die allerdings nur einen geringen Beitrag zur MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation leisten. ER-Signalsequenzen von sekretierten Proteinen oder Membranproteinen werden durch den Sec61-Kanal transportiert und kotranslationell durch eine im ER lokalisierte

Signalpeptidase abgespalten. Dies führt zur Freisetzung hydrophober Peptide in das Lumen des ER unabhängig von TAP und zur Beladung von HLA-A2-Molekülen in einer humanen TAP-defizienten Zelllinie T2 (Wei and Cresswell, 1992). Eine andere Quelle TAP-unabhängiger Peptide ist die Degradation von Antigenen durch endosomale Proteasen in dendritischen Zellen. Diese Peptide binden an rezyklierende MHC-Klasse-I-Moleküle in den vesikulären Kompartimenten (Ackerman and Cresswell, 2004).

3.4 Assemblierung des Peptidbeladungskomplexes und Optimierung der Peptidbeladung im ER

Zur Bildung eines stabilen, ternären MHC-I-Komplex aus schwerer Kette, β_2m und dem Peptid sind konzentrierte Interaktionen mit mehreren Hilfsproteinen im ER notwendig.

Die schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls und β_2m werden am rauhen ER synthetisiert und kotranslationell in das ER über den Sec61-Kanal transportiert. Während der Translokation ins ER wird die Signalsequenz durch die im ER lokalisierte Signalpeptidase entfernt. Außerdem wird die schwere Kette kotranslationell N-glykosyliert. Diese neu synthetisierte und ungefaltete schwere Kette assembliert mit dem Chaperon BiP, das die Faltung der schweren Kette unterstützt. Dies erfolgt entweder gleichzeitig oder vor der Bindung an ein zweites Chaperon, Calnexin (Paulsson and Wang, 2003). Calnexin assistiert während der Faltung und fördert die Assemblierung mit β_2m . Die Faltung der schweren Kette und die Assemblierung mit β_2m , sowie die darauffolgende Peptidbeladung kann auch in Abwesenheit von Calnexin bzw. wenn die glykanabhängige Assemblierung mit Calnexin gestört ist, stattfinden (Wright et al., 2004). Die thiolabhängige Oxidoreduktase ERp57 bindet an die unvollständig oxidierte β_2m -freie schwere Kette während früher Calnexin-assoziiierter Stadien und scheint an der korrekten Faltung und Bildung von intrazellulären Disulfidbrücken beteiligt zu sein (Farmery et al., 2000). Die Bindung von ERp57 bewirkt die Dissoziation von BiP. Nach Assoziation mit β_2m wird eine Konformation des MHC-Klasse-I-Moleküls erreicht, die die Bindung eines hochaffinen Peptids erlaubt. Sobald die schwere Kette mit β_2m assoziiert, wird in Mensch Calretikulin gegen Calnexin ersetzt und in Maus Calretikulin zusätzlich an die schwere Kette gebunden. Calretikulin bindet an die α_1 -Domäne des N-Glykans der MHC-Klasse-I-Schwerkette in der monoglukosylierten Form und unterstützt deren Faltung. Danach bindet Tpn an diesen intermediären Komplex und rekrutiert ERp57. Außerdem bildet Tpn ein Brückenglied zwischen dem Schwerkette/ β_2m -Dimer und TAP (Sadasivan et al., 1996). Dieser molekulare Komplex aus Schwerkette/ β_2m , Calretikulin, ERp57, Tpn und TAP (in Maus zusätzlich Calnexin) wird als TAP-assoziiierter Peptidbeladungskomplex bezeichnet (Abb. III. 6).

Für Tpn wurden mehrere wichtige Funktionen im Peptidbeladungskomplex beschrieben. Noch nicht beladene peptid-rezeptive Schwereketten/ β_2m -Dimere werden von Tpn stabilisiert und bis zur Peptidbeladung im ER zurückgehalten (Peh et al., 2000; Grandea et al., 2000). Tpn optimiert die Peptidbindung durch eine Peptideditierungsfunktion, wobei hierfür die von Tpn vermittelte Bindung zwischen TAP und dem Schwereketten/ β_2m -Dimer Voraussetzung ist (Barnden et al., 2000; Tan et al., 2002). Tpn verkürzt als Brückenmolekül die Entfernung zwischen dem Peptid-Donor und Peptid-Akzeptor. Durch Bindung eines optimalen Peptids entsteht ein kinetisch stabiler Komplex aus dem Schwereketten/ β_2m -Dimer und dem Peptid. Dies wiederum führt zu einer längeren Halbwertszeit und Stabilität der MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zelloberfläche. Tpn unterstützt nicht nur die MHC-Klasse-I-Peptidbeladung, sondern erhöht auch das Expressionsniveau von TAP und die Peptidtransportrate ohne die Peptidsubstratspezifität von TAP zu verändern (Lehner et al., 1998; Bangia et al., 1999; Momburg and Tan, 2002). Dieser Stabilisierungseffekt scheint etwas zelltypabhängig zu sein. Eine Transfektion von Tpn in die Tpn-defiziente humane Zelllinie .220 erhöht die TAP-Expression und die Transportrate ungefähr 3- bis 6-fach (Lehner et al., 1998). Dagegen wird in Maus eine etwa 300-fache Reduktion der TAP-Expression und eine Abnahme des Peptidtransports um den Faktor 20 beobachtet (Garbi et al., 2003). Analysen der lateralen Membrandiffusion von fluoreszenzmarkierten TAP1-Molekülen lässt vermuten, dass es Cluster aus mehreren hundert Peptidbeladungskomplexen im ER gibt (Marguet et al., 1999). Tpn liegt ebenfalls in Clustern im ER vor (Pentcheva et al., 2002). Es ist allerdings unklar, ob Tpn während der initialen Faltung von TAP1- und TAP2-Polypeptiden nur assistiert oder auch eine

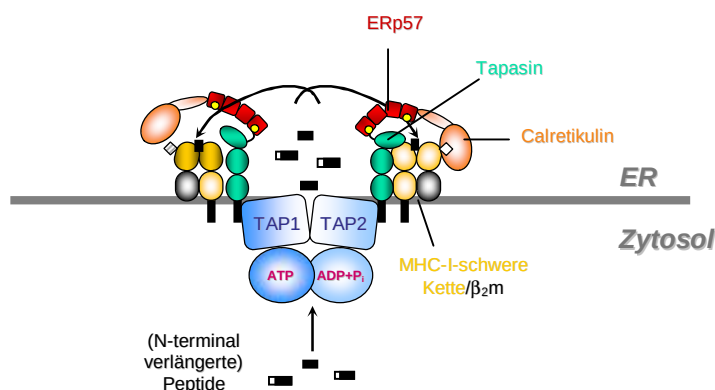


Abb. III. 6: Der TAP-assoziierte Peptidbeladungskomplex

Der Peptidbeladungskomplex besteht aus Schwereketten/ β_2m , Calretikulin, ERp57, Tpn und TAP. In Maus sind die MHC-Klasse-I-Moleküle zusätzlich mit Calnexin assoziiert. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. F. Momburg, DKFZ, Heidelberg)

Denaturierung der TAP-Heterodimere durch kontinuierliche Bindung verhindert. Tapasin-ERp57-TAP-Calnexin-Vorläuferkomplexe existieren vor der Rekrutierung des Schwereketten/ β_2m -Dimers und Calretikulin in den Peptidbeladungskomplex, der nicht länger Calnexin enthält (Diedrich et al., 2001). Das membrangebundene Calnexin-Molekül trägt möglicherweise zusätzlich zu Tpn zu der Bildung des TAP-Heterodimers und der Stabilisierung von TAP bei. Die Assemblierung des Schwereketten/ β_2m -Dimers mit Calretikulin und Tpn (Sadasivan et al., 1996) und die Assemblierung von ERp57 mit β_2m oder Calretikulin (Hughes und Cresswell, 1998) ist in TAP-defizienten Zellen verringert. Auch wurde gezeigt, dass TAP die Assoziation von ERp57 mit Tpn und der schweren Kette verstärkt (Momburg und Tan, 2002). Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, dass der TAP-Heterodimer selbst Strukturmerkmale besitzt, die die Assemblierung von Tpn mit der Schwereketten/ β_2m , Calretikulin und ERp57 unterstützen. Möglicherweise induziert TAP eine Konformationsänderung in Tpn, was wiederum die Rekrutierung der anderen Komponenten des Peptidbeladungskomplexes fördern könnte.

3.5 Peptidbindung an MHC-Klasse-I-Moleküle

TAP transportiert Peptide mit einer Länge von 8-16 Aminosäuren oder sogar längere (siehe Einleitung 3.3). Einige N-terminal verlängerte Vorläuferpeptide haben sogar eine höhere Affinität für TAP als das endgültige Epitop (Neisig et al., 1995; Lauvau et al., 1999). Peptide, die ein Pro an Position 2 oder 3 haben werden weniger effizient durch TAP transportiert, aber sind häufig Liganden für humane und murine MHC-Klasse-I-Moleküle (Rammensee et al., 1993). Die Tatsache, dass längere Peptide transportiert werden als die an MHC-Klasse-I-Moleküle gebundenen Peptide, verdeutlicht den Bedarf an Proteasen im ER.

Die Verwendung von Minigen-kodierten N-terminal verlängerten Peptid-Präkursor, die ins ER von TAP-defizienten Zellen durch Signalsequenzen importiert wurden, bestätigten ein effizientes N-terminales Zurechtschneiden (Powis et al., 1996; Serwold et al., 2001). Es konnte allerdings keine Carboxypeptidaseaktivität im ER nachgewiesen werden (Lobigs et al., 2000). Zwei Gruppen haben unabhängig voneinander eine Aminopeptidase identifiziert, die als ER-Aminopeptidase 1 (ERAP1) oder ER-assoziierte Aminopeptidase (ERAAP) bezeichnet wird (Saric et al., 2002; Serwold et al., 2002). Die durch IFN- γ induzierbare Zink-abhängige Aminopeptidase ERAP1 hat eine breite Gewebeverteilung und ist, wie viele andere Aminopeptidasen, in der Lage vom N-Terminus so gut wie alle Aminosäuren zu entfernen außer solcher auf die Pro folgt (X-Pro) (Serwold et al., 2002). ERAP1 besitzt die besondere Eigenschaft, dass es Peptide mit einer Länge von 9-16 Aminosäuren und hydrophoben C-Termini bevorzugt (Chang et al., 2005). Dies entspricht der Substratlänge und Sequenzbevorzugung von TAP. Die N-terminal

verlängerten Peptide werden auf 8-9 Aminosäuren getrimmt. Ein weiteres Zurechtschneiden erfolgt langsamer oder gar nicht mehr (York et al., 2002). Die Fähigkeit, Peptide mit mehr als 9 Aminosäuren zu trimmen, kann zur Zerstörung eines potentiellen Liganden führen und daher zu einer verminderten MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression (York et al., 2002). ERAP1 kontrolliert den Charakter des C-Terminus und bindet hydrophobe C-Termini 9-16 Aminosäuren entfernt von der aktiven Seite (Chang et al., 2005). Die meisten von ERAP1 produzierten Peptide sind somit optimal für die MHC-Klasse-I-Beladung. Die Blockade der ERAP1-Funktion führte zu einer reduzierten Antigenpräsentation (Serwold et al., 2002; York et al., 2002). Eine zweite, weniger gut charakterisierte, ER-lokalisierte Aminopeptidase, ER-Aminopeptidase 2 (ERAP2), scheint auch an der Peptidprozessierung beteiligt zu sein und ist zu ERAP1 homolog (Tanioka et al., 2003). Die Gewebeverteilung der durch IFN- γ induzierbaren Aminopeptidase ERAP2 ist allerdings geringer als bei ERAP1. ERAP2 schneidet bevorzugt basische Dipeptide (Lys und Arg) (Tanioka et al., 2003). Von Oligopeptiden kann ERAP2 so gut wie jeden N-terminalen Rest entfernen (Rock et al., 2004). In vitro stoppt ERAP2 das Trimmen nicht nach Erreichen einer Substratlänge von 8-9 Aminosäuren und in lebenden Zellen scheint ERAP2 die MHC-Klasse-I-Expression daher eher zu vermindern (Rock et al., 2004). In Maus-Zellen kann ERAP1 alle die von TAP bevorzugt transportierten und von MHC-Klasse-I präferentiell gebundenen Peptide mit hydrophobem C-Terminus prozessieren. In menschlichen Zellen dagegen kann ERAP1 nur die Peptide mit hydrophobem C-Terminus prozessieren. Die Peptide mit basischem C-Terminus werden vermutlich daher unabhängig von ERAP1 durch das Proteasom oder durch zytosolische Aminopeptidasen hergestellt (Stoltze et al., 2000; Beninga et al., 1998). Es wird jedoch vermutet, dass aber auch ERAP2 daran beteiligt sein kann, da ERAP2 nur im Mensch vorkommt, keine hydrophoben C-Termini benötigt und auch Peptide mit basischen C-Termini N-terminal prozessieren kann (Chang et al., 2005). Der molekulare Mechanismus, durch den Tpn das Spektrum an MHC-Klasse-I gebundenen Peptiden beeinflusst, wird derzeit diskutiert und ist spekulativ. Mit Hilfe von konformationsabhängigen Antikörpern wurde gezeigt, dass im Peptidbeladungskomplex vorherrschend unreife, Peptid-rezeptive MHC-I-Konformationen vorhanden sind (Carreno et al., 1995; Yu et al., 1999). Tpn bindet vermutlich an eine spezielle MHC-Klasse-I-Konformation, die die vorstehende α_2 -Domänenschleife 128-137 der schweren Kette und die Kontaktstelle zu β_2m involviert. Diese Konformation ist charakteristisch für eine unreife, nicht vollständig geschlossene Konformation, die durch suboptimale Peptide oder von leeren MHC-I-Molekülen induziert wird. Die α_2 -1-Helix (die α_2 -Helix enthält die α_2 -1-, α_2 -2- und α_2 -3-Teilhelices), welche sich in der Nähe der Tpn-Bindungsstelle befindet, ist an der Bindung des Peptid-C-Terminus beteiligt. Beide Peptidenden sind in einem Netzwerk von Wasserstoffbrücken gebunden. Diese Wasserstoffbindungen binden das Peptid an das β -Faltblatt und an beide seitlichen Helices der Bindungsgrube, so dass beide

Peptiden die Struktur der α_1/α_2 -Domäne stabilisieren. In Abwesenheit von Peptiden ist die MHC-I-Region, die den Peptid-N-Terminus bindet, eher starr (Zacharias and Springer, 2004). Bei Peptidbindung zeigen die Ammoniumgruppen des N-Terminus nach unten in Richtung Boden des β -Faltblattes und formen Wasserstoffbrückenbindungen, die nicht ausgetauscht werden können und daher eher unflexibel sind (Madden, 1995). Die Interaktion zwischen dem N-Terminus des Peptides und MHC-I ähnelt einer Schlüssel-Schloss-Interaktion. Im Gegensatz zu der starren N-terminalen Region der Peptidbindungsgrube ist der Teil der Bindungsgrube am C-Terminus des Peptids in Abwesenheit eines Peptids flexibler und seine Orientierung wird durch die C-terminalen Reste des Peptides beeinflusst (Zacharias and Springer, 2004). Wenn das Peptid bindet, wird die Seitenkette seiner letzten Aminosäure in einer tiefen Tasche (F-Tasche) gebunden. Die terminale Carboxylgruppe zeigt nach oben und die Wasserstoffbrückenbindungen, die diese hält, sind an der Oberfläche des Peptid-MHC-I-Komplexes. Peptide mit längerem C-Terminus können aufgrund des flexiblen C-Terminus der Peptidbindungsgrube relativ stabil gebunden werden und ragen über die Furche heraus. Längere Peptide können auch durch Knicken des Peptidrückgrats gebunden werden. Da der Teil der α_2 -Helix, der den C-Terminus des Peptids bindet, flexibler ist und sich in der Nähe der Bindungsstelle für Tpn befindet, wird angenommen, dass Tpn eine Konformationsänderung in dieser Region bewirken kann (Wright et al., 2004). Durch die Interaktion von Tpn mit der exponierten α_2 -Schleife könnte Tpn eine nach außen gerichtete Bewegung der α_2 -1-Helix (vollständig geöffnete Form des MHC-I) bewirken, was den Verlust der Wasserstoffbindungen zum C-Terminus des Peptids zur Folge hätte und daher den Peptidaustausch ermöglichen würde (Elliot, 1997; Wright et al., 2004). Nur hoch affine Peptide, die eine geringe Dissoziationsrate haben, könnten dann eine reife Konformation (geschlossene Form) induzieren und einen stabilen ternären Komplex bilden an den Tpn nicht mehr binden kann. Die Folge ist die Ablösung des Schwereketten/ β_2m -Peptid-Komplexes von Tpn-TAP.

Die von TAP transportierten Peptide, die kein geeignetes MHC-Klasse-I-Molekül für eine stabile Assoziation finden, werden aus dem ER eliminiert. An der Entsorgung der überschüssigen Peptide aus dem ER sind peptidbindende Chaperone wie die PDI, aber auch das gp96, das ein Mitglied der Hitzeschockproteinfamilie 90 ist, beteiligt (Koopmann et al., 2000). Die Bindung von ATP induziert eine Konformationsänderung in beiden ER-Chaperonen, was die Freisetzung der gebundenen Peptide über den Sec61-Kanal aus dem ER zur Folge hat (Koopmann et al., 2000). Diese Peptide können durch andere zytosolische Peptidasen degradiert werden.

3.6 Export und Rezeptoranbindung an MHC-Klasse-I-Moleküle

Neu synthetisierte Proteine aus dem ER werden zum Golgi-Apparat transportiert, einem Stapel aus abgeflachten Membransäcken (Zisternen). Der Golgi-Apparat hat zwei wichtige Funktionen: Erstens werden hier die Kohlenhydrateinheiten der Glykoproteine modifiziert. Zweitens ist der Golgi-Apparat das wichtigste Sortierungszentrum der Zelle. Der Golgi-Apparat wird in einen cis-, medianen und trans-Golgi-Bereich und das cis- und trans-Golgi-Netzwerk eingeteilt. Der Export von Proteinen und auch im speziellen von MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen vom ER zum cis-Golgi-Netzwerk erfolgt über COP-II-Vesikel, die durch Abschnürung der ER-Membran entstehen (Mancias and Goldberg, 2005; Antonny and Schekman, 2001). COP-I-Komplexe binden zytoplasmatische Zurückführungssignale und sind für den Rücktransport von Proteinen vom cis-Golgi-Netzwerk verantwortlich (Duden, 2003). Tpn, dass ein Zurückführungsmotiv besitzt, assoziiert vermutlich mit COP-I-Vesikeln und fungiert als Frachtrezeptor, um nicht korrekt gefaltete MHC-Klasse-I-Moleküle vom cis-Golgi-Netzwerk in das ER zurückzutransportieren (Paulsson et al., 2002) (siehe auch Einleitung 3.1.4.). Im cis-Bereich werden drei Mannosereste von den Oligosaccharidketten solcher Proteine entfernt, die für die Sekretion oder für die Plasmamembran bestimmt sind. Die Kohlenhydrateinheiten von Glykoproteinen, die zum Lumen der späten Endosomen und dann zum Lysosomen transportiert werden, werden zum Mannose-6-Phosphat phosphoryliert. Im mittleren Golgi-Bereich werden zwei weitere Mannoseeinheiten entfernt und drei N-Acetylglucosamine und ein Fucoserest angefügt. Schließlich kommen im trans-Golgi-Bereich drei Galaktosen hinzu, der drei Sialinsäuren folgen. Damit ist die Prozessierung der Glykoproteine vollständig und ein reifes Protein entstanden.

Die im trans-Golgi-Netzwerk lokalisierte Endopeptidase Furin ist ein Mitglied der Subtilysin Familie, die nach polybasischen Motiven schneidet und an der Generierung von einigen MHC-I präsentierten Peptiden beteiligt ist (Gil-Torregrosa et al., 2000). Solch ein Motiv ist in der sekretierten Form des Hepatitis-B-Virus-Core-Genprodukts vorhanden (Gil-Torregrosa et al., 2000). In TAP-defizienten Zellen setzt Furin ein Fragment aus einem chimären Hepatitis-B-Virus-Kernprotein frei, in das ein MHC-I-Ligand eingesetzt wurde. Das Fragment wird auf ungeklärte Weise bis zum Antigenpeptid weiter prozessiert.

Vom trans-Golgi-Netzwerk aus werden die Proteine auf verschiedene Transportvesikel verteilt und an ihren entgeltigen Bestimmungsort (Plasmamembran, Lysosomen, sekretorische Vesikel) gebracht. Der Mannose-6-Phosphat-Rest an lysosomalen Enzymen wird durch den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor der trans-Golgi-Netzwerkmembran erkannt und gebunden. Vesikel mit diesem Protein-Rezeptor-Komplex schnüren sich ab und werden über die späten Endosomen zu den

Lysosomen transportiert. MHC-Klasse-I-Moleküle, wie auch andere Plasmamembranproteine, gelangen durch das trans-Golgi-Netzwerk direkt vom Golgi-Apparat zu der Plasmamembran. Die Expression eines MHC-Klasse-I-Moleküls auf der Plasmamembran schafft die Voraussetzung zur Erkennung einer Zelle durch zytotoxische T-Zellen. Dabei interagiert sowohl der TZR als auch der CD8-Korezeptor mit dem MHC-Klasse-I-Komplex. Kristallstrukturen verdeutlichen, dass der TZR direkt Kontakt mit der Peptidbindungsgrube aufnimmt, wobei die $V\alpha$ -Domäne des TZR wohl mit der α_2 -Helix des MHC-Klasse-I-Moleküls und die $V\beta$ -Domäne mit der α_1 -Helix Kontakt aufnimmt. Dabei finden Wechselwirkungen mit bestimmten exponierten Aminosäureseitenketten des Peptids statt. Der CD8-Korezeptor bindet im Bereich der α_2 - und α_3 -Domäne des MHC-Klasse-I-Moleküls und hat Kontakt mit β_2m . Diese Interaktionen dienen der stärkeren Assoziierung von zytotoxischen T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen. Die Bindung des TZR an MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe kann dann die Sekretion zytotoxischer Proteine und Zytokine durch die T-Zelle auslösen, die zum Zelltod einer APZ führen. In Abbildung III. 7 ist eine Übersicht und Zusammenfassung des im Text beschriebenen MHC-Klasse-I-Weges dargestellt.

4. Zielsetzung

Im MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg spielt Tpn im Peptidbeladungskomplex eine zentrale Rolle. Tpn bindet einerseits über seine ER-luminale Domänen an MHC-Klasse-I-Schwerkette/ β_2m -Heterodimere und andererseits an die Untereinheiten von TAP1 und TAP2. Dadurch wird die Distanz zwischen dem Peptidtransporter TAP und dem peptidbindenden MHC-Klasse-I-Molekül verkürzt. Die Bindung an TAP durch Tpn ist unabhängig von der Bindung an MHC-Klasse-I (Bangia et al., 1999; Momburg and Tan, 2002).

Die Peptidtransporter-Untereinheiten, TAP1 und TAP2, sind polytope Polypeptide in der Membran des ER. Die hydrophoben N-terminalen Domänen werden wahrscheinlich in TAP1 durch 4 TM und in TAP2 vermutlich durch 3 TM gebildet (Abele und Tampé, 1999; Koch et al., 2004; Schrodtt et al., 2006). Jede Untereinheit besteht außerdem wahrscheinlich aus 6 TM, die zusammen die Peptidtranslokationspore bilden, sowie einer C-terminalen, hydrophilen, zytosolischen NBD, die die Energie für den Peptidtransport durch ATP-Hydrolyse liefert. An einen TAP-Heterodimer binden vier Tpn-Moleküle (Ortmann et al., 1997). Humane und Ratten-TAP-Heterodimere, denen beide N-Domänen fehlen, assoziieren nicht mehr mit Tpn (Koch et al., 2004; Procko et al., 2005; Leonhardt et al., 2005). Dies deutet an, dass sich die Tpn-Bindungsstellen innerhalb der N-terminalen Domänen des TAP-Heterodimers befinden. Die exakte Lokalisation ist allerdings unbekannt. Auch ist unklar, ob beide TAP-Untereinheiten in gleicher Weise

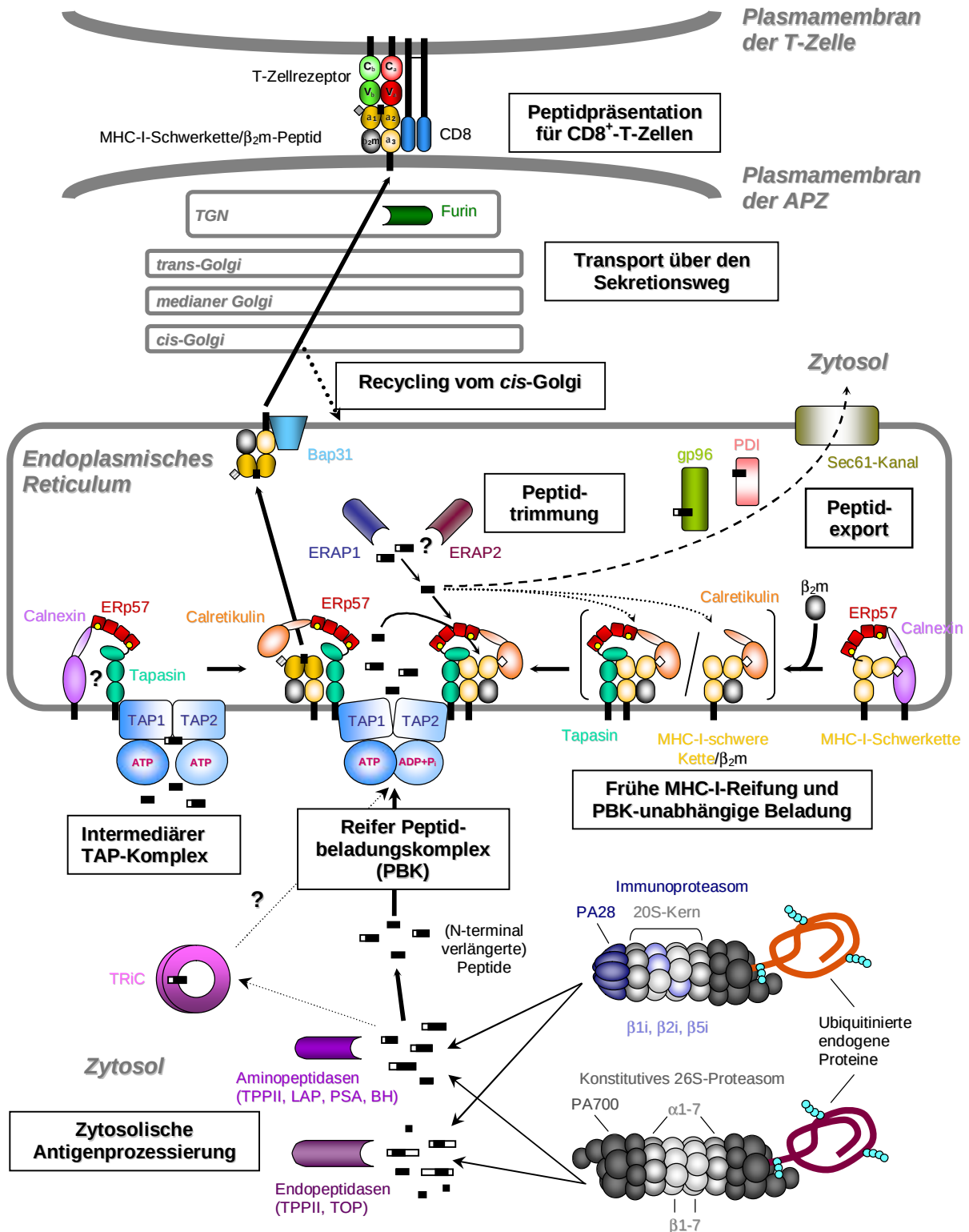


Abb. III. 7: Übersicht des MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweges
(Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. F. Momburg, DKFZ, Heidelberg)

von Tpn in Bezug auf die Stabilisierung abhängig sind. In der vorliegenden Arbeit sollte daher mit Hilfe von C-terminalen EGFP-markierten TAP1- und TAP2-Polypeptiden aus Ratte und Maus und EGFP-markierten N-terminal verkürzten TAP1- und TAP2-Deletionsmutanten untersucht werden, welche TAP-Untereinheit am meisten von Tpn abhängig ist. Diese TAP-Untereinheit sollte danach zur Ablesung der Tpn-vermittelten TAP-Stabilisierung verwendet werden. Für die Untersuchung wurden die entsprechenden Konstrukte in murine Tpn^{-/-} (MC4) und TAP1^{-/-} (MCB6TAP1^{-/-})-Fibroblastenzellen transient transfiziert und anschließend analysiert.

Tpn bindet über seine TMD und zytoplasmatische Domäne an TAP und erhöht damit das TAP-Expressionsgleichgewichtsniveau (Lehner et al., 1998; Bangia et al., 1999; Tan et al., 2002; Momburg and Tan, 2002). Es ist jedoch kaum verstanden wie Tpn seine TAP-Stabilisierungsfunktion ausübt. Bisherige Mutationensanalysen zeigten, dass Lys und Leu in der mutmaßlichen TM von humanem Tpn an der TAP1-Stabilisierung beteiligt seien (Tan et al., 2002; Peterson et al., 2005). Eine entsprechende Lys zu Ala Mutation in der TM von murinem Tpn resultierte ebenfalls in einer reduzierten TAP-Stabilisierung (Peterson et al., 2005). Die Tatsache, dass die TAP-Stabilisierung durch diese Tpn-Mutanten nicht vollständig aufgehoben war, ließ vermuten, dass ein Motiv und nicht einzelne Aminosäurereste in der TM von Tpn an der TAP-Stabilisierung beteiligt sind. Es sollte daher durch Expression verschiedener Tpn-Mutanten in der murinen Tpn-defizienten MC4-Zelllinie eine detaillierte Analyse potentieller Aminosäuren oder Motive in der TMD, die an der Stabilisierung von TAP beteiligt sein könnten, durchgeführt werden. Ebenso sollte das N-terminal an die TMD von Tpn angrenzende Verbindungspeptid in Bezug auf TAP-stabilisierende Eigenschaften untersucht werden.

IV. Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Analysewaage	AND HF-AE 163 Feinwaage Mettler AE 163 Köttermann
Autoklav	H+P Varioklav® Dampfsterilisator
Bohrloch-Gammazähler	EG & G Berthold LB 5320 UniRad
Brutschränke	Heraeus (Hanau)
Computer	Apple (München), Microsoft HP (Böblingen), Microsoft
Dokumentationssystem für Agarosegele	Konrad Benda (Wiesloch) Schroeder OHG (Wiesloch)
Elektrophoresekammer	GIBCOBRL, Model H5
Elektroporationsgerät	BTX Inc. (San Diego)
Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (FACS) Calibur	Becton Dickinson (Heidelberg)
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss (Jena)
Heiz- und Schüttelblock	Eppendorf Thermomixer 5436 (Hamburg)
Inkubationsschüttler G25	New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA)
Lumi-Imager	Roche-Boehringer (Mannheim)
Magnetrührer	Heidolph MR 2000 Janke & Kunkel (Staufen)
Mikroskop	Leitz (Wetzlar)
Neubauer-Zählkammer	HBG Precicolor
Semi-dry Blot-Apparatur	CTI (Idstein)
Spannungsgerät	Consort E861 Power Pac 3000 (Bio-Rad)
Spektrophotometer	Genesys 10 UV Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech (Freiburg)
pH-Meter	Knick pH-Meter 766
Polymerase-Kettenreaktions (PCR)-Gerät	MJ Research, PTC-200
Proteingel-Elektrophoresekammer	Bio-Rad (München)
Sterilbank	ICN Biomedical, BSB4A

Vortexer
Zentrifugen

Heidolph REAX 2000
Eppendorf centrifuge 5415R
Biofuge (Heraeus Sepatech)
Sorvall RC-5B Plus (Hanau)
Minifuge RF (Heraeus Sepatech)

1.2 Verbrauchsmaterialien

6/96-Loch-Platten
Deckgläser
Einfrierröhrchen
Elektroporationsküvetten
Gewebekulturflaschen
Gewebekulturschalen
Glasplatten
Handschuhe
High performance chemiluminescence film
Küvetten
Objektträger
Petrischalen
Pipettenspitzen
Plastikröhrchen
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran
Reaktionsgefäße
Western Blot-Papier

TPP (Renner Dannstadt)
R. Langenbrink (Emmendingen)
Nunc (Wiesbaden)
Bio-Rad (München)
TPP (Renner Dannstadt)
TPP (Renner Dannstadt)
Bio-Rad (München)
Safeskin (Neufahrn)
Amersham Pharmacia (Freiburg)
UV 6040, 10 mm, Bio-Rad (München)
R. Langenbrink (Emmendingen)
TPP (Renner Dannstadt)
Gilson (Langenfeld)
TPP (Renner Dannstadt)
Millipore (Eschenborn)
Eppendorf (Hamburg)
Schleicher & Schüll (Dassel)

1.3 Chemikalien

6-Aminocapronsäure
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)
6 x DNA-Probenpuffer
 β -Mercaptoethanol
Acrylamid-Fertiglösung
Adenosintriphosphat (ATP)
Agar
Agarose für Elektrophorese
Amoniumpersulfat (APS)
Ampicillin
Azeton
Bromphenolblau

Sigma (Taufkirchen)
Sigma (Taufkirchen)
MBI Fermentas (St. Leon Rot)
Merck (Darmstadt)
Roth (Karlsruhe)
Sigma (Taufkirchen)
Invitrogen (Karlsruhe)
BRL (Gaithersburg, USA)
Merck (Darmstadt)
Sigma (Taufkirchen)
Sigma (Taufkirchen)
Merck (Darmstadt)

Calciumchlorid (CaCl_2)	Merck (Darmstadt)
Chloramin T	Merck (Darmstadt)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Ciprobay	Bayer (Leverkusen)
Concanavalin A-Sepharose	Amersham Pharmacia (Freiburg)
D-Phosphat-gepufferte Salzlösung (D-PBS)	Invitrogen (Karlsruhe)
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$)	Merck (Darmstadt)
Digitonin (wasserlöslich)	Riedel de Haén (Seelze)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Essigsäure	Riedel de Haén (Seelze)
Ethanol	Riedel de Haén (Seelze)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetra- essigsäure (EGTA)	Sigma (Taufkirchen)
Expand High Fidelity Puffer mit 15 mM MgCl_2	Roche Diagnostics (Mannheim)
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom (Berlin)
Fungizone	Invitrogen (Karlsruhe)
Genitacin	Sigma (Taufkirchen)
Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Gerbü (Haiberg)
Hefeextrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
IFN- γ	Roche Diagnostics (Mannheim)
Isopropanol	Riedel de Haén (Seelze)
Kaliumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Sigma (Taufkirchen)
Magermilchpulver	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck (Darmstadt)
Methanol	Riedel de Haén (Seelze)
N, N, N', N' -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma (Taufkirchen)
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethan- sulfonsäure-Natriumsalz (HEPES)	Roth (Karlsruhe)
$\text{Na}^{[125]\text{J}}$	Amersham (Braunschweig)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe)
Natriumazid (NaN_3)	Merck (Darmstadt)

Natriumbisulfid ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	Sigma (Taufkirchen)
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel de Haën (Seelze)
Natriumcitrat	Fluka (Buchs)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (Taufkirchen)
Natronlauge (NaOH)	J.T. Baker (Griesheim)
Nichtessentielle Aminosäuren	Invitrogen (Karlsruhe)
Nonidet-P40	Fluka (Buchs)
Opti-MEM® Serumfreies Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Proteinaseinhibitor-Tabletten	Roche Diagnostics (Mannheim)
Pyruvat	Invitrogen (Karlsruhe)
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva (Heidelberg)
Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)	Invitrogen (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl)	J.T. Baker (Griesheim)
SDS-Standard Marker	Bio-Rad (München)
Streptolysin-O	Murex Diagnostics Ltd. (Dartford, GB)
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrat	KMF/Pierce (St. Augustin)
T4-DNA-Ligase-Puffer	MBI Fermentas (St. Leon Rot)
T4-Polymerase-Puffer	MBI Fermentas (St. Leon Rot)
Trihydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma (Taufkirchen)
Triton X-100	Merck (Darmstadt)
Trypanblau-Lösung	Fluka (Buchs)
Trypton	Roth (Karlsruhe)
Tween-20	Sigma (Taufkirchen)
Wasserstoffperoxid	Merck (Darmstadt)

1.4 DNA

1.4.1 Vektor

pcDNA3.1(+/-)	Invitrogen (Karlsruhe)
pEGFP-N1	Clontech (Heidelberg)
pEGFP-N3	Clontech (Heidelberg)
pBluescript II KS+	Stratagene (Heidelberg)

1.4.2 cDNA

Alle Primer, die für die Generierung der cDNA-Konstrukte verwendet wurden, sind in der Primer-Liste in Abschnitt 1.4.2.5 im Material- und Methodenteil aufgeführt.

1.4.2.1 Ratten (r)-TAP-cDNAs

Folgende für TAP kodierende cDNAs wurden mir freundlicherweise von Dr. P. Tan (Tan, 1997) und PD Dr. F. Momburg (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt:

- rTAP1^a(1-725)
- rTAP1^a(1-711)-L7-EGFP
- rTAP1^a-ΔN(149-711)
- rTAP1^a-ΔN(149-711)-L7-EGFP

- rTAP2^u(1-703)
- rTAP2^u(1-692)-L9-EGFP
- rTAP2^u-ΔN(138-692)
- rTAP2^u-ΔN(138-692)-L9-EGFP

Die Konstrukte befanden sich alle in dem Expressionsvektor pEGFP-N3.

1.4.2.2 Murine (m) TAP-cDNAs

Mutagenisierte mTAP1/2-cDNAs wurden schrittweise in pBluescript II KS+ zusammengefügt und anschließend entweder in den Expressionsvektor pcDNA3.1+ oder in den Expressionsvektor pEGFP-N1 subkloniert. PCR-Produkte und In-frame-Ligationen nach DNA-Polymerase-Auffüllreaktionen wurden durch Sequenzierung verifiziert.

Die mTAP1-Wildtyp-cDNA wurde als *Bsp68I*-*XhoI*-Insert und die mTAP2-Wildtyp-cDNA wurde als *KpnI*-*SalI*-Insert aus pBluescript II KS+ Plasmiden herausgeschnitten und in die Multicloning site von pcDNA3.1+ subkloniert. Für die Herstellung von C-terminal mit EGFP-verknüpften mTAP1 und mTAP2 wurden zunächst die mTAP1-forward (fwd) und mTAP1-reverse (rev)-Primer bzw. mTAP2-fwd und mTAP2-rev in einer PCR eingesetzt, um Fragmente von mTAP1 bzw. mTAP2 ohne Stopcodon zu erzeugen. Die PCR-Produkte wurden als *Bsp68I*-*KpnI*- bzw. *Bsp120I*-*KpnI*/*XbaI*-Fragmente in die Wildtyp-cDNAs eingesetzt. Die mit dem mTAP1/2-rev-Primern eingeführte *KpnI*-Schnittstelle wurde zusammen mit der *KpnI*-Schnittstelle in der Multicloning site von pEGFP-N1 verwendet, um mTAP2 ohne Stopcodon in pEGFP-N1 zu subklonieren. mTAP1 wurde in 2 Schritten mit *SacI*-*KpnI*- und *KpnI*-*KpnI*-Fragmenten in pEGFP-N1 überführt.

Durch Ligation der *Bsp68I*- und *EheI*-Schnittstellen in der mTAP1-cDNA wurde mTAP1ΔN(148-724) hergestellt, welches Codon 148 (Met) als neues Startcodon benutzt. mTAP1ΔN(148-724) wurde in Form einer *SacI*-*KpnI*-5'-Teilsequenz in pcDNA3.1+/mTAP1 bzw. pEGFP-N1/mTAP1 ligiert. Um mTAP2-ΔN(MV120-703)

herzustellen, wurde zunächst ein *Bpu1102I*-*Bpu1102I*-Fragment aus der mTAP2-Wildtyp-cDNA in die *M/SI*-Schnittstelle eines Plasmids (pFM2011.3) ligiert, das ein neues Met-Startcodon mit Kozak-Konsensusumgebung (plus ein Val) N-terminal von Aminosäure 120 in der mTAP2-Sequenz generierte. Dieses Konstrukt wurde in Form einer *NheI*-*XhoI*-5'-Teilsequenz in pcDNA3.1+/mTAP2 bzw. pEGFP-N1/mTAP2 überführt.

1.4.2.3 humane (h) Tpn-cDNAs

Folgende, für hTpn-Punktmutanten kodierende cDNAs wurden mir freundlicherweise von PD Dr. Frank Momburg (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt: Wildtyp-hTpn, hTpn-K428V, hTpn-L430F (Tan et al., 2002) sowie die N-Glykosylierungsdefektmutante hTpn-N233Q. Diese hTpn-Mutanten wurden in den Expressionsvektor pcDNA3.1- kloniert.

Außerdem wurden Doppelstrangnukleotide, die für die Mutation E411S oder E411K/D412N in der hTpn-Sequenz kodieren, mit Hilfe der Primer hTpn-E411S-fwd und hTpn-E411S-rev bzw. hTpn-E411K/D412N-fwd und hTpn-E411K/D412N-rev generiert. Die Doppelstrangnukleotide wurden anschließend zwischen *Bsp120I* und *Eco147I* in pBluescript II KS+ (Δ *Bsp120I*) mit dem hTpn[*BsrGI*-*BamHI*]-Fragment ligiert. Die mutagenisierten hTpn-Fragmente wurden nach Sequenzierung mittels der Schnittstellen *Eco47III* und *BamHI* in pcDNA3.1-/hTpn subkloniert.

1.4.2.4 mTpn-cDNAs

Die hier aufgeführten cDNAs, die für mutierte mTpn-Sequenzen kodieren, wurden schrittweise in pBluescript II KS+ zusammengefügt und in den Expressionsvektor pcDNA3.1+ subkloniert. Die mTpn-cDNA in pBluescript II KS+ und pcDNA3.1+ wurde von PD Dr. F. Momburg zur Verfügung gestellt (Tan et al., 2002).

Zur Generierung der natürlich vorkommenden Spleißvariante von mTpn, die ein zusätzliches Val an Position 436a hat, wurde ein von PD Dr. F. Momburg generiertes PCR-Fragment eingesetzt, das mit Hilfe der Primer mTpn-5'-IP2 und mTpn-GSP-3' in einer PCR-Reaktion an einer BALB/c Milzzell-cDNA-Bibliothek (Marathon-Ready Library, Clontech) generiert wurde. Das PCR-Produkt wurde in pBluescript II KS+ zwischen *XbaI* (mTpn) und *BamHI* (pBluescript II KS+) kloniert, sequenziert und anschließend zwischen die Schnittstellen *XbaI* (mTpn) und *XbaI* (pcDNA3.1+) subkloniert.

Um die im folgenden beschriebenen Mutationen in mTpn zu generieren, wurde zunächst mittels PCR-Reaktionen mit den Primern mTpn-*Eco147I*-fwd und mTpn-*Bsp119I*-rev die Schnittstellen *Eco147I* und *Bsp119I* in ein C-terminales *XbaI*-*HindIII*-Fragment der mTpn-cDNA am 5'- und 3'-Ende, der für die TMD-Sequenz kodiert, eingeführt, um später diverse mutierte Doppelstrangoligonukleotide einfügen zu

können. Unter Verwendung des fwd-Primers mTpn-5'-IP2 und spezifischer rev-Primer, die für die Mutationen G428I, K431L, L433F, W435L, Y439A, Y439A/W440L, G428I/K431A/W435L in der TMD von mTpn kodieren, wurden PCR-Produkte generiert, die nach Schneiden mit *Xba*I und *Bsp*119I in pBluescript II KS+/mTpn(*Eco*147I/*Bsp*119I⁺) eingeführt wurden. Entsprechende, in der Primer-Liste angegebene Einzelstrangoligonukleotide wurden zusammen mit dem rev-Primer mTpn-TMD-short-rev in T4-Polymerase/Kinase-Reaktionen verwendet, um Doppelstrangnukleotide für die mTpn-TMD-Mutationen K431A, K431D, K431E, K431G, K431Q, F420V/F424A, F424A, F420V/F424A/G428I/K431A (FFGKmut), F424A/G428I/K431A/W435L (FGKWmut) herzustellen, die zwischen *Eco*147I und *Bsp*119I in pBluescript II KS+/mTpn(*Eco*147I/*Bsp*119I⁺) kloniert wurden. Um zwei mTpn-Konstrukte mit jeweils einer Fünffachmutation im Verbindungspeptid (CP) und TMD zu generieren wurden *Eco*147I-*Hind*III-Fragmente aus Konstrukten mit mTpn-F424A/G428I/K431A/W435L bzw. mTpn-F420V/F424A/G428I/K431A in pBluescript II KS+(Δ *Bsp*120I)/mTpn-E414S subkloniert.

Das für eine nach Aminosäure K431 deletierte mTpn-TMD kodierende Doppelstrangnukleotid wurde mit den Primern mTpn-TMD-short-fwd und mTpn-TMD-short-rev in einer T4-Polymerase/Kinase-Reaktion erzeugt und ebenfalls zwischen *Eco*147I und *Bsp*119I kloniert. Das mit den Primern mTpn-5'-IP2 und mTpn-K463A/K464A-rev generierte PCR-Produkt mit mutiertem KKSQ-ER-Retentionssignal wurde in pBluescript II KS+(Δ *Spe*⁺*Sac*I)/mTpn zwischen *Xba*I und *Hind*III kloniert. Um Doppelstrangoligonukleotide mit den Mutationen E414K/D415N, E414S/E415S, E414S, D415 im CP von mTpn zu generieren, wurden die entsprechenden in der Primer-Liste angeführten, kodierenden und Gegenstrangnukleotide hybridisiert. Kinasierte Doppelstrangnukleotide wurden dann zwischen *Bsp*120I und *Eco*147I in pBluescript II KS+(Δ *Bsp*120I)/mTpn (*Eco*147I/*Bsp*119I⁺) ligiert.

Für den Austausch der TMD von mTpn gegen heterologe TMD aus Huhn-Tpn, aus Zebrafisch-Tpn (2 unterschiedlich lange Varianten, die kürzere Variante auch mit 3 hydrophoben Austauschen entsprechend der mTpn-Sequenz (V410₂F/A411₂L/L414₂F; Nummerierung entsprechend der Zebrafisch(z)-Tpn-Sequenz), aus hCalnexin (CNX) sowie aus dem hTpn-verwandten (hTpn-R)-Protein wurden entsprechende fwd- und rev-Primer hybridisiert (siehe Primer-Liste), durch T4-DNA-Polymerase aufgefüllt, kinasiert und zwischen *Eco*147I und *Bsp*119I in pBluescript II KS+/mTpn(*Eco*147I/*Bsp*119I⁺) kloniert. Für ein Konstrukt mit CP und TMD von hCNX wurde ein entsprechendes Doppelstrangoligonukleotid zwischen *Bsp*120I und *Bsp*119I in pBluescript II KS+/mTpn(*Eco*147I/*Bsp*119I⁺) kloniert. Der hTpn-R-TMD-fwd-Primer wurde so konstruiert, dass das mit dem hTpn-R-TMD-rev-Primer resultierende Doppelstrangoligonukleotid entweder mit *Bsp*120I oder mit *Eco*147I geschnitten werden konnte und so korrekt in diese Schnittstellen in pBluescript II KS+/mTpn(*Eco*147I/*Bsp*119I⁺) ligiert werden konnte. Das *Bsp*120I-

Konstrukt enthielt das CP und die TMD des hTpn-R-Proteins, das *Eco147I*-Konstrukt nur die TMD des hTpn-R-Proteins. In der Rückmutation hCnx-TMD (mTpn-FGKW-Motiv) wurde in die C-terminal leicht verkürzte TMD von hCNX die mTpn-Aminosäuren F424/G428/K431/W435 in den Sequenzkontext der hCNX-TMD im äquivalenten Abstand zum mTpn-CP eingeführt. Entsprechende Doppelstrangoligonukleotide wurden mit dem mTpn-TMD-short-rev-Primer generiert und zwischen *Eco147I* und *Bsp119I* in pBluescript II KS+/mTpn(*Eco147I*/*Bsp119I*⁺) kloniert.

Alle cDNA-Konstrukte mit Mutationen in der TMD und/oder dem CP von mTpn wurden nach Sequenzierung als *BstXI*-*HindIII*-Fragmente aus pBluescript II KS+ isoliert und in pcDNA3.1+/mTpn für Expressionsexperimente subkloniert.

1.4.2.5 Primer-Liste

Die Oligonukleotide wurden im DKFZ (Heidelberg) synthetisiert.

mTAP-Konstrukte

Primer	Sequenz in 5' à 3' Orientierung
mTAP1-fwd	TTG ATC CGG AAG CCA CTC CTG CTT
mTAP1-rev	TCT GGT CGA CGG TAC CGA GTC TGC AGG AGC CGC AAG AGC CTC
mTAP2-fwd	GCC CGG GCC CTT GTG CGG AAC CCA
mTAP-rev	CAG TTC TAG AGG TAC CGA TGC CTC CTC CAG CCG CTG CTG TAC CAG

hTpn-Konstrukte

Primer	Sequenz in 5' à 3' Orientierung
hTpn-E411S-fwd	GG CCC TCC CTT <u>AGC</u> GAC AGC GTA GG
hTpn-E411S-rev	CC TAC GCT GTC <u>GCT</u> AAG GGA G
hTpn-E411K/D412N-fwd	GG CCC TCC CTT <u>AAG AAC</u> AGC GTA GG
hTpn-E411K/D412N-rev	CC TAC GCT <u>GTT CTT</u> AAG GGA G

mTpn-Konstrukte

Primer	Sequenz in 5' à 3' Orientierung
mTpn-5'-IP2	TC AGA GGC GGC CCA GGA AGT T
mTpn-GSP-3'	TGG AGG GAG AAG AAG AGA AGA AGG
mTpn-Eco147I-fwd	ATC GAG GAC GGC ATA GGC CTA TTC CTG
mTpn-Bsp119I-rev	GGC CTT CTC CTT CGA AAC TTC AGG AAT GGT
mTpn-G428I-Bsp119I-rev	CTT CTC CTT CGA AAC TTC AGG AAT GGT CCA GTA GGC AGC CAG CCA GCC TAG CAC CTT GAG GAG <u>TAT</u>

	GAG GAG GAG AAA
mTpn-K431L-Bsp119I-rev	CTT CTC CTT CGA AAC TTC AGG AAT GGT CCA GTA GGC AGC CAG CCA GCC TAG CAC <u>CAG</u> GAG GAG TCC GAG
mTpn-L433F-Bsp119I-rev	CTT CTC CTT CGA AAC TTC AGG AAT GGT CCA GTA GGC AGC CAG CCA GCC <u>GAA</u> CAC CTT GAG GAG
mTpn- W435L-Bsp119I-rev	CTT CTC CTT CGA AAC TTC AGG AAT GGT CCA GTA GGC AGC CAG <u>CAA</u> GCC TAG CAC C
mTpn-Y439A-Bsp119I-rev	CTT CTC CTT CGA AAC TTC AGG AAT GGT CCA <u>GGC</u> GGC AGC CAG C
mTpn-Y439A/W440L-Bsp119I-rev	CTT CTC CTT CGA AAC TTC AGG AAT GGT <u>CAA</u> <u>GGC</u> GGC AGC CAG CCA GCC
mTpn-G428I/K431A/W435L- Bsp119I-rev	CTT CTC CTT CGA AAC TTC AGG AAT GGT CCA GTA GGC AGC CAG <u>CAA</u> GCC TAG CAC <u>CGC</u> GAG GAG <u>TAT</u> GAG GAG GAG AAA
mTpn-K431A-Bsp119I-rev	CTT CTC CTT CGA AAC TTC AGG AAT GGT CCA GTA GGC AGC CAG CCA GCC TAG CAC <u>CGC</u> GAG GAG TCC GAG
mTpn-K431D-fwd	C CTG TTC CTG TCT GCT TTT CTC CTC CTC GGA CTC CTC <u>GAC</u> GTC CTA GGC TGG CTG GCT GCC TAC TGG ACC ATT CCT GAA GTT T
mTpn-K431E-fwd	C CTG TTC CTG TCT GCT TTT CTC CTC CTC GGA CTC CTC <u>GAA</u> GTC CTA GGC TGG CTG GCT GCC TAC TGG ACC ATT CCT GAA GTT T
mTpn-K431G-fwd	C CTG TTC CTG TCT GCT TTT CTC CTC CTC GGA CTC CTC <u>GGA</u> GTC CTA GGC TGG CTG GCT GCC TAC TGG ACC ATT CCT GAA GTT T
mTpn-K431Q-fwd	C CTG TTC CTG TCT GCT TTT CTC CTC CTC GGA CTC CTC <u>CAG</u> GTC CTA GGC TGG CTG GCT GCC TAC TGG ACC ATT CCT GAA GTT T
mTpn- F420V/F424A-fwd	C CTG <u>TTC</u> CTG TCT GCT <u>GCG</u> CTC CTC CTC GGA CTC CTC AAG GTC CTA GGC TGG CTG GCT GCC TAC TGG ACC ATT CCT GAA GTT T
mTpn-F424A-fwd	C CTG GTC CTG TCT GCT <u>GCG</u> CTC CTC CTC GGA CTC CTC AAG GTC CTA GGC TGG CTG GCT GCC TAC TGG ACC ATT CCT GAA GTT T
mTpn-TMD-FFGKmut-fwd	C CTG <u>GTC</u> CTG TCT GCT <u>GCG</u> CTC CTC CTC <u>ATA</u> CTC CTC <u>GCG</u> GTC CTA GGC TGG CTG GCT GCC TAC TGG ACC ATT CCT GAA GTT T
mTpn-TMD-FGKWmut-fwd	C CTG TTC CTG TCT GCT <u>GCG</u> CTC CTC CTC <u>ATA</u> CTC CTC <u>GCG</u> GTC CTA GGC <u>CTG</u> CTG GCT GCC TAC TGG ACC ATT CCT GAA GTT T
mTpn-TMD-short-fwd	C CTA TTC CTG TCT GCT TTT CTC CTC CTC GGA CTC CTC AAG ACC ATT CCT GAA GTT T
mTpn-TMD-short-rev	CGA AAC TTC AGG AAT
mTpn-K463A/K464A-rev	GG CCA AGC TTA TTG GGA <u>AGC</u> <u>GGC</u> TGA GTT CCT GGG AAT GGT CAG GCT GGC
mTpn-E414K/D415N-Bsp120I-fwd	GG CCC TCC ATC <u>AAG</u> <u>AAC</u> GGC ATA GG

mTpn-E414K/D415N-Bsp120I-rev	CC TAT GCC <u>GTT</u> <u>CTT</u> GAT GGA G
mTpn-E414S/D415S-fwd	GG CCC TCC ATC <u>TCA</u> <u>TCA</u> GGC ATA GG
mTpn-E414S/D415S-rev	CC TAT GCC <u>TGA</u> <u>TGA</u> GAT GGA G
mTpn-E414S-fwd	GG CCC TCC ATC <u>TCA</u> GAC GGC ATA GG
mTpn-E414S-rev	CC TAT GCC GTC <u>TGA</u> GAT GGA G
mTpn-D415S-fwd	GG CCC TCC ATC GAG <u>TCA</u> GGC ATA GG
mTpn-D415S-rev	CC TAT GCC <u>TGA</u> CTC GAT GGA G
Huhn-Tpn-TMD-fwd	C CTA TTC CTG GTC GCC TTC GTA TTG TGC GGC CTC ATA CGC TGG CTG TAC CCT T
Huhn-Tpn-TMD-rev	CGA AGG GTA CAG CCA
Zebrafisch-Tpn-TMD-fwd	C ATG GTG GCT GTC GCT CTT CTG CTC TAT GGC ATG ATC AAG TTT CTC TCC TGG ACA TTC AGT T
Zebrafisch-Tpn-TMD-M407 _z /A408 _z -fwd	C <u>ATG</u> <u>GCT</u> ATG GTG GCT GTC GCT CTT CTG CTC TAT GGC ATG ATC AAG TTT CTC TCC TGG ACA TTC AGT T
Zebrafisch-Tpn-TMD-V410 _z F/A411 _z L/L414 _z F-fwd	C ATG <u>TTC</u> <u>CTG</u> GTC GCT <u>TTC</u> CTG CTC TAT GGC ATG ATC AAG TTT CTC TCC TGG ACA TTC AGT T
Zebrafisch-Tpn-TMD-rev	CGA ACT GAA TGT CCA
hCnx-TMD-Eco147I-fwd	GGC ATA GGC CTA TGG CTG TGG GTA GTC TAT ATT
hCnx-TMD-Bsp120I-fwd	TTC TCA GGG CCC GCA GCT GAA GAG CGC CCG TGG
hCnx-TMD-FGKW-fwd	C CTG CTT TGG GTG GTC <u>TTC</u> ATT TTG ACT <u>GGT</u> GCT TTG <u>AAG</u> GTG TTC CTT <u>TGG</u> ATC CTC TTT TGC ACC ATT CCT GAA GTT T
hCnx-TMD-BstBI-rev	CTT CTC CTT CGA AAC TTC AGG AAT GGT CTG TTT CTT TCC AGA ACA GCA GAA GAG GAT AAC
hTpn-R-TMD-fwd	TTC TCA GGG CCC GAG CGG AGA ACA GCC CTA GGC CTC ATC TTT GCC AGC AGT CTC TTC CTT CTT GCA CTG ATG TTC CTG GGG CTT CAG AGA CGG AGT T
hTpn-R-TMD-rev	CGA ACT CCG TCT CTG

1.5 Proteine

1.5.1 Enzyme

Calf alkaline intestinal phosphatase (CIP)	Boehringer Ingelheim (Heidelberg)
Endoglykosidase H	Roche Diagnostcs (Mannheim)
Expand High Fidelity Enzym-Mix	Roche Diagnostcs (Mannheim)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Schwalbach)
	MBI Fermentas (St. Leon Rot)
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon Rot)
T4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon Rot)
T4-Polynukleotidkinase	MBI Fermentas (St. Leon Rot)
Trypsin	Becton Dickinson (Heidelberg)

1.5.2 Antikörper

1.5.2.1 Primärantikörper

TAP

mTAP2	Das Kaninchen-Antiserum mTAP2.688 ist gegen die <i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i> (KLH)-konjugierte Aminosäuresequenz 688-702 von mTAP2 gerichtet (Garbi et al., 2003; freundlicherweise überlassen von Dr. G. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg)
hTAP2	429.4 ist ein monoklonaler Maus-Antikörper (van Endert et al., 1994).

ER-Proteine

CNX	SPA-860, der polyklonale Kaninchen-Antikörper ist gegen die KLH-konjugierte Aminosäuresequenz 575-593 (zytoplasmatischer Teil) von Hunde-CNX gerichtet (Stressgen/Biomol, Hamburg).
Calretikulin	SPA-600, polyklonaler Kaninchen-Antikörper, synthetisches Peptid von hCalretikulin (Aminosäuresequenz 405-417, zytoplasmatischer Teil) mit einem zusätzlichen Cys-Rest. Das Peptid ist konjugiert an KLH (Stressgen/Biomol, Hamburg).
hTpn	Der polyklonale Kaninchen-Antikörper ist gegen die C-terminalen Aminosäuren 418-428 (Rb α STC) von hTpn gerichtet (Tan et al., 2002).
mTpn	Der N-terminal spezifische, polyklonale Kaninchen-Antikörper (Ra2668) ist gegen ein synthetisches Peptid hergestellt worden, das an KLH gekoppelt ist (Yu et al., 1999; freundlicherweise überlassen von Dr. T. Hansen, Washington Universität, St. Louis, USA).

MHC-Klasse-I

Y3.1 Ein monoklonaler Maus-Antikörper, der ein konformatives Epitop innerhalb der α_1 - α_2 -Domäne der schweren Kette des H-2K^b Klasse-I-Komplexes erkennt (Jones and Janeway, 1981). Der Antikörper wurde nach einem Standardprotokoll biotinyliert (Coligan et al., 1994).

mlgG_{2a} Biotin-konjugierte mlgG_{2a,κ} monoklonale Immunoglobulin Isotyp-Kontrolle (Becton Dickinson, Heidelberg).

1.5.2.2 Sekundärantikörper

Western Blot (Peroxidase gekoppelt)

Ziege anti-Kaninchen IgG Dianova (Hamburg)
(H+L, minimale Kreuzreaktion zu humanem Serum)

FACS

Streptavidin Alexa Fluor®647 Konjugat Molecular Probes (Leiden, Niederlande)

1.5.3 Peptid

Peptid #600 TNKTRIDGQY

1.6 Bakterienstamm

Der für molekulare Klonierung verwendete Bakterienstamm *Escherichia coli* XL-1 Blue wurde kommerziell bezogen (Stratagene, Heidelberg).

1.7 Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAquick Gel Extraktion Kit	QIAGEN (Hilden)

1.8 Puffer und Lösungen

1.8.1 Molekularbiologie

1.8.1.1 DNA-Gelelektrophorese

10 x TAE (Tris-Acetat)-Puffer

0,4 M Tris
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA
pH 8,0 mit Essigsäure (100 %)

1.8.1.2 Restriktionsverdau

10 x Restriktionspuffer Y, B, O, R, *Bam*HI,
*Eco*II/*Not*I, *Sac*I, *Kpn*I

MBI-Fermentas (St. Leon-Rot)

dNTPs

dATP/dCTP/dGTP/dTTP-Mischung je
2 mM in Wasser (MBI-Fermentas, St.
Leon-Rot)

1.8.1.3 Medium für Bakterien

LB (Luria Broth)-Medium

10 g/l Trypton
10 g/l NaCl
5 g/l Hefeextrakt
pH 7,5 mit 1 N NaOH
(für LB-Platten: + 1,5 % Agar)
100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml
Kanamycin

1.8.2 Zellbiologie

1.8.2.1 Zellkultur

D-PBS

Invitrogen (Karlsruhe)

β-Mercaptoethanol-Lösung

0,1 % β-Mercaptoethanol in Wasser

Trypsin

0,4 % Trypsin
5 mM EDTA (pH 8,0) in PBS

Genitacin (G418)	100 mg/ml in D-PBS
Einfriermedium	50 % FCS 40 % RPMI 1640 10 % DMSO
Zusätze für 500 ml RPMI 1640 oder DMEM	50 ml FCS (100 %, hitzeinaktiviert bei 56 °C 30 min) 5 ml L-Glutamin (200 mM) 5 ml Pyruvat (100 mM) 5 ml HEPES (1 M) 5 ml nichtessentielle Aminosäuren (100 x) 500 µl β-Mercaptoethanol

1.8.2.2 FACS-Färbungen

FACS-Medium	2 % FCS in D-PBS
-------------	------------------

1.8.3 Proteinchemie

1.8.3.1 Allgemeine Puffer

1 x TBS (pH 7,4)	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Lysepuffer (pH 7,4)	1 x TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂) 1 % Detergenz Nonidet-P40 (v/v) 1 Proteaseinhibitor-Tablette / 50ml
10 x Endoglykosidase H-Puffer (pH 5,5)	500 mM Natriumacetat 500 mM β-Mercaptoethanol

1.8.3.2 Proteingele

6 x SDS-PAGE Probenpuffer

150 mM Tris-HCl
12 % SDS
30 % Glycerin
0,015 % Bromphenolblau
reduzierend:
5 % β -Mercaptoethanol

10 x SDS-PAGE Laufpuffer

250 mM Tris
1920 mM Glycin
1 % SDS

5 % SDS-Sammelgelpuffer für 2 Gele

Gesamtansatz	16 ml
Wasser	11 ml
30 % Acrylamid-Lösung	2,6 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	2 ml
10 % SDS	0,16 ml
10 % APS	0,16 ml
TEMED	0,016 ml

10 % SDS-Trenngelpuffer für 2 Gele

Gesamtansatz	60 ml
Wasser	23,8 ml
30 % Acrylamid-Lösung	20 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	15 ml
10 % SDS	0,6 ml
10 % APS	0,6 ml
TEMED	0,024 ml

1.8.3.3 Western Blotting

Konzentrierter Anodenpuffer (pH 10,4)

300 mM Tris
20 % Methanol

Anodenpuffer (pH 10,4)

25 mM Tris
20 % Methanol

Kathodenpuffer (pH 9,4)	25 mM Tris 40 mM 6-Aminocapronsäure 20 % Methanol
10 x PBS	80 g/l NaCl 2 g/l KCl 2 g/l KH_2PO_4 14,4 g/l $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$
PBS/Tween-20	0,1 % Tween-20 in 1 x PBS
Milchpulver	1 % Milchpulver in PBS/Tween-20
Antikörperverdünnung	1 % BSA in PBS/Tween-20

1.8.3.4 Peptidtranslokationsuntersuchung

Lyse- und Waschpuffer (pH 7,4)	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 % Nonidet-P40 5 mM MgCl_2
Inkubationspuffer (pH 7,3)	130 mM KCl 10 mM NaCl 1 mM CaCl_2 2 mM EGTA 2 mM MgCl_2 5 mM HEPES

1.9 Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Ursprung</u>	<u>Tumor</u>	<u>Beschreibung/Referenz</u>
RMA	C57BL/6 (H-2 ^b)	Maus T-Lymphom	TAP1/2 ^{+/+} , Tpn ^{+/+} , K ^b /D ^{b+/+} (Ljunggren and Karre, 1985)
MC4	C57BL/6 (H-2 ^b) und 129P2/OlaHsd	Fibro-Sarkom	Tpn-knockout Maus: TAP1/2 gering, Tpn ^{-/-} , K ^b /D ^b gering (Garbi et al., 2003)
MC6	C57BL/6 (H-2 ^b) und 129P2/OlaHsd	Fibro-Sarkom	TAP1/2 ^{+/+} , Tpn ^{+/+} , K ^b /D ^{b+/+} (Dr. N. Garbi, DKFZ, Heidelberg, unveröffentlicht)
MCB6TAP1 ^{-/-}	C57BL/6 (H-2 ^b)	Fibro-Sarkom	TAP1-knockout Maus: TAP1 ^{-/-} , TAP2 gering, Tpn ^{+/+} , K ^b /D ^b gering (freundlicherweise über- lassen von Dr. H. G. Ljunggren, Karolinska Insitut, Stockholm) (Van Kaer et al., 1992)
B-LCL 721.220 (=.220)	LCL 721	humane B-lympho- blastoide Zelllinie (B-LCL)	Durch Gamma-Bestrahlung aus LCL 721 hervorgegangen. EBV transformiert (Shimizu and DeMars, R., 1989); exprimiert kein Tpn-Protein voller Länge, jedoch mRNA für eine um 20 Aminosäuren verkürzte Tpn-Spleißvariante wird in geringen Mengen gefunden (Copeman et al., 1998) (freundlicherweise über- lassen von Dr. R. DeMars, Madison, WI, USA)

2. Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Restriktionsverdau und Erzeugung von glatten Enden der Plasmid-DNA

Ein analytischer Verdau wurde mit 50-100 ng DNA durchgeführt, ein präparativer mit etwa 0,25-2 µg. Die einzusetzenden Puffer wurden nach den Anleitungen des jeweiligen Protokolls der Hersteller gewählt, von denen das jeweilige Enzym bezogen wurde. Von den Restriktionsenzymen wurden im analytischen Verdau 0,5 µl-1 µl eingesetzt, im präparativen 1,5-3 µl. Die Reaktion wurde für 1,5 h bei 37 °C durchgeführt, sofern die optimalen Bedingungen nicht bei höheren Temperaturen (z. B. 55 °C) lagen. Für zwei Enzyme mit unterschiedlichen Temperatur- oder Pufferbedingungen wurden die Verdau nacheinander angesetzt und die Pufferbedingungen entsprechend angepasst.

Für die Erzeugung glatter Enden wurde zu der gesamten verdauten DNA-Menge ein Mix aus T4-Polymerase-Puffer, dNTPs (0,1 mM Endkonzentration) und T4-DNA-Polymerase gegeben. Die Gesamtansätze wurden anschließend für 20 min bei 11 °C inkubiert. Die T4-DNA-Polymerase wurde für 10 min bei 75 °C inaktiviert. Danach wurden die Ansätze mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt, kurz abzentrifugiert und in einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt.

Um eine Religation geschnittener DNA-Enden von Vektoren zu verhindern, wurden die freien Phosphatenden mit 1 µl alkalischer Phosphatase (CIP) entfernt. Die Reaktion lief bei 5'-überstehenden Enden bei 37 °C für 30 min, bei glatten und 3'-Überhängen 15 min bei 37 °C und 15 min bei 56 °C. Nach der Inkubation wurde nochmals 1 µl CIP hinzugegeben und ebenso inkubiert. Anschließend wurde die CIP inaktiviert, indem mit 1/10 Volumen 0,1 M TNE-Puffer für 10 min bei 75 °C erhitzt wurde.

2.1.2 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund der negativen Ladungen ihrer Phosphatreste können DNA-Fragmente mit Hilfe eines Agarosegels im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Durch Zugabe von etwa 0,5 µg/ml Ethidiumbromid können die aufgetrennten DNA-Fragmente dargestellt werden. Dabei werden einzelne Ethidiumbromid-Moleküle zwischen die Basen der DNA (bis zu 3 Moleküle je 10 Basen) interkaliert, wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und so die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung durch ultraviolettes Licht stark erhöht. Auf diese Weise

leuchten im Agarosegel die Stellen, an denen sich Nukleinsäuren befinden hell auf, während Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel erscheinen.

Das Gel wurde nach dem Aufkochen der Agarose (1-1,5 % in 1 x TAE-Puffer) in der Mikrowelle mit Ethidiumbromid versetzt und anschließend in eine Flachbett-Elektrophoresekammer gegossen. Nach Polymerisation der Agarose und Einsetzen in die Gel-Apparatur wurde der Kamm entfernt. Danach wurden die DNA-Proben mit 1/5 Volumen 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Marker wurden Lambda DNA/*Hind*III oder Lambda DNA/*Hind*III + *Eco*RI (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 V in 1 x TAE für etwa 1 h. Auf dem UV-Transluminator wurde das Gel bei 254 nm fotografiert. Bei präparativen Verdaus wurden bei 366 nm Banden ausgeschnitten, um keine Mutationen der DNA hervorzurufen.

2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion der DNA aus Agarosegelen wurde mit der Methode der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Die Fragmente wurden aus dem Gel bei 366 nm (UV-Licht) ausgeschnitten, anschließend gewogen und mit 3-fachem Volumen an QG-Puffer versetzt. Während der Inkubation von 10 min bei 50 °C wurde die Lösung mehrfach geschüttelt. Danach wurde bei Fragmenten < 0,5 kb und > 4kb ein Gelvolumen Isopropanol hinzugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde auf die QIAquick Säule pipettiert und bei 13000 Upm 1 min abzentrifugiert. Nach Entfernung des Filtrats wurden 750 µl PE-Puffer zum Waschen der Säule verwendet und 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule erneut 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein Eppendorfgefäß gestellt, 30 µl TE-Puffer zugegeben, 1 min stengelassen und danach 1 min bei 13000 Upm abzentrifugiert.

2.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten und Transformation von Bakterien

Die Ligrationsreaktion wurde mit 1 µl T4-DNA-Ligase (10 U/µl), 10 x T4-DNA-Ligasepuffer und Wasser angesetzt. Die Menge der aus dem Gel eluierten Insert- und Vektor-Fragmente wurde nach folgender Formel abgeschätzt:

$$\frac{\text{Vektor [ng]} \times \text{Länge des Inserts [kb]}}{\text{Länge des Vektors [kb]}} \times 3 = \text{Insert [ng]}$$

Es wurden von dem Insert- bzw. Vektor-Fragment jeweils ungefähr 10-30 ng eingesetzt.

Ligationsansatz:

- X µl Vektor DNA
- Y µl Insert DNA
- 1 µl T4-DNA-Ligase (10 U/µl)
- 2 µl T4-DNA-Ligasepuffer (10 x)
- Auf 20 µl steriles Aqua bidest auffüllen.

Der Ligationsansatz wurde für 4-8 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz für die Transformation eingesetzt. Dazu wurde der Ansatz mit 30-50 µl *Escherichia coli* XL-1 Blue Suspension versetzt, 20 min auf Eis inkubiert und für 90 sec einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Danach wurden die Zellen je nach verwendetem Plasmidresistenzgen in Petrischalen auf LB-Agarose-Medium mit Ampicillin (100 µl/ml) oder Kanamycin (30 µl/ml) ausgetrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Jeweils ein Bakterienklon wurde am nächsten Tag von der Petrischale gepickt und für Mini-Präparationen in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µl/ml) oder Kanamycin (30 µl/ml) gegeben. Für Maxi-Präparationen wurde ein Bakterienklon in 200 ml LB-Medium mit den oben genannten Antibiotika gegeben. Über Nacht wurde bei 37 °C und 300 Upm im Inkubator geschüttelt und anschließend eine Plasmidisolierung durchgeführt.

2.1.5 Plasmidisolierung

2.1.5.1 Mini-Präparation

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* XL-1 Blue Zellen wurde nach der Methode von Qiagen durchgeführt. Dazu wurden von der über Nacht gewachsenen 4 ml Kultur 1,5 ml abgenommen und 2 min bei 13000 Upm abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Zu dem Pellet wurden erneut 1,5 ml Kultur gegeben, 2 min bei 13000 Upm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert, mit 250 µl Puffer P2 versetzt, 4-6 mal geschwenkt, sofort mit 350 µl Puffer N3 versetzt und erneut 4-6 mal geschwenkt. Nach 10 min Zentrifugieren bei 13000 Upm wurde der Überstand auf die QIAprep Säule überführt und 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Die Säule wurde nach Entfernen des Filtrats mit 750 µl Puffer PE gewaschen und 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Filtrats wurde erneut 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurden 150 µl TE-Puffer auf die Säule gegeben und nach 1 min bei 13000 Upm 2 min abzentrifugiert.

2.1.5.2 Maxi-Präparation

Die Isolierung einer größeren Menge an Plasmid-DNA erfolgte ebenfalls nach der Methode von Qiagen. Die über Nacht gewachsene 200 ml Kultur *Escherichia coli* XL-1 Blue Zellen wurde in 500 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min bei 5000 Upm in einer Sorvall RC-5B Plus Zentrifuge (Rotor GS3) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 und Inkubation für 5 min bei RT wurden 10 ml Puffer P3 (4°C) zugegeben und das Lysat 4-6 mal geschwenkt. Das Lysat wurde in ein QIAFilter-Einsatz überführt und für 10 min inkubiert. Anschließend wurde das Zell-Lysat durch die mit 10 ml Puffer QBT equilibrierte Säule filtriert. Nach dem Durchfließen des Lysats wurde die Säule mit 2 x 30 ml Puffer QC gewaschen, um RNA, Proteine und andere Verunreinigungen zu entfernen. Die DNA wurde mit 15 ml Puffer QF eluiert und mit 10,5 ml Isopropanol gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 5000 Upm für 45 min in der Minifuge RF (Heraeus Sepatech). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde anschließend mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen und 10 min bei 5000 Upm abzentrifugiert. Nach gutem Trocknen wurde das Pellet in 200-300 µl EB-Puffer resuspendiert.

2.1.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm gemessen: $OD_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml DNA (doppelsträngig)

Der Reinheitsgrad wurde aus dem Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} abgeschätzt. Die gereinigte DNA hatte ein OD_{260}/OD_{280} -Verhältnis von 1,6-2,0.

2.1.7 PCR

Die PCR wurde in einem Volumen von 50 µl in Gegenwart von 1 x Expand High Fidelity Puffer mit 15 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPs, 2,6 U Expand High Fidelity Enzym-Mix und jeweils 300 nM fwd- und rev-Primer durchgeführt. Die Menge an Template-DNA variierte zwischen 0,2-0,5 µg.

Für die PCR-Reaktion wurden folgende Bedingungen gewählt:

Zunächst erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C für 3 min, danach bei 94 °C für 30 sec. Das Annealing wurde bei 55 °C für 35 sec und die Amplifikation bei 72 °C für 45 sec durchgeführt. Bei den nun folgenden 10 Zyklen wurde die Annealing-Temperatur pro Zyklus um 1 °C reduziert. Die Denaturierung erfolgte bei 94 °C für 3 min, die Amplifikation bei 72 °C für 45 sec. Anschließend wurden 20 Zyklen bei 94 °C für 30 sec, 45 °C für 35 sec und 72 °C für 45 sec durchgeführt. Die Endelongation erfolgte bei 72 °C für 6 min.

2.1.8 DNA-Sequenzierung und Ethanolfällung der DNA

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg) mit M13uni; M13rev-T7- bzw. T3-Polymerase-Primern nach der Dideoxy-Methode von Sanger.

Die in 100 µl Wasser zu fällende DNA (1-2 µg) wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,6) und 2,5-fachem Volumen von eiskaltem 100 % Ethanol über Nacht bei -70 °C gefällt. Nach der Zentrifugation bei 13000 Upm für 10 min wurde der Überstand verworfen und die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend bei RT getrocknet, in 10 µl HPLC-Wasser aufgenommen und zum Sequenzieren geschickt.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Eukaryontische Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in Gewebekulturflaschen in 10-50 ml Kulturmedium (je nach Zelllinie DMEM oder RPMI 1640) mit den genannten Zusätzen kultiviert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen gesplittet. Zur Gewinnung des Zellpellets wurde bei 2000 Upm für 2 min zentrifugiert.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Adhärente Zellen wurden zunächst abtrypsiniert und in Medium aufgenommen. Zum Einfrieren wurden Suspensionszellen und die in Medium aufgenommenen Zellen abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2×10^6 Zellen/ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei -70 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens bei RT aufgetaut, je nach Zelllinie in 10 ml DMEM oder RPMI 1640 aufgenommen und 2 min bei 2000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml Vollmedium aufgenommen und in eine 75 cm² Kulturflasche überführt.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Adhärente Zellen wurden abtrypsiniert und anschließend in ungefähr 10^6 Zellen/ml Medium aufgenommen. Suspensionszellen wurden zunächst pelletiert und ebenfalls

in etwa 10^6 Zellen/ml Medium resuspendiert. Für die Bestimmung der Zellzahl unter Ausschluß toter Zellen wurden 20 µl Kultur und 20 µl Trypanblau-Lösung gemischt. Davon wurden 10 µl in die Neubauer-Zählkammer überführt und die ungefärbten, nicht blauen Zellen in 4 Großquadranten gezählt (Zellzahl= N). Da ein Großquadrat mit einem Volumen von $0,1 \text{ mm}^3$ 0,1 µl fassen kann, ergibt sich:

Zellkonzentration (Zellen/ml)= $N/4 \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

2.2.1.4 Transfektion eukaryontischer Suspensionszellen mittels Elektroporation

Die Transfektionen wurden in 1 ml Elektroporationsküvetten mit einer Spaltbreite von 0,4 cm durchgeführt. Nach dem Spülen mit 100 % Ethanol wurden die Küvetten zum Trocknen aufgestellt. In einem sterilen Eppendorfgefäß wurden 10-20 µg DNA vorgelegt. Pro Ansatz wurden 10×10^6 Zellen in 200 µl sterilem PBS aufgenommen und zu der vorgelegten DNA pipettiert, kurz resuspendiert und in die Küvette überführt. Die Proben wurden auf Eis etwa 5 min inkubiert. Die Transfektion am Elektroporationsgerät wurde bei 220 V und 960 µF durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Ansätze in 10 ml RPMI 1640 Vollmedium mit Ciprobay und Fungizone (jeweils 1:200) in Kulturflaschen überführt. Nach 2 Tagen wurde den Transfektanten neues Medium mit 1 mg/ml Geneticin (G418) gegeben. Sobald Geneticin-resistente Klone heranwuchsen wurde mit 0,5-0,8 mg/ml weiterselektioniert.

2.2.1.5 Transfektion eukaryontischer und adhärenter Zellen mit Lipofektamine™ 2000

Um mit der Lipofektion DNA in Zellen einzubringen, wird die negative Ladung der DNA durch Komplexbildung mit kationischen Lipiden maskiert. In dieser Form können sich die DNA-Lipidkomplexe an die Zellmembran anlagern, diese passieren und in den Zellkern gelangen.

Die Zellen wurden 1 Tag vor der Transfektion in 6-Loch-Platten ($2,7 \times 10^5$ MC4-Zellen; $2,0 \times 10^5$ MCB6TAP1^{-/-}-Zellen) oder 10 cm Schalen (17×10^5 MC4-Zellen; $12,5 \times 10^5$ MCB6TAP1^{-/-}-Zellen) ausgesät. Für Fluoreszenzmikroskopieanalysen wurden die Zellen in 6-Loch-Platten auf mit zunächst 70 % Ethanol und anschließend mit D-PBS gewaschenem Deckglas ausgesät. Zum Transfektionszeitpunkt hatten die Zellen eine Dichte von ungefähr 80-90 %. Die Transfektion von adhärenter Zellen mit Lipofektamine™ 2000 wurde nach der Methode von Invitrogen durchgeführt.

	Pro Loch einer 6-Loch-Platte	Pro 10 cm Schale
Opti-MEM®I Serumfreies Medium	2 ml	15 ml
Ansatz I	10 µl Lipofektamine™ 2000 240 µl Opti-MEM®I Medium	60 µl Lipofektamine™ 2000 1,5 ml Opti-MEM®I Medium
Ansatz II	4 µg DNA in 250 µl Opti-MEM®I Medium	24 µg DNA in 1,5 ml Opti-MEM®I Medium

Nach dem Waschen der Zellen mit D-PBS wurde Opti-MEM®I Serumfreies Medium zugegeben. Ansatz I und Ansatz II wurden jeweils in einem sterilen Eppendorfgefäß angesetzt. Nach 5 min Inkubation wurden beide Ansätze vereint, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Anschließend wurde der DNA-Lipofektamine™ 2000-Komplex tropfenweise in jedes Loch bzw. Schale gegeben. Nach einer Inkubation von 4-6 h bei 37 °C im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium abgenommen und gegen Vollmedium mit Ciprobay (1:200) ersetzt. Nach 1-3 Tagen wurden die Zellen analysiert.

2.2.1.6 Lyse von Zellen

Zur Lyse mit dem Detergenz Nonidet-P40 (NP-40) wurden die Zellen gezählt, einmal mit D-PBS gewaschen und in Lysepuffer aufgenommen. Die Zellen wurden bei einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/50 µl Lysepuffer rotierend für 1-2 h bei 4 °C lysiert. Anschließend wurden die Zellkerne für 10 min bei 13000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde gleich oder nach Endoglykosidase H-Verdau für Western Blot-Analysen eingesetzt.

2.2.2 FACS-Analyse

Die Zellen wurden für die FACS-Messung zunächst gezählt. Pro Färbung wurden $5-10 \times 10^5$ Zellen verwendet. Nach der Zentrifugation für 2 min bei 2000 Upm und Verwerfen des Überstandes standen die Zellen einige Minuten in D-PBS auf Eis, um die Biosynthese vollständig zu stoppen. Die Zellen wurden 1 x mit FACS-Medium gewaschen und anschließend entweder in 100 µl gereinigtem, biotinyliertem monoklonalem Erstantikörper Y3.1 (1:1000; Stammlösung: 0,25 mg/ml) in FACS-Medium oder in 100 µl Isotyp-Kontrolle mIgG2a (1:2000; Stammlösung: 0,5 mg/ml) in FACS-Medium für 20 min auf Eis inkubiert. Nach 2 x Waschen mit 1 ml FACS-Medium wurde der Streptavidin Alexa Flour®647-konjugierte Zweitantikörper in einer 1:100 Verdünnung in FACS-Medium auf die Zellen gegeben und für 10-15 min bei 4 °C inkubiert. Diese gefärbten und ebenfalls ungefärbten, abtrypsinierten und in Vollmedium aufgenommene pEGFP-transfizierten Zellen wurden nach 2 x Waschen

mit FACS-Medium in 200 µl FACS-Medium mit 1:3000 Propidiumiodid (Stammlösung: 1 mg/ml) aufgenommen. Die zytofluorimetrischen Analysen wurden am FACSCalibur mit der CellQuest Pro Software durchgeführt. Ausgewertet wurden ausschließlich die lebenden Zellen, die sich mit Propidiumiodid nicht anfärben ließen.

2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die auf dem Deckglas adhärennten und mit pEGFP-transfizierten Zellen wurden 2 Tage nach der Transfektion 1 x mit D-PBS gewaschen. Auf den Objektträger wurden 500 µl D-PBS vorgelegt. Anschließend wurde das Deckglas vorsichtig mit der Zellseite nach unten auf den Objektträger gelegt. Das Deckglas wurde auf dem Objektträger mit Nagellackentferner fixiert und in eine Schale mit feuchtem Tuch überführt, um eine Austrocknung zu verhindern. Die Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop mit FITC-(Flourescein-Isothiocyanat) Filter auf eine grüne, von EGFP hervorgerufene, Fluoreszenz hin untersucht.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Bestimmung der Endoglykosidase H-Resistenz von Proteinen

Um die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen zu analysieren wurde nach der Zelllyse das Lysat mit Endoglykosidase H-Puffer (10 x) verdünnt, wobei beachtet wurde, dass in eine Maxi-Gel-Tasche (15er Kamm) maximal 100 µl passen. Für 1 x 10^6 Zellen wurden 2 µl Endoglykosidase H (Stammlösung: 5 U/ml) eingesetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für Western Blot-Analysen eingesetzt.

2.3.2 Western Blot

2.3.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine nach Laemmli modifizierte Methode (Laemmli, 1970), in der denaturierte Proteine nach dem Ladung-zu-Masse-Verhältnis im Gel getrennt werden. Dies wird durch das Detergenz SDS, das sich an Proteine anlagert und diese denaturiert, erzielt. Die resultierenden Komplexe erhalten durch die Sulfatgruppen eine gleichmäßig verteilte negative Ladung. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist nun nur von der relativen Molekülmasse abhängig. Die Proteine wandern in einem elektrisches Feld durch eine Gelmatrix, die aus einem Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid gebildet ist. Acrylamid bildet in Anwesenheit freier Radikale in einer Kettenreaktion lange Polymere, die

Bisacrylamid vernetzt. Als Katalysator dient TEMED, als Radikalbildner APS. Um eine schärfere Bandentrennung zu erzielen wird über das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Die Matrix im Sammelgel (pH 6,8) besitzt größere Poren und einen niedrigeren pH-Wert als das Trenngel (pH 8,8). Darin wandern die Proteine schnell und ohne Auftrennung als scharfe Banden in einer Umgebung hoher Feldstärke. Mit Erreichen der Grenzschicht zum Trenngel wird die Geschwindigkeit der Proteine drastisch, und nun abhängig von der Größe, verringert.

Es wurde eine frische, gesättigte 10 % Lösung von APS in Wasser hergestellt. Das 10 % Trenngel wurde nach dem Ansetzen schnell zwischen 2 Glasplatten gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Das Isopropanol verhindert, dass die oberste Schicht mit Luft in Kontakt kommt, vollständig polymerisiert und so eine scharfe Grenze zum Sammelgel entsteht. Die Polymerisation erfolgte innerhalb von etwa 30 min. Das Isopropanol wurde abgegossen. Reste des Isopropanols wurden durch Waschen des Trenngels mit Wasser entfernt. Das angesetzte 5 % Sammelgel wurde nun auf das Trenngel gegossen, wobei ein 15 Taschen bildender Kamm verwendet wurde. Die Polymerisation war nach ungefähr 45 min abgeschlossen. Anschließend wurden die zu analysierenden Proben in 6 x SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen und auf das Gel mit dem SDS-Standard Marker geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-90 V und nach oben offener Stromstärke etwa 16-17 h lang.

2.3.2.2 Semi-dry Blotting von Proteinen

Um die über SDS-PAGE getrennten Proteine mit einem Antikörper nachzuweisen, müssen die Proteine zunächst aus dem Gel auf eine PVDF-Membran auf elektrophoretischem Wege übertragen werden. Beim Semi-dry Blot werden Gel und immobilisierte Membran „sandwichartig“ von Filterpapieren eingerahmt, die bei der Elektrophorese als Ionen-Reservoir dienen, zwischen die Elektroden gelegt. Methanol im Puffer dient dazu, das SDS aus den Protein-Detergenz-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen.

Es wurden 3 in Größe der Blotkammer zurechtgeschnittene Filterpapiere zunächst in konzentrierten Anodenpuffer gelegt und auf die Blotkammer mit einer Glaspipette glattgestrichen. 3 weitere in konzentriertem Anodenpuffer und 3 in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere wurden darauf gelegt. Die PVDF-Membran wurde ungefähr 1 min in Methanol, anschließend etwa 5 min in Wasser und danach kurz in Anodenpuffer gelegt, um sie vollständig zu benetzen. Nachdem die PVDF-Membran auf die Blotkammer mit Filterpapieren gelegt wurde, wurde das mit Anodenpuffer befeuchtete Gel luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Anschließend folgten 3 in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Geblottet wurde 1,5 h bei konstanter Stromstärke (180 mA).

2.3.2.3 Immun-Blotting

Die PVDF-Membran wurde 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in einer 1 % Milchpulverlösung geschwenkt, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu reduzieren. Nach kurzem Schwenken in PBS/Tween-20 wurde der Erstantikörper in PBS/Tween-20/BSA auf die Membran gegeben und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Nach 3 x Waschen von jeweils 5-10 min in PBS/Tween-20 wurde der Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper 1:200000 mit PBS/Tween-20/BSA verdünnt und für 1 h mit der Membran auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde erneut 3 x jeweils 5-10 min in PBS/Tween-20 gewaschen.

Der Nachweis eines Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt über die Umsetzung eines Chemilumineszenzsubstrates durch die Peroxidase, wobei Photonen freigesetzt werden. Die Membran wurde ungefähr 20 sec in ECL-Lösung (Enhanced Chemiluminescence SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate; Pierce, St. Augustin) gelegt, deren Chemilumineszenz durch die Peroxidasereaktion ausgelöst wurde. Bei der Peroxidasereaktion wird Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert. Die Membran wurde anschließend zwischen Folie gelegt. Der Blot wurde entweder mittels Lumi-Imager und LumiAnalyst Software detektiert oder auf einem blaulichtsensitiven Röntgenfilm (Hyperfilm ECL; Amersham Pharmacia, Freiburg) exponiert und entwickelt. Es wurde jeweils eine Expositionszeit von 30 sec bis 29 min gewählt.

2.3.3 Peptidjodierung und Peptidtranslokationsuntersuchung

Die Peptidjodierung (Neefjes et al., 1993) erfolgte nach folgender Standardjodierungsreaktion:

X µl Peptidlösung (1 mg/ml; 10 nmol Gesamtmenge)
50-X µl PBS (20 mM)
10 µl Chloramin T (1mg/ml)
5 µl Na[¹²⁵J] (0,5 mCi)
10 µl Na₂S₂O₅ (1 mg/ml)

500 µl Dowex 1X8 (Partikelgröße 200-400 mesh)
in 20 mM PBS, 0,2 % BSA und 0,1 % NaN₃

Die Jodierung erfolgte 5 min bei RT und wurde durch Zugabe von 20 µl Na₂S₂O₅ abgestoppt. Dieses Gemisch wurde in 415 µl PBS aufgenommen und auf 500 µl Dowex Harz gegeben. Nach Vortexen und Abzentrifugieren wurde das Peptid aus dem Überstand entnommen, während das an das Ionenaustauschharz gebundene Jod verworfen wurde. Die Volumenaktivität wurde für jedes Peptid mit einem

Bohrloch-Gammazähler bestimmt. Die spezifische Aktivität des jodierten Peptids lag zwischen 20-50 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Das jodierte Peptid wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kurze Zeit aufbewahrt. Zellen ($2,5 \times 10^6/\text{Probe}$) wurden 1 x mit Inkubationspuffer gewaschen und anschließend für 15 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 1 mM DTT-aktiviertem Streptolysin-O (2,2 IU/ml in Inkubationspuffer) permeabilisiert. Durch Trypanblau-Färbung konnte gezeigt werden, dass 70-80 % der Zellen permeabilisiert waren. Die permeabilisierten Zellen wurden dann 3 x mit 1 ml Inkubationspuffer gewaschen, um das Streptolysin-O zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in einer titrierten Menge an jodiertem Peptid # 600 in Inkubationspuffer/0,05 % BSA resuspendiert und 10 mM ATP zu einem Endvolumen von 100 μl pipettiert. Als Hintergrundkontrolle wurde ATP durch 5 mM EDTA, das Mg^{2+} entzieht, ersetzt. Nach einer Inkubation von 20-30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Translokation mit 1 ml eiskaltem Lyse- und Waschpuffer gestoppt. Die darauffolgende Lyse erfolgte 1 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Zellkerne wurden danach bei 13000 Upm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ entfernt und die glykosylierten Peptide über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 20 μl Concanavalin A-Sepharose Beads isoliert. Die Concanavalin A-Sepharose Beads wurden 3 x mit 1 ml Lyse- und Waschpuffer gewaschen. Die Radioaktivität wurde mittels Bohrloch-Gammazähler gemessen.

V. Ergebnisse

1. Vergleich der TAP1- und TAP2-Abhängigkeit von Tpn bezüglich einer stabilen Expression

1.1 Generierung von TAP1- und TAP2-Deletionsmutanten

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diejenige TAP-Untereinheit zu identifizieren, die bezüglich der Stabilisierung am stärksten von Tpn abhängt. Anschließend sollte diese Untereinheit zur Ablesung der Tpn-vermittelten TAP-Stabilisierung in MC4-Zellen verwendet werden, wobei Tpn^{-/-}-MC4-Zellen mit Tpn-Mutanten transfiziert wurden. Dazu wurden aus TAP1- und TAP2-cDNAs von Ratte und Maus in mehreren Klonierungsschritten (siehe Material und Methoden 1.4.2.1 und 1.4.2.2) C-terminal EGFP-markierte TAP1- und TAP2-Untereinheiten voller Länge sowie EGFP-markierte TAP1- und TAP2-Untereinheiten, bei denen die N-terminale Domäne mit der Tpn-Bindungsstelle (Koch et al., 2004) deletiert wurde (Δ N-TAP1/2-EGFP), generiert (Abb. V. 1). Es wurden die TAP-Polypeptide aus Maus und Ratte verwendet, da beide eine hohe Homologie (84 %) zueinander haben und die hier verwendeten TAP1^a/TAP2^u-Transporter der Ratte und TAP1/TAP2-Transporter der Maus bevorzugt Peptide mit hydrophoben Aminosäuren am C-Terminus transportieren (Momburg et al., 1994b).

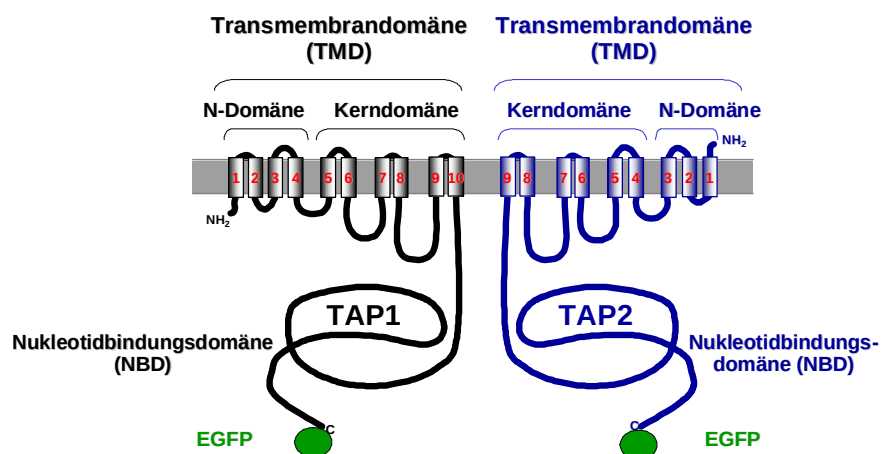


Abb. V. 1: Schematische Darstellung der C-terminal mit EGFP-markierten TAP1- und TAP2-Untereinheiten voller Länge

Zusätzlich sind EGFP-markierte TAP1- und TAP2-Untereinheiten, denen die N-Domäne fehlt, hergestellt worden. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. F. Momburg, DKFZ, Heidelberg)

Alle Konstrukte wurden mit Hilfe von Expressionsvektoren mit dem CMV-Promoter exprimiert. Die EGFP-markierten Untereinheiten wurden allein oder zusammen mit der unmarkierten komplementären Untereinheit mittels Lipofektion in Fibroblastenzelllinien, die von $Tpn^{-/-}$ -Mäusen (MC4-Zellen) (Garbi et al., 2000) oder von $TAP1^{-/-}$ -Mäusen (MCB6TAP1 $^{-/-}$ -Zellen) (van Kaer et al., 1992) stammen, transfiziert und nach 48 h auf Expression analysiert (siehe Material und Methoden 2.2.1.5). Die Herstellung stabiler Transfektanten war nicht möglich, da die Zellen trotz Sortierung auf EGFP-Expression die Plasmide nicht stabil integrierten.

1.2 Expression der EGFP-markierten TAP1- und TAP2-Untereinheiten in Tpn-defizienten und TAP1-defizienten Zellen

1.2.1 TAP- und Tpn-Expression in Tpn-defizienten und TAP1-defizienten Zellen

Die verwendeten Maus-Fibroblastenzelllinien, MC4 und MCB6TAP1 $^{-/-}$, sollten näher charakterisiert werden. Dazu wurden die Expressionsniveaus von Tpn und TAP in MC4- und MCB6TAP1 $^{-/-}$ -Zellen mittels Western Blot mit den Kaninchen-anti-mTAP2- und -anti-mTpn-Seren bestimmt. MC6-Fibroblastenzellen, die von $Tpn^{+/+}/TAP^{+/+}$ -B6-Mäusen stammen, exprimieren alle Komponenten des Peptidbeladungskomplexes und wurden daher als Positivkontrolle verwendet.

In den TAP1-defizienten MCB6TAP1 $^{-/-}$ -Zellen konnte kein TAP2 nachgewiesen werden, da TAP2 in Abwesenheit von TAP1 instabil ist (Abb. V. 2). Tpn war dagegen stark exprimiert. In Tpn-defizienten MC4-Zellen konnte TAP2 nicht detektiert werden.

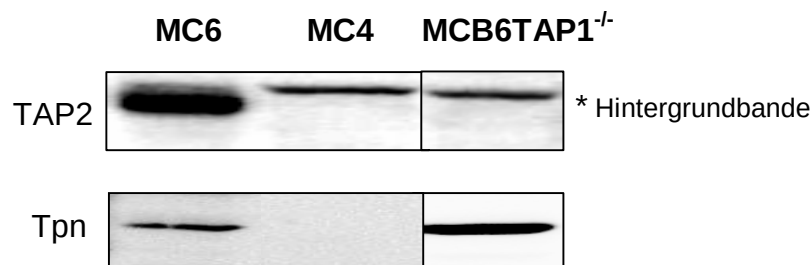


Abb. V. 2: Expressionsniveau von TAP2 und Tpn in Tpn-defizienten MC4- und MCB6TAP1 $^{-/-}$ -Zellen

NP40-Lysate aus 1×10^6 Zellen wurden im SDS-PAGE getrennt. Der Immunblot wurde mit dem Kaninchen-anti-mTAP2-Serum (mTAP2.688) und -anti-mTpn(N-Terminus)-Serum (Ra2668) angefärbt. (Freundlicherweise von Dr. N. Tiwari überlassen)

1.2.2 TAP1/2-EGFP-Expression und MHC-Klasse-I-Expression in MCB6TAP1^{-/-}-Zellen

Es sollte nun untersucht werden, ob die C-terminal EGFP-markierten TAP1- und TAP2-Untereinheiten exprimierbar und funktionell in Bezug auf die MHC-Klasse-I-Expression sind. Dazu wurden mTAP1-EGFP und mTAP2-EGFP mit der unmarkierten komplementären Wildtyp-TAP-Untereinheit in MCB6TAP1^{-/-}-Fibroblasten kotransfiziert und im Fluoreszenzmikroskop und Zytofluorimeter analysiert.

In der fluoreszenzmikroskopischen Analyse konnte festgestellt werden, dass mTAP1-EGFP und mTAP2-EGFP exprimiert werden. Exemplarisch sind in Abbildung V. 3 Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen gezeigt. Die beiden TAP-Untereinheiten wiesen eine zytoplasmatische Färbung auf, wobei keine Kernfluoreszenz auftrat. Außerdem war keine Färbung der Plasmamembran zu beobachten. Dieses Muster passt zu der bekannten ER-spezifischen Lokalisation von TAP (Russ et al., 1995; Vos et al., 1999).

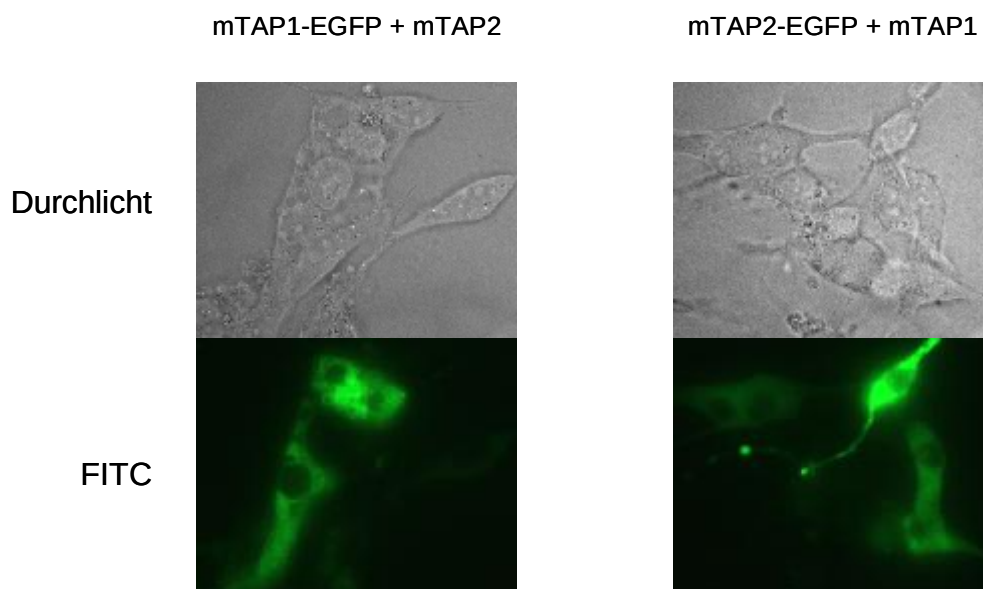


Abb. V. 3: Zytoplasmatische Färbung von TAP1- und TAP2-EGFP in MCB6TAP1^{-/-}-Zellen

Die auf Deckgläsern gewachsenen MCB6TAP1^{-/-}-Zellen wurden mit mTAP1-EGFP bzw. mTAP2-EGFP und der unmarkierten komplementären Wildtyp-TAP-Untereinheit kotransfiziert und nach 48 h im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Auch in der zytofluorimetrischen Analyse konnte gezeigt werden, dass die beiden EGFP-markierten TAP-Konstrukte exprimierbar sind (Abb. V. 4). 22,2 % der mit mTAP1-EGFP und mTAP2 transient transfizierten MCB6TAP1^{-/-}-Zellen waren in diesem Experiment EGFP-positiv. Hingegen waren nach einer Transfektion mit mTAP2-EGFP und mTAP1 11,4 % der MCB6TAP1^{-/-}-Zellen EGFP-positiv. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass mTAP1-EGFP und mTAP2-EGFP funktionell in Bezug auf die Peptidtranslokation sind, da die MHC-Klasse-I-Expression nach Transfektion der EGFP-markierten TAP-Untereinheiten mit der unmarkierten komplementären Wildtyp-TAP-Untereinheit induziert war (Abb. V. 4). Die Variation der Prozentzahl und Induktionshöhe der MHC-Klasse-I-Expression der EGFP-positiven mTAP1-EGFP- und mTAP2-EGFP-Transfektanten können durch die transiente Transfektion erklärt werden, da nicht immer die gleiche Menge an transfizierter Plasmid-DNA (mTAP1/2-EGFP und mTAP1/2) den Zellkern erreicht.

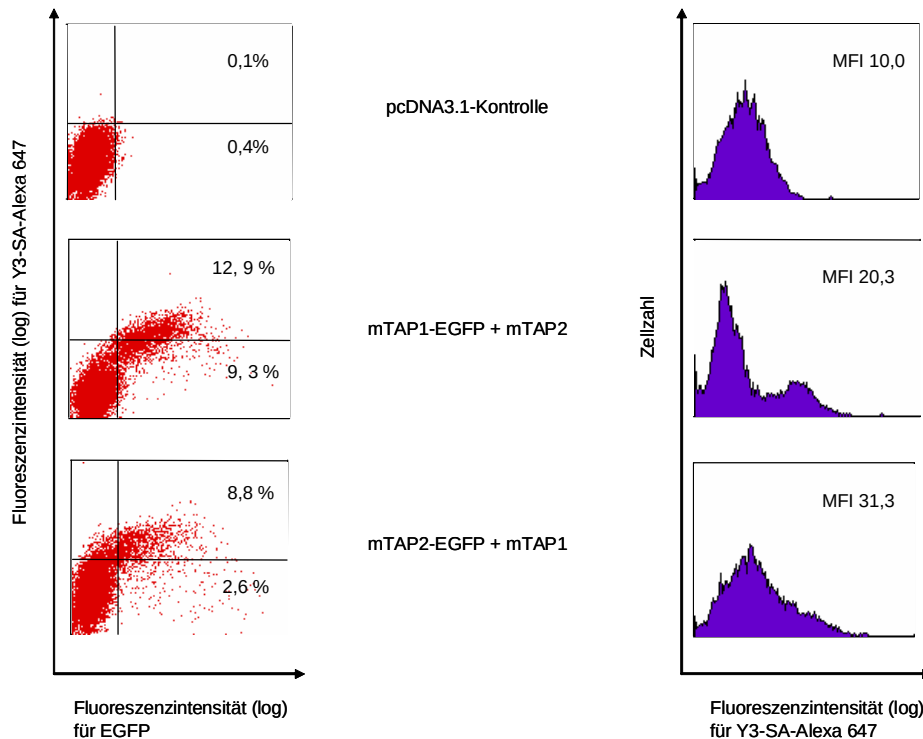


Abb. V. 4: Gesamtmenge an EGFP-positiven MCB6TAP1^{-/-}-Transfektanten und zelloberflächenexprimierten MHC-Klasse-I-Molekülen auf MCB6TAP1^{-/-}-Transfektanten

MCB6TAP1^{-/-}-Zellen wurden transient mit mTAP1-EGFP oder mTAP2-EGFP und der unmarkierten komplementären Wildtyp-TAP-Untereinheit transfiziert und mit 250 U/ml IFN- γ behandelt, um die konstitutiv sehr schwach ausgeprägte MHC-Klasse-I-Genexpression zu induzieren. Nach 48 h wurden FACS-Färbungen mit dem monoklonalen Antikörper Y3.1, der vollständig gefaltete und mit Peptid beladene H-2K^b-Moleküle erkennt, und Streptavidin Alexa Fluor 647 (SA-Alexa 647) durchgeführt. Aufgetragen ist einerseits die Fluoreszenzintensität für SA-Alexa 647 über die Fluoreszenzintensität für EGFP und andererseits die Zellzahl über die Fluoreszenzintensität für SA-Alexa 647.

1.3 Expression der TAP1- und TAP2-Deletionsmutanten in Tpn-defizienten MC4- und MCB6TAP1^{-/-}-Zellen

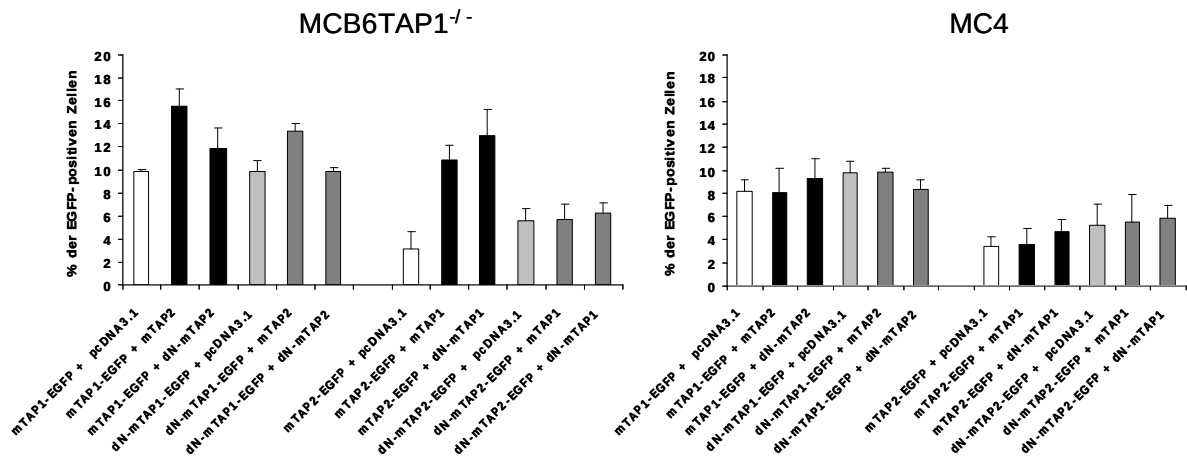
Tpn bindet an die N-terminale Domäne der TAP1- und TAP2-Untereinheiten (Koch et al., 2004; Procko et al., 2005; Leonhardt et al., 2005). Es sollte nun die bisher unbekannte, am stärksten von Tpn abhängige TAP-Untereinheit ermittelt werden. Zu diesem Zweck setzten wir die FACS-Analyse der Expression von EGFP-markierten TAP1/2-Untereinheiten voller Länge bzw. N-terminal verkürzten TAP1/2-Untereinheiten in Tpn-defizienten MC4- oder in Tpn-kompetenten MCB6TAP1^{-/-}-Zellen ein.

In Abwesenheit von TAP2 förderte Tpn reproduzierbar die Stabilität von TAP1-EGFP und Δ N-TAP1-EGFP nicht signifikant. Dies zeigte die vergleichbar starke Expression von TAP1-EGFP bzw. Δ N-TAP1-EGFP in MCB6TAP1^{-/-}- und MC4-Zellen (Abb. V. 5 A, B). Dagegen war die TAP2-EGFP-Untereinheit in beiden Zellen reproduzierbar instabil, wenn diese allein exprimiert wurde. Die TAP2-EGFP-Expression erforderte reproduzierbar die Koexpression von TAP1 und Tpn. Daher konnte in Tpn-kompetenten MCB6TAP1^{-/-}-Zellen eine signifikante TAP2-EGFP-Expression bei Kotransfektion mit entweder TAP1 oder Δ N-TAP1 beobachtet werden. Dies war jedoch nicht der Fall in TAP1 oder Δ N-TAP1 kotransfizierten Tpn-defizienten MC4-Zellen. In Übereinstimmung mit der Tpn-abhängigen Expression von TAP2 konnte eine heterodimere Steigerung der TAP1-EGFP- und Δ N-TAP1-EGFP-Expression durch kotransfiziertes TAP2 nur in Tpn-kompetenten MCB6TAP1^{-/-}-Zellen gezeigt werden.

Das N-terminal verkürzte TAP1-EGFP und das TAP1-EGFP voller Länge wurden mit ähnlicher Effizienz in MCB6TAP1^{-/-}- und MC4-Zellen in Abwesenheit der komplementären unmarkierten TAP-Untereinheit exprimiert. Dies lässt vermuten, dass die Tpn-Bindung an die N-Domäne von TAP1 für die TAP1-Expression nicht unbedingt notwendig ist. Umgekehrt wurde Δ N-TAP2-EGFP nur sehr schwach in MC4- und MCB6TAP1^{-/-}-Zellen exprimiert und konnte nicht signifikant durch Koexpression von TAP1 oder Δ N-TAP1 erhöht werden. Auch war Δ N-TAP2 nicht in der Lage die Expression von TAP1-EGFP oder Δ N-TAP1-EGFP zu steigern. Diese Ergebnisse zeigten, dass die N-Domäne von TAP2 aus Maus und Ratte für die Tpn-Bindung entscheidend ist. Aus diesen Experimenten kann außerdem geschossen werden, dass TAP2 eher als TAP1 geeignet ist die Tpn-vermittelte TAP-Stabilisierung in MC4-Zellen zu untersuchen.

A

mTAP- Konstrukte



B

rTAP- Konstrukte

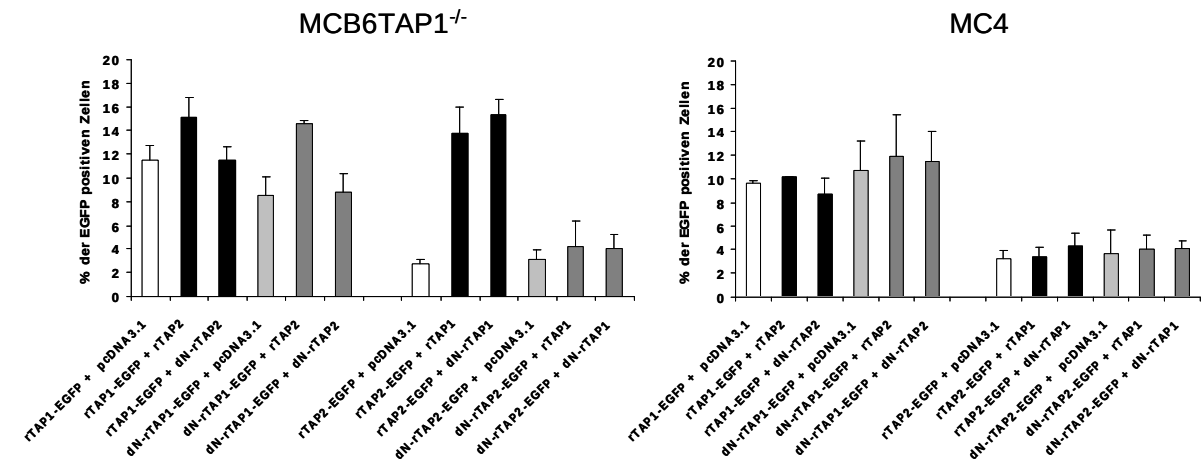


Abb. V. 5: Tpn und TAP1 sind für die Stabilisierung von TAP2 in Maus-Zellen erforderlich

Die angegebenen Konstrukte der Maus (A) oder Ratte (B) wurden transient entweder in Tpn-kompetente MCB6TAP1^{-/-} oder in Tpn-defiziente MC4-Zellen transfiziert. Der leere Vektor pcDNA3.1 wurde zum Ausgleich der transfizierten DNA-Menge als Kontrolle verwendet. Nach 48 h wurde die Expression der EGFP-markierten TAP-Untereinheiten im FACS analysiert. Gezeigt sind auf die Prozentzahl an EGFP-positiven Zellen bezogene Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

1.4 Western Blot-Analyse der TAP2- und DN-TAP2-Expression in Tpn-kompetenten MCB6TAP1^{-/-}-Zellen

Nach der Beobachtung, dass TAP2 für die Charakterisierung der Tpn-vermittelten TAP-Stabilisierung geeignet ist, sollte im nächsten Schritt die TAP2-Expression im Western Blot mit dem Kaninchen-anti-mTAP2-Serum nach Kotransfektion mit der komplementären TAP1-Untereinheit analysiert werden. Dies war notwendig, um eine Expressionskontrolle für die anschließende Peptidtransportaktivitätsuntersuchung zu haben. Das Kaninchen-anti-Calnexin(CNX)-Serum diente als Ladungskontrolle.

Die TAP2-Expression konnte im Wildtyp-TAP1/2- und Δ N-TAP1/TAP2-Heterodimer ungefähr in gleicher Intensität nachgewiesen werden (Abb. V. 6). Δ N-TAP2 wurde ebenfalls exprimiert. Die Expression war allerdings im Vergleich zu den anderen Varianten bei der Δ N-TAP1/ Δ N-TAP2-Kotransfektion schwächer.

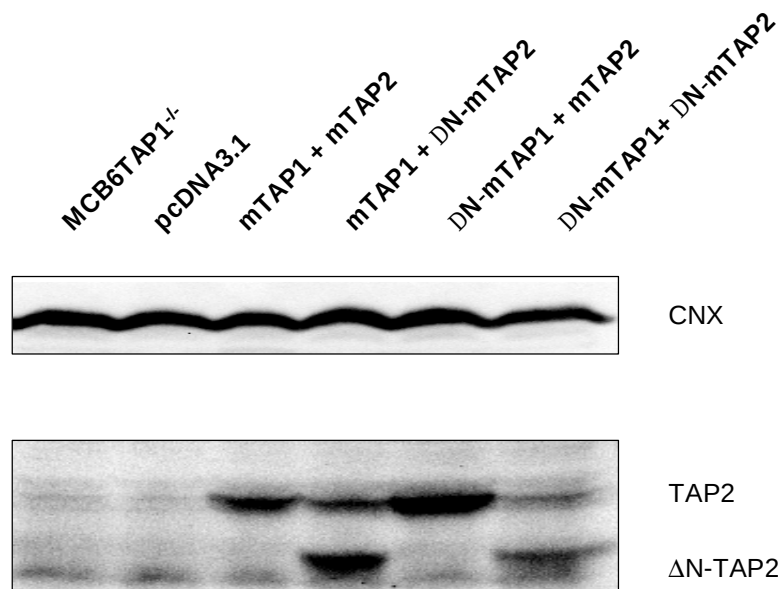


Abb. V. 6: TAP2- und Δ N-TAP2-Expression in MCB6TAP1^{-/-}-Zellen

Die angegebenen Konstrukte wurden transient in die Tpn-kompetenten MCB6TAP1^{-/-}-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden NP40-Lysate aus 1×10^6 Zellen im SDS-PAGE getrennt und der Immunblot mit dem Kaninchen-anti-mTAP2-Serum (mTAP2.688) und -anti-CNX-Serum (SPA-860; Ladungskontrolle) angefärbt. Die Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten reproduziert.

1.5 Peptidtransport des Kern-TAP-Komplexes

Der Transport von radioaktiv markierten Peptiden wurde mit Hilfe von Streptolysin O-permeabilisierten Zellen untersucht. Dazu werden Peptidsubstrate verwendet, die eine N-Glykosylierungssequenz besitzen, so dass die ER-spezifische N-Glykosyltransferase ein N-Glykan auf das Peptid übertragen kann. Durch die Verwendung von glykosylierbaren Peptiden wird der Efflux von Peptiden aus dem ER verhindert. Weiterhin kann die translozierte und glykosylierte Peptidfraktion im ER von den nicht translozierten zytosolischen Peptiden mittels Concanavalin A-Sepharose aufgrund der Interaktion des Lektins mit dem N-Glykan quantitativ getrennt werden (Neefjes et al., 1993).

Es konnte bereits für rTAP und hTAP gezeigt werden, dass die 6 + 6 Transmembranhelix (TM)-Kerndomäne des TAP-Komplexes bestehend aus den TMs 5-10 von TAP1 und den TMs 4-9 von TAP2 für den Peptidtransport ausreichend ist (Koch et al., 2004; Procko et al., 2005, Leonhardt et al., 2005). Es sollte daher in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob dies ebenfalls der Fall für mTAP ist.

Das hier verwendete Peptid (#600: TNKTRIDGQY) hatte an einem Ende eine N-Glykosylierungskonsensussequenz (NKT) und am anderen Ende eine Radiojodierungsstelle (Tyr) (Koopmann et al., 1996). Dies stellt sicher, dass nur intakte Peptide detektiert werden, wenn sie vom Zytosol in das ER transportiert werden. Die glykosylierten Peptide wurden mit Concanavalin A-Sepharose aus dem ER extrahiert und von der Fraktion der nicht glykosylierten Peptide getrennt und mit einem Bohrloch-Gammazähler quantifiziert. Wurde die C-terminal gelegene radioaktive Aminosäure oder die N-Glykan-Akzeptorsequenz durch eine Protease angegriffen, konnte das Peptid nicht erfasst werden und verfälschte nicht die Auswertung der intakt translozierten Peptide. Da für die N-Glykosylierung die α -NH₂-Gruppe eines N-terminalen Asn modifiziert sein muss ist dem Asn ein Thr vorangestellt.

In MCB6TAP1^{-/-}-Zellen konnte nach 48 h Transfektion von mTAP1/mTAP2, mTAP1/m Δ N-TAP2, m Δ N-TAP1/mTAP2 oder m Δ N-TAP1/m Δ N-TAP2 eine ATP-abhängige Transportaktivität nachgewiesen werden (Abb. V. 7). Peptide konnten jedoch nicht bei Transfektion mit dem Vektor pcDNA3.1 transportiert werden. Dies demonstriert die Bildung funktioneller TAP-Heterodimere. Die etwas geringere Transportaktivität von m Δ N-TAP1 und m Δ N-TAP2 kann durch die geringere m Δ N-TAP2-Expression im Western Blot erklärt werden (Abb. V. 6). Auch in Maus scheint die Kerndomäne des TAP-Komplexes, bestehend aus 6 TMs von mTAP1 und 6 TMs von mTAP2, ausreichend für den Peptidtransport zu sein.

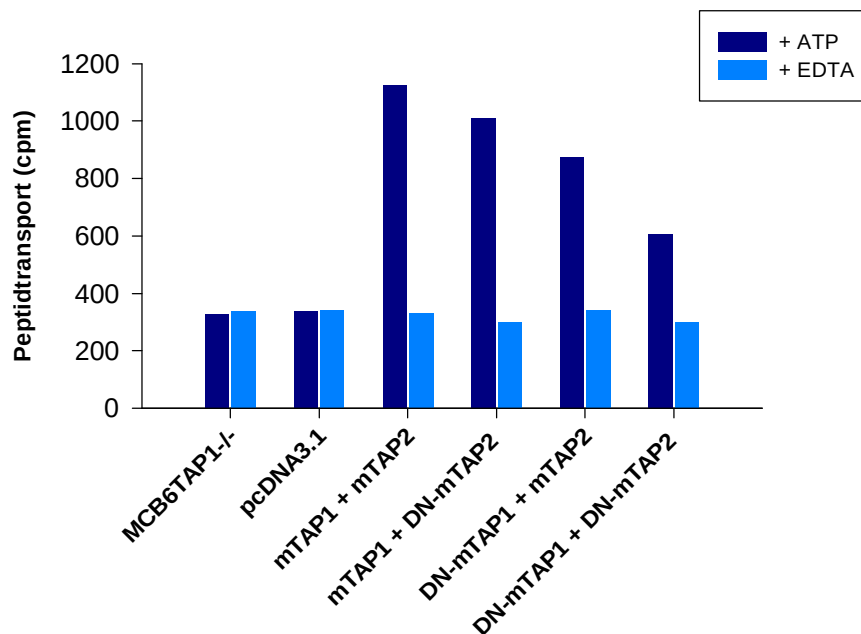


Abb. V. 7: Peptidtransport von mTAP1/mTAP2, mTAP1/m Δ N-TAP2, m Δ N-TAP1/mTAP2 und m Δ N-TAP1/ m Δ N-TAP2 in MCB6TAP1^{-/-}-Zellen

Die angegebenen Konstrukte wurden transient in die Tpn-kompetenten MCB6TAP1^{-/-}-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen der Transfektanten mit Streptolysin O permeabilisiert und in Gegenwart des radioaktiv markierten Peptids (#600: TNKTRIDGQY) und 10 mM ATP bzw. 5 mM EDTA bei 37 °C inkubiert. Glykosylierte und deshalb transportierte Peptide wurden mit Concanavalin A-Sepharose Beads isoliert und mittels Bohrloch-Gammazähler quantifiziert. Die Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten reproduziert.

2. Analyse des molekularen Mechanismus der TAP-Stabilisierung durch Tpn

2.1 Vergleich von Tpn-Sequenzen verschiedener Spezies

Bisher ist nur die Kristallstruktur der hTAP1-Nukleotidbindungsdomäne (NBD) des TAP-Heterodimers bekannt (Gaudet and Wiley, 2001). Die Röntgenstruktur von Tpn fehlt, da Tpn schwer zu kristallisieren ist. Die TAP-Expression ist in Abwesenheit von funktionellem Tpn in humanen B-lymphoblastoiden Zellen etwa 3- bis 6-fach reduziert (Lehner et al., 1998; Tan et al., 2002). In Milzzellen von Tpn-defizienten Mäusen ist die TAP-Expression sogar etwa 300-fach vermindert (Garbi et al., 2003). Um die Tpn-Interaktionsstellen für die TAP-Stabilisierung detailliert zu untersuchen,

wurden in der Transmembrandomäne (TMD) und/oder im Verbindungspeptid (CP) von mTpn einzelne bzw. multiple Aminosäuren ausgetauscht und mTpn-TMD-Chimären generiert. Die mTpn-Mutanten wurden in Tpn^{-/-}-MC4-Zellen exprimiert. Um den Austausch einzelner Aminosäuren in der hTpn-TMD zu untersuchen, wurde zusätzlich die Tpn-defiziente humane B-lymphoblastoide Zelllinie .220 verwendet. Ein Vergleich der CPs, der TMDs und der zytoplasmatischen Domänen der Tpn-Moleküle aus Maus, Ratte, Rind, Mensch, Hund, Huhn, Zebrafisch und Regenbogenforelle ist in Abbildung V. 8 dargestellt. Das Programm TMHMM (*Trans Membrane Hidden Markov Model*) Version 2.0 (Quelle: www.cbs.dtu.dk) ermöglicht die Vorhersage von TMs in Proteinsequenzen und die Position der intra- und extrazellulären Proteinbereiche anhand des Aminosäuresequenzvergleichs mit bereits bekannten TMD-Sequenzen.

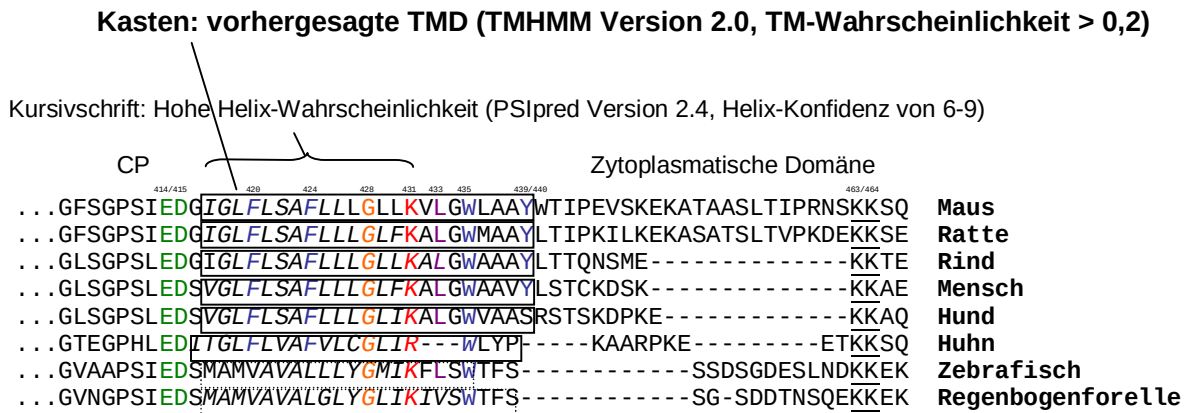


Abb. V. 8: Vergleich der CPs, TMDs und zytoplasmatischen Domänen verschiedener Tpn-Spezies

Das Sequenz-Alignment wurde mit Clustal V im DNASTAR Programmpaket durchgeführt. Saure konservierte Aminosäuren sind grün, aromatische konservierte Aminosäuren sind blau, konservierte basische Aminosäuren sind rot, das konservierte Leu mit unpolaren hydrophoben Seitenketten ist lila und das konservierte Gly ohne Seitenkette ist orange dargestellt.

Der Kasten zeigt die vorhergesagten TMDs der verschiedenen Spezies durch das Programm. Es konnte mit dem Programm TMHMM keine TMD für die beiden Fisch-Tpn-Sequenzen vorhergesagt werden, jedoch wurden die Aminosäuren mit einer TM-Wahrscheinlichkeit von mehr als 0,2 gestrichelt eingerahmt. Bei allen anderen Tpn-Sequenzen konnte eine TMD (TM-Wahrscheinlichkeit von 0,4-1,0) vorhergesagt werden. Mit Hilfe des Programms PSIpred können Proteinsekundärstrukturen vorhergesagt werden (Jones, 1999; Quelle: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Dabei wird zunächst ein Sequenzprofil erstellt und anschließend eine initiale

Sekundärstruktur vorhergesagt. Schließlich wird die vorhergesagte Sekundärstruktur gefiltert. PSIPred konnte eine hohe α -Helix-Wahrscheinlichkeit (Konfidenz 6-9) für den N-terminalen Teil vorhersagen, der sich vom N-terminalen Ende der mutmaßlichen TMDs bis meistens zu der konservierten basischen Aminosäure Lys oder einen Rest daneben erstreckt. Außerdem wurde eine geringere α -Helix-Wahrscheinlichkeit (Konfidenz < 6) für den C-terminalen Teil der TMD vorausgesagt. Der Vergleich der Säugetier-Tpn-Sequenzen mit den Nichtsäugetier-Tpn-Sequenzen verdeutlicht, dass der C-terminale Teil weniger konserviert in seiner Länge und Sequenzhomologie ist als der N-terminale Teil. Im CP aller Tpn-Sequenzen fällt ein Motiv von zwei hochkonservierten sauren Aminosäuren (Glu-Asp) auf. Ein Hybrid aus der Ektodomäne von CD8 und der mTpn-TMD, das 5 Aminosäuren vor der TMD von mTpn beinhaltet, ist fähig TAP zu stabilisieren (Boname et al., 2005). Dieser Befund schließt nicht aus, dass auch der C-terminale Bereich des CP an der TAP-Stabilisierung beteiligt sein könnte. Die zytoplasmatische Domäne von mTpn hat keine signifikante Homologie (ausgenommen zu dem eng verwandten rTpn) zu hTpn und Tpn aus anderen Spezies, endet jedoch bei allen Tpn-Sequenzen mit einem KKXX-ER-Retentionssignal (Frangoulis et al., 1999). mTpn kann in hTpn-defizienten .220-Zellen hTAP stabilisieren (Tan et al., 2002). Umgekehrt kann hTpn in Maus-Zellen mTAP stabilisieren (Peh et al., 2000). Dies verdeutlicht, dass es unwahrscheinlich ist, dass die zytoplasmatische Domäne eine entscheidende funktionelle Rolle bei der TAP-Stabilisierung spielt und deshalb wurde diese nicht näher untersucht.

2.2 Generierung von mTpn-Chimären und m/hTpn-Mutanten

Die im folgenden beschriebenen mTpn-Chimären und m/hTpn-Mutanten wurden aus der cDNA von mTpn und hTpn, wie im Material- und Methodenteil unter 1.4.2.3 und 1.4.2.4 beschrieben, in mehreren Klonierungsschritten generiert. Die hTpn-Konstrukte wurden in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1- subkloniert und mittels Elektroporation in die B-lymphoblastoide-Zelllinie .220 transfiziert. Stabile Transfektanten wurden mittels Elektroporation und anschließendem Selektionieren mit dem Antibiotikum Geneticin hergestellt. mTpn-Chimären und mTpn-Mutanten wurden dagegen in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1+ subkloniert und mittels Lipofektion in die Tpn-defiziente Fibroblastenzelllinie MC4 transient für 48 h transfiziert. Die Herstellung stabiler Transfektanten war nicht möglich, da die MC4-Zellen die Tpn-Expression nach mehreren Kulturpassagen wieder verloren.

2.3 Analyse von Einzel- und Doppel-Mutationen in der TMD bzw. im CP von mTpn

Um die Tpn-vermittelte TAP-Stabilisierung näher zu charakterisieren, wurde zunächst eine Reihe von Mutanten untersucht: das konservierte E414/D415-Motiv im CP, das konservierte KKXX-ER-Retentionssignal, die konservierten Aminosäurereste K431, L433 und W435, sowie der aromatische Cluster Y439/W440 im C-terminalen Teil der TMD von mTpn. Zusätzlich wurde eine natürlich vorkommende mTpn-Spleißvariante untersucht, die durch Einführung eines zusätzlichen Val nach L436 generiert wurde. Es ist bekannt, dass diese mTpn-Spleißvariante die MHC-Klasse-I-Expression in Tpn-defizienten Zellen der Maus wieder herstellt (Boname et al., 2005).

Da mTAP2-EGFP die Koexpression von mTAP1 und mTpn benötigt (Abb. V. 5), um ein signifikantes Niveau an EGFP-positiven Zellen zu erhalten, wurden mTAP1 und mTAP2-EGFP zusammen mit den verschiedenen mTpn-Mutanten in MC4-Zellen für 48 h transient transfiziert. Mittels FACS-Analyse wurde anschließend die TAP2-EGFP-Stabilisierung analysiert. In Abbildung V. 9 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Bei Anwesenheit von mTAP1 und Wildtyp-mTpn, mTpn-V436a, mTpn-W435L oder mTpn-Y439A/W440L wurden gleiche TAP2-EGFP-Expressionsniveaus beobachtet. Dies deutet an, dass diese Aminosäuren nicht entscheidend für die Tpn-vermittelte TAP-Stabilisierung sind. Obwohl Lys in der TMD von Maus und Mensch und Leu in der hTpn-TMD eine wichtige Rolle bei der TAP-Stabilisierung spielen sollen (Tan et al., 2002; Peterson et al., 2005), konnte in der vorliegenden Arbeit mit den Mutanten mTpn-K431L und mTpn-L433F keine Reduktion der TAP2-EGFP-Expression nachgewiesen werden. Das mTAP2-EGFP-Expressionsniveau war bei der mTpn-K463A/K464A-Mutante mit ausgeschaltetem ER-Retentionssignal gleich stark wie Wildtyp-mTpn. Wahrscheinlich ist die mTpn-K463A/K464A-Mutante im ER lokalisiert, da sonst das Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel wegen der Golgi-abhängigen Glykanmodifizierung der mTpn-Mutante langsamer sein würde (Abb. V. 10). Dies ist in Übereinstimmung mit den früheren Beobachtungen, dass die ER-Retention von hTpn nicht allein durch das KKXX-Retentionsmotiv bestimmt wird (Tan et al., 2002). Im Gegensatz dazu war die TAP2-EGFP-Expression nach Transfektion von mTpn-E414K/D415N fast vollständig verloren. Diese Mutante wurde wie Wildtyp-mTpn exprimiert (Abb. V. 10).

Um die TAP2-Expression durch ECL-Signale zu quantifizieren wurden diese verschiedenen mTpn-Mutanten transient in MC4 transfiziert und nach 48 h im Western Blot untersucht. Wie aus dem Abschnitt 1.3 im Ergebnisteil hervorgeht, ist zur Untersuchung der TAP-Stabilisierung durch Tpn die TAP2-Untereinheit geeigneter als TAP1. Es wurde daher ein Kaninchen-anti-mTAP2-Serum im Western Blot verwendet. Um die Tpn-Expression der verschiedenen mTpn-Mutanten nach-

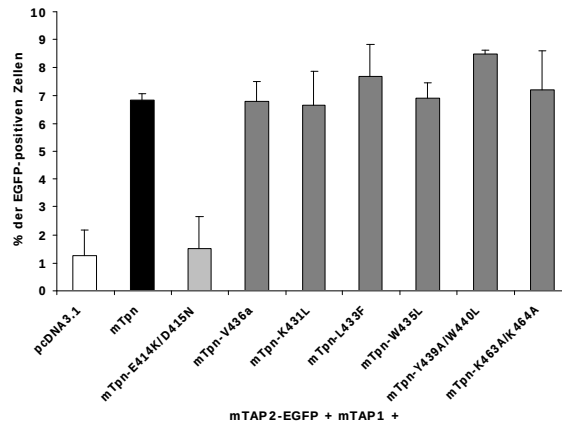


Abb. V. 9: Das E414/D415-Motiv ist für die Stabilisierung von TAP2-EGFP notwendig. Die angegebenen mTpn-Mutanten wurden transient in Tpn-defiziente MC4-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurde die TAP2-EGFP-Stabilisierung im FACS analysiert. Gezeigt sind auf die Prozentzahl an EGFP-positiven Zellen bezogene Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

zuweisen, wurde ein Kaninchen-anti-mTpn(N-Terminus)-Serum verwendet. Wie aus Abbildung V. 10 und 13 D hervorgeht werden alle mTpn-Mutanten in gleicher Intensität wie Wildtyp-mTpn exprimiert. Wie bereits im FACS beobachtet, wurde auch im Western Blot ein fast vollständiger Verlust der TAP2-Stabilisierung durch mTpn-E414K/D415N nachgewiesen. Die TAP2-Expression war in Anwesenheit der mTpn-Mutante K463A/K464A nicht signifikant reduziert. Die mTpn-

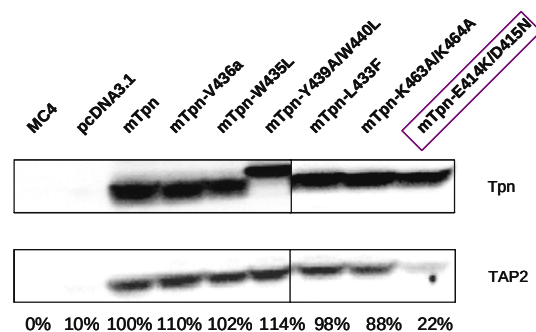


Abb. V. 10: Stabilisierung von TAP2 durch mTpn-Konstrukte in Tpn-defizienten MC4-Zellen

Die angegebenen mTpn-Mutanten wurden transient in die Tpn-defizienten MC4-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden NP40-Lysate aus 1×10^6 Zellen im SDS-PAGE getrennt und der Immunblot mit dem Kaninchen-anti-mTAP2-Serum (mTAP2.688) und -anti-mTpn(N-Terminus)-Serum (Ra2668) angefärbt. Die Intensität der TAP2-Banden wurde mittels LumiAnalyst Software quantifiziert. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten reproduziert.

Mutante K431L (Abb. V. 13 D) und die anderen mTpn-Mutationen konnten funktionell Wildtyp-mTpn ersetzen und zeigten ähnliche Gleichgewichtsexpressionsmengen von mTAP2.

2.4 Zelluläre Lokalisation von mTpn-Y439A/W440L

Die Lokalisation von Proteinen wird durch Verdau mit Endoglykosidase H (Endo H) und Nachweis im Western Blot bestimmt. Endo H spaltet ER-spezifische, mannosereiche N-Glykane von Proteinen ab. Nach Modifikationen im medianen Golgi werden die Glykane Endo H-resistent. Endo H-sensitive Formen sind im ER lokalisiert und haben ein geringeres Molekulargewicht als Endo H-resistente Formen, die sich an der Zelloberfläche befinden. Das Laufverhalten der Mutante mTpn-Y439A/W440L war im SDS-PAGE reproduzierbar verlangsamt (Abb. V. 10). Es sollte daher die Lokalisation der mTpn-Mutante Y439A/W440L im Vergleich zum Wildtyp-mTpn-Protein und zur mTpn-Mutante Y439A, bei der das Laufverhalten normal war (Abb. V. 11 und 13 B), bestimmt werden (Abb. V. 11). Als Ladungskontrolle diente das Kaninchen-anti-CNX-Serum (SPA-860).

Wildtyp-mTpn und die beiden Mutanten mit den Substitutionen Y439A/W440L und Y439A waren anscheinend vollständig im ER lokalisiert (Abb. V. 11). Alle zeigten sich vollständig Endo H-sensitiv und hatten nach Enzymbehandlung das gleiche Molekulargewicht.

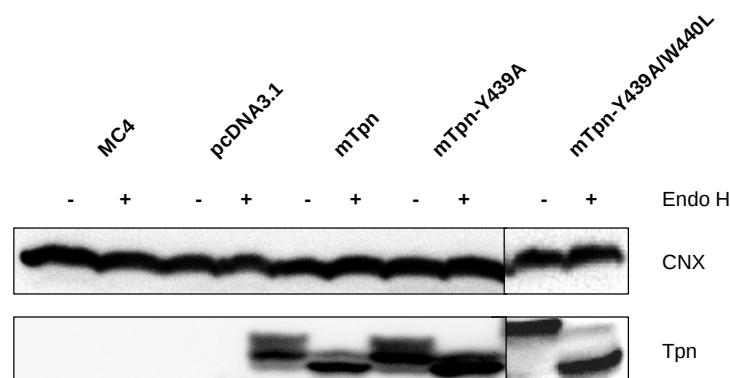


Abb. V. 11: Intrazelluläre Lokalisation von mTpn-Y439A und -Y439A/W440L

Die angegebenen mTpn-Mutanten wurden transient in die Tpn-defizienten MC4Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden NP40-Lysate aus 2×10^6 Zellen hergestellt und jeweils 1×10^6 Zellen entweder mit Endo H (+ Endo H) oder als Kontrolle ohne Endo H (- Endo H) für 2 h bei 37 °C verdaut. Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE wurde der Immunblot mit dem Kaninchen-anti-CNX-Serum (SPA-860; Ladungskontrolle) und -anti-mTpn(N-Terminus)-Serum (Ra2668) angefärbt. Endo H-sensitive Formen, die im ER lokalisiert sind, haben ein geringeres Molekulargewicht (untere Bande) als Endo H-resistente Formen (obere Bande), die sich an der Zelloberfläche befinden. Die Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten reproduziert.

Die im Vergleich zu Wildtyp-mTpn und mTpn-Y439A größere Molekulargewichtsreduktion durch Endo H legt eine aberrante N-Glykosylierung an der bekannten Glykosylierungsstelle N233 nahe. Die Sequenzierung der cDNA für mTpn-Y439A/W440L ergab keine Hinweise auf eine neue N-X-S/T-Glykosylierungsstelle in der Ektodomäne von Tpn, die durch eine unbeabsichtigte Punktmutation entstanden sein könnte. Es bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt offen, warum es bei der TMD-Mutante Y439A/W440L zu einer verstärkten Glykosylierung kam. Diese Doppelmutation verlängert den als α -helical vorhergesagten Bereich der TMD und könnte daher das Migrationsverhalten von Tpn in der ER-Membran und den Zugang von Oligosaccharyltransferasen beeinflussen. Wie in Abbildung V. 10 zu erkennen ist, war jedoch keine Reduktion der TAP2-Stabilisierung festzustellen.

2.5 Die Rolle des sauren Motivs im CP des Tpn-Moleküls und weiterer Aminosäurereste in der Tpn-TMD bei der TAP2-Stabilisierung

Das saure Motiv im CP scheint für die TAP-Stabilisierungsfunktion von Tpn essentiell zu sein. Es stellte sich daher die Frage, ob E414/D415 alleine für die Stabilisierung von TAP2 ausreichend ist. Daher wurde die mTpn-TMD entweder gegen die heterologe TMD von hCNX oder gegen die heterologe TMD des hTpn-verwandten (hTpn-R)-Proteins ausgetauscht, wobei das CP von mTpn erhalten blieb (Abb. V. 12). In zwei anderen Tpn-Chimären wurden die Aminosäurereste SIEDG des CPs zusätzlich durch die N-terminal an die TMD angrenzenden 6 Aminosäuren von hCNX oder hTpn-R-Protein ausgetauscht (Abb. V. 12).

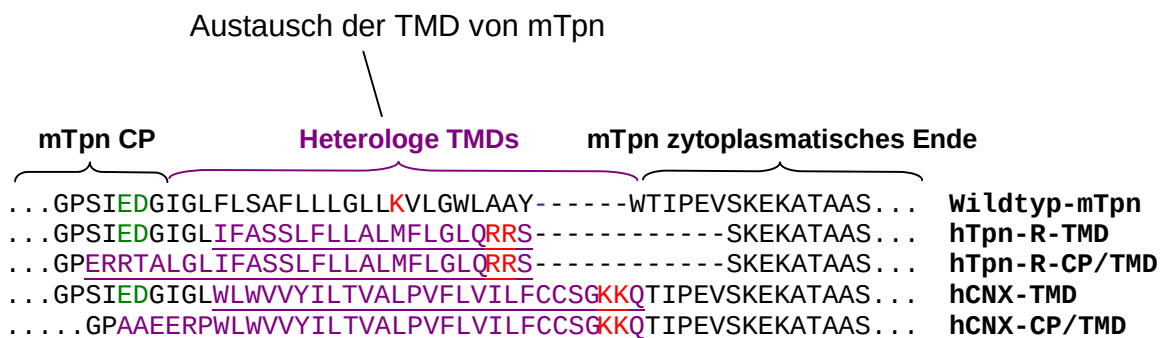


Abb. V. 12: Teilsequenzen von Wildtyp-mTpn und der verwendeten mTpn-Chimären
Das saure konservierte Motiv im CP ist grün, basische Aminosäuren sind rot und die ausgetauschten Aminosäuren der mTpn-TMD gegen heterologe TMDs sind bis auf die basischen Aminosäuren (Lys/Arg) lila dargestellt und unterstrichen.

CNX wurde ausgewählt, da es mit Tpn nicht verwandt ist und in einem intermediären TAP-Komplex an die TMD und zytoplasmatische Domäne von Tpn bindet (Diedrich et al., 2001). Die TMD von CNX weist keine Homologie zur TMD von Tpn auf. Das Tpn-R-Protein wurde verwendet, weil es am nächsten mit Tpn verwandt ist. Es besitzt eine Aminosäuresequenzidentität von 22 % und eine Aminosäuresequenzähnlichkeit von 33 % zum Tpn-Protein (Teng et al., 2002). Das Tpn-R-Protein wird durch das TAPBP-R-Gen kodiert, das auf Chromosom 12 zwischen den CD27- und VAMP1-Genen nahe eines MHC-paralogen Genclusters lokalisiert ist. Die Tpn-R-Protein-TMD endet mit einem Arg-Arg-Motiv und es fehlt der konservierte Lys(Arg)-Rest in der Mitte der TMD von Tpn aus verschiedenen Spezies (Abb. V. 8). Die TMD-Sequenz des hTpn-R-Proteins zeigt keine auffälligen Ähnlichkeiten zur TMD von mTpn oder hTpn. Bei dem hTpn-R-Protein fehlen konservierte Aminosäurereste. Auch die zytoplasmatische Domäne des hTpn-R-Proteins unterscheidet sich von den oben genannten Spezies, indem diese nicht mit einem ER-Retentionssignal endet. Dies hat zur Folge, dass das Tpn-R-Protein an der Zelloberfläche exprimiert wird. Die Funktion im Immunsystem ist bisher unklar.

In Abbildung V. 13 A sind die Ergebnisse der Analyse der TAP2-Stabilisierung zusammengefasst. Alle mTpn-Chimären wurden genauso effizient oder sogar stärker exprimiert als Wildtyp-mTpn. Die Chimären mTpn-hCNX-TMD und mTpn-hCNX-CP/TMD haben jedoch die Fähigkeit verloren, TAP2 zu stabilisieren. Im Vergleich zu den Vektor-transfizierten oder untransfizierten MC4-Zellen zeigten die beiden Chimären mTpn-hTpn-R-CP/TMD und mTpn-hTpn-R-TMD eine sehr schwache TAP2-Stabilisierung. Demnach kann E414/D415 im mTpn-CP die TMDs von hCNX oder hTpn-R-Protein nicht dazu befähigen TAP2 zu stabilisieren. Das saure Motiv im CP von mTpn funktioniert offensichtlich nicht unabhängig von der TMD.

Um nun zu überprüfen, ob eine Substitution von E414 oder D415 im CP von mTpn die TAP2-Stabilisierung beeinflusst, wurden beide oder die einzelnen Aminosäuren gegen Ser ausgetauscht und die Mutanten in MC4 exprimiert. Die mTpn-Expression war bei den Mutanten mTpn-E414S, mTpn-D415S und mTpn-E414S/D415S mit derjenigen von Wildtyp-mTpn vergleichbar (Abb. V. 13 B). In Anwesenheit von mTpn-D415S war die TAP2-Stabilisierung normal. Im Gegensatz dazu war die TAP2-Stabilisierung nach Transfektion mit mTpn-E414S drastisch reduziert. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aminosäure Glu an Position 414 und nicht Asp an Position 415 für die TAP-Stabilisierung wichtig ist. Die Doppelmutante mTpn-E414S/D415S zeigte einen geringeren Effekt auf die Reduktion der TAP2-Expression als mTpn-E414K/D415N (Abb. V. 10 und 13 B, C). Daraus wird ersichtlich, dass ebenfalls die Kombination der ausgetauschten Aminosäuren eine Rolle spielt. Anscheinend hebt Ser an Position 414/415 den stark reduzierten Effekt von Lys an Position 414 und Asn an Position 415 teilweise auf.

Wegen des nicht signifikanten Effekts auf die TAP2-Stabilisierung in Gegenwart von mTpn-K431L wurden weitere Mutationen von K431 analysiert. Außerdem wurde

aufgrund des aberranten Laufverhaltens von mTpn-Y439A/W440L im Vergleich zu Wildtyp-mTpn die Mutante mTpn-Y439 analysiert. Eine Verkürzung der hydrophoben und unpolaren Seitenkette an Position 431 (K431L → K431A → K431G) scheint die Interaktion mit TAP nicht zu reduzieren (Abb. V. 13 D). Auch zeigten die mTpn-Mutanten K431E und K431D, die an der Position 431 statt Lys eine saure Aminosäure haben, eine mit Wildtyp-mTpn vergleichbare TAP2-Stabilisierung. Die Mutante mTpn-K431Q, die statt einer geladenen Seitenkette eine ungeladene polare an Position 431 besitzt, hatte ebenfalls keinen negativen Einfluss auf die TAP2-Stabilisierung.

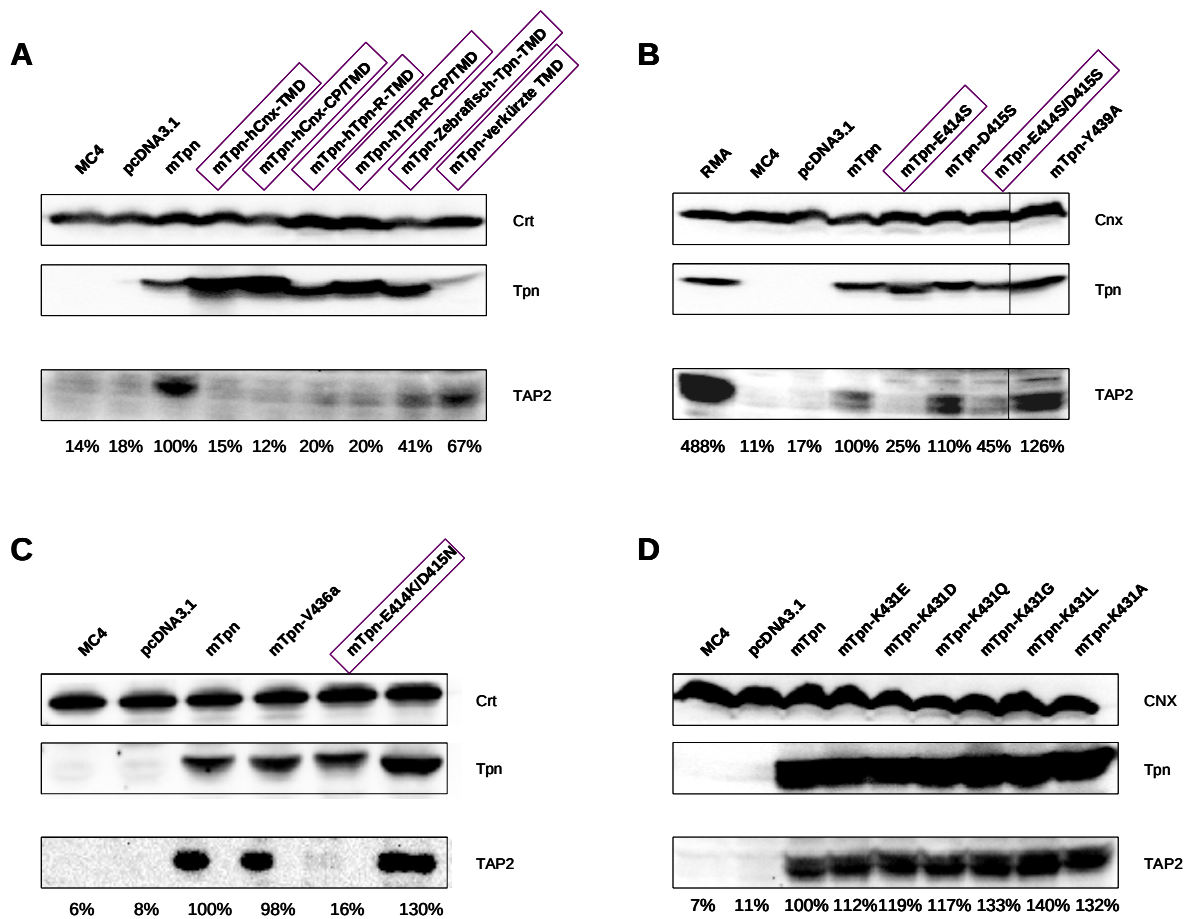


Abb. V. 13: Stabilisierung von TAP2 durch mTpn-Chimären und -Mutanten in Tpn-defizienten MC4-Zellen

Die angegebenen mTpn-Chimären und -Mutanten wurden transient in die Tpn-defizienten MC4-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden NP40-Lysate aus 1×10^6 Zellen im SDS-PAGE getrennt und die Immunblots mit dem Kaninchen-anti-CRT-Serum (SPA-600; Ladungskontrolle), -anti-CNX-Serum (SPA-860; Ladungskontrolle), -anti-mTAP2-Serum (mTAP2.688) und -anti-mTpn(N-Terminus)-Serum (Ra2668) angefärbt. Die Intensität der TAP2-Banden wurde mittels LumiAnalyst Software quantifiziert. Die Ergebnisse wurden in vier bis sechs unabhängigen Experimenten reproduziert.

Ein Austausch der konservierten Aminosäure K431 hatte also erstaunlicherweise keinen negativen Effekt auf die TAP2-stabilisierende Funktion der mTpn-TMD. Im Gegensatz zu mTpn-Y439A/W440L zeigte die mTpn-Mutante Y439A ein normales Laufverhalten (Abb. V. 11 und 13 B). In Anwesenheit von mTpn-Y439A wurde allerdings die TAP2-Stabilisierung ebenfalls nicht beeinträchtigt. Außerdem zeigten beide ein mit Wildtyp-mTpn vergleichbares mTpn-Expressionsniveau (Abb. V. 10 und 13 B).

2.6 Der Einfluss einer verkürzten mTpn-TMD und von TMDs aus heterologen Tpn-Molekülen

Es sollte zusätzlich untersucht werden, ob die TMD von phylogenetisch von mTpn weit entfernten Tpn-Moleküle aus Huhn oder Zebrafisch die TAP2-Stabilisierung beeinflussen. Dazu wurden die heterologen TMDs von Huhn- und Zebrafisch-Tpn zwischen das CP und die zytoplasmatischen Domäne von mTpn eingefügt und im Western Blot analysiert (Abb. V. 14).

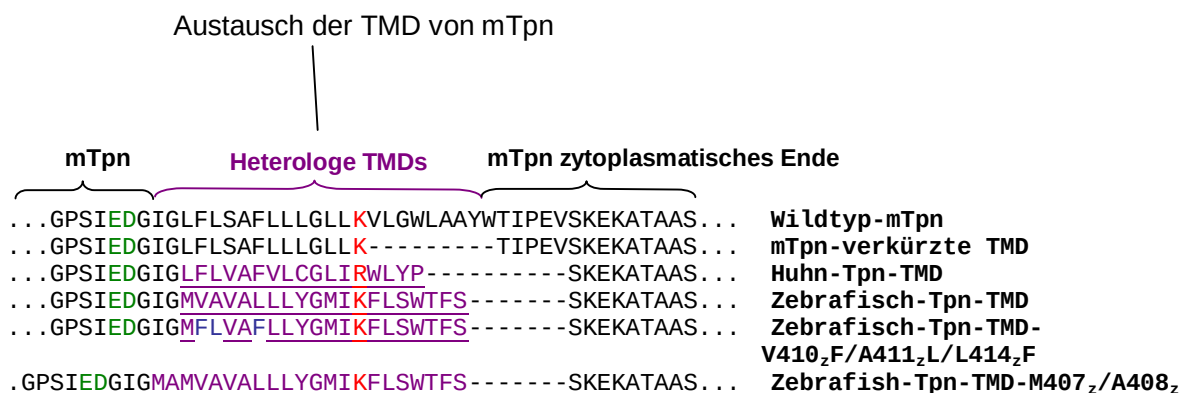


Abb. V. 14: Teilsequenzen der mTpn-Mutante mit verkürzter TMD und der verwendeten mTpn-Chimären

Das saure konservierte Motiv im CP ist grün, basische Aminosäuren sind rot und die ausgetauschten Aminosäuren der mTpn-TMD gegen heterologe TMDs sind bis auf die basischen Aminosäuren (Lys/Arg) lila dargestellt und unterstrichen. Blau sind die ausgetauschten Aminosäuren in der TMD von Zebrafisch-Tpn.

Diese mTpn-Chimären zeigten etwas stärkere Expressionsniveaus als Wildtyp-mTpn (Abb. V. 13 A und 15). Im Gegensatz zu den TMDs von hCNX und hTpn-R-Protein ist die TMD von Huhn-Tpn, bei der ein um 4 Aminosäuren verkürzter C-terminaler

TMD-Teil vorhergesagt wurde als bei mTpn, vollständig funktionell in Bezug auf die TAP2-Stabilisierung (Abb. V. 13 A und 15). Das chimäre mTpn-Molekül, welches die TMD von Zebrafisch-Tpn enthält, stabilisierte die TAP2-Expression allerdings nur zu 41 % - 48 % des Wildtyp-mTpn-Niveaus (Abb. V. 13 A und 15). Diese Befunde lassen vermuten, dass Sequenzinformationen im N-Terminus der Tpn-TMD für die TAP2-Stabilisierung wichtig sind, da das Huhn-Tpn eine größere Homologie mit mTpn im N-terminalen Teil der TMD besitzt als Zebrafisch-Tpn (Abb. V. 8).

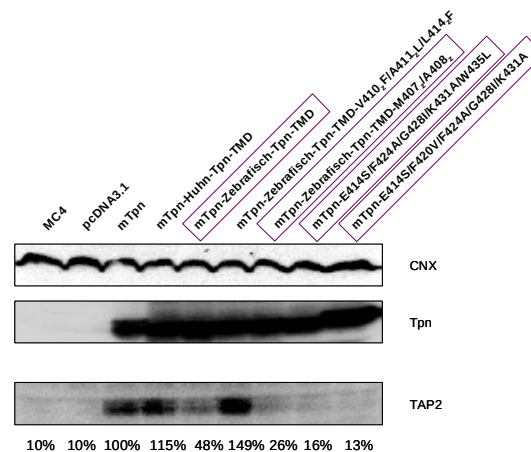


Abb. V. 15: Stabilisierung von TAP2 durch mTpn-Chimären und mTpn-Mutanten in Tpn-defizienten MC4-Zellen

Die angegebenen mTpn-Mutanten und -Chimären wurden transient in die Tpn-defizienten MC4-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden NP40-Lysate aus 1×10^6 Zellen im SDS-PAGE getrennt und die Immunblots mit dem Kaninchen-anti-CN-X-Serum (SPA-860; Ladungskontrolle), -anti-mTAP2-Serum (mTAP2.688) und -anti-mTpn(N-Terminus)-Serum (Ra2668) angefärbt. Die Intensität der TAP2-Banden wurde mittels LumiAnalyst Software quantifiziert. Die Ergebnisse wurden in vier unabhängigen Experimenten reproduziert.

Um die Frage näher zu untersuchen welcher Bereich der mTpn-TMD für die TAP2-Stabilisierung essentiell ist, wurde zusätzlich der C-terminale Teil (VLGWAAAYW) in der TMD von mTpn deletiert (Abb. V. 14). Die mTpn-Mutante mit verkürzter TMD wurde nach transienter Transfektion von MC4-Zellen nur schwach exprimiert (Abb. V. 13 A). Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die ineffiziente Membranintegration der minimalen TM (15 Aminosäuren). Trotz der schwachen Expression ist die TAP2-Stabilisierung 67 % des Wildtyp-mTpn-Niveaus. Dies bestätigt die Wichtigkeit des N-terminalen Bereichs.

In allen Tpn-Spezies außer in denjenigen von Regenbogenforelle und Zebrafisch sind im N-Terminus der TMD die Aminosäuren F420/L421/F424 konserviert (Abb. V.

8). Um nun zu analysieren, ob das Fehlen dieser hydrophoben Aminosäuren in der Zebrafisch-TMD im für die TAP2-Stabilisierung essentiellen N-Terminus wichtig ist, wurde das chimäre mTpn-Molekül mTpn-Zebrafisch-Tpn-TMD-V410_zF/A411_zL/L414_zF (Nummierung entsprechend der Zebrafisch(z)-Tpn-Sequenz) generiert, in dem das FLxxF-Motiv in die Zebrafisch-TMD-Sequenz eingeführt wurde. Zusätzlich wurde die TMD von Zebrafisch-Tpn in der mTpn-Umgebung um die hydrophoben Aminosäuren Met und Ala bei dem Konstrukt mTpn-Zebrafisch-Tpn-TMD-M407_z/A408_z am N-Terminus der TMD erweitert (Abb. V. 14). Diese Aminosäuren, die ebenfalls eine TM-Wahrscheinlichkeit von mehr als 0,2 haben (Abb. V. 8), wurden in dem chimären mTpn-Molekül mTpn-Zebrafisch-TMD aufgrund des sonst nicht korrekten Abstandes zwischen dem E414/D415-Motiv und K431 zunächst nicht berücksichtigt. Die hydrophoben Substitutionen im chimären Molekül mTpn-Zebrafisch-Tpn-TMD-V410_zF/A411_zL/L414_zF führten zu einer vollständigen Rekonstitution des TAP2-Expressionsniveaus (Abb. V. 15). Im Gegensatz dazu war die durch mTpn-Zebrafisch-Tpn-TMD-M407_z/A408_z stabilisierte TAP2-Expression mit 26 % sogar schwächer als die von mTpn-Zebrafisch-Tpn-TMD. Das Fehlen der konservierten Aminosäuren F420/L421/F424, aber nicht der Aminosäuren Met und Ala am N-terminalen Ende der TMD, scheinen daher der Grund für die schwächere TAP2-Stabilisierung in mTpn-Zebrafisch-TMD zu sein.

2.7 Der Einfluss von multiplen Mutationen in der TMD von mTpn auf die TAP2-Stabilisierung

Die TAP2-Expression war in Gegenwart der bisher untersuchten Einzel- und Doppel-mTpn-Mutanten nicht oder nur unvollständig reduziert (Abb. V. 10 und 13). Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass möglicherweise ein größeres Sequenzmotiv innerhalb der TMD von mTpn die TAP2-Stabilisierung bewirkt. Die Projektion der mTpn-TMD als helikales Rad mittels dem Programm HelicalWheel (<http://kael.net/helical.htm>) veranschaulicht, dass vermutlich die Aminosäuren F420, F424, G428, K431 und W435 auf der selben Seite einer membranquerenden α -Helix lokalisiert sind wenn man annimmt, dass alle Aminosäuren der vorhergesagten TMD in einer Helix vorliegen (Abb. V. 16). Diese Aminosäurereste sind, wie aus Abbildung V. 8 hervorgeht, in allen Säugetier-Tpn-Sequenzen konserviert. Bei Annahme einer idealen helikalen Anordnung der TMD-Sequenz kann vermutet werden, dass diese konservierten Aminosäurereste während der Assemblierung von Tpn und TAP2 zusammenwirken.

Weitere Western Blot-Analysen ergaben, dass die Punktmutante mTpn-G428I sich wie mTpn-W435L verhielt und die TAP2-Stabilisierung nicht reduzieren konnte (Abb. V. 10 und 17 A).

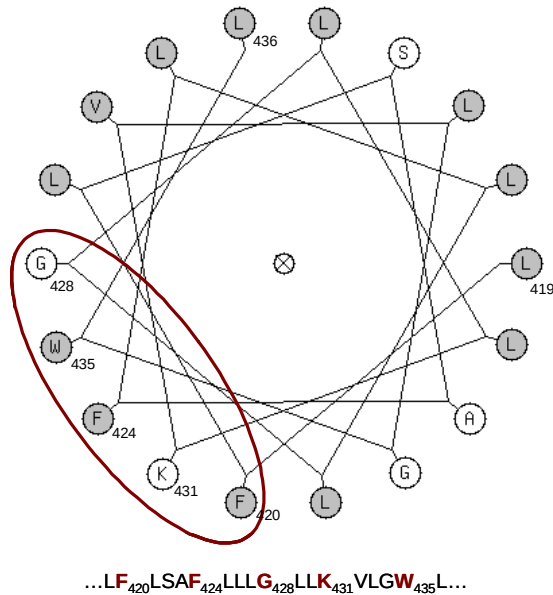


Abb. V. 16: Helikales Rad der TMD von mTpn

Die oben angegebenen Proteinsequenzen der mTpn-TMD sind als helikales Rad mit Hilfe des Programms HelicalWheel (<http://kael.net/helical.htm>) projiziert worden. 3,6 Reste pro Helixwindung (360°) bedeuten eine 100° Rotation zwischen jedem Rest, der typische Rotationswinkel für eine α -Helix. Die N-terminalen Aminosäuren IG und die C-terminalen Aminosäuren AAY der vorhergesagten TMD von mTpn (Abb. V. 8) sind nicht enthalten.

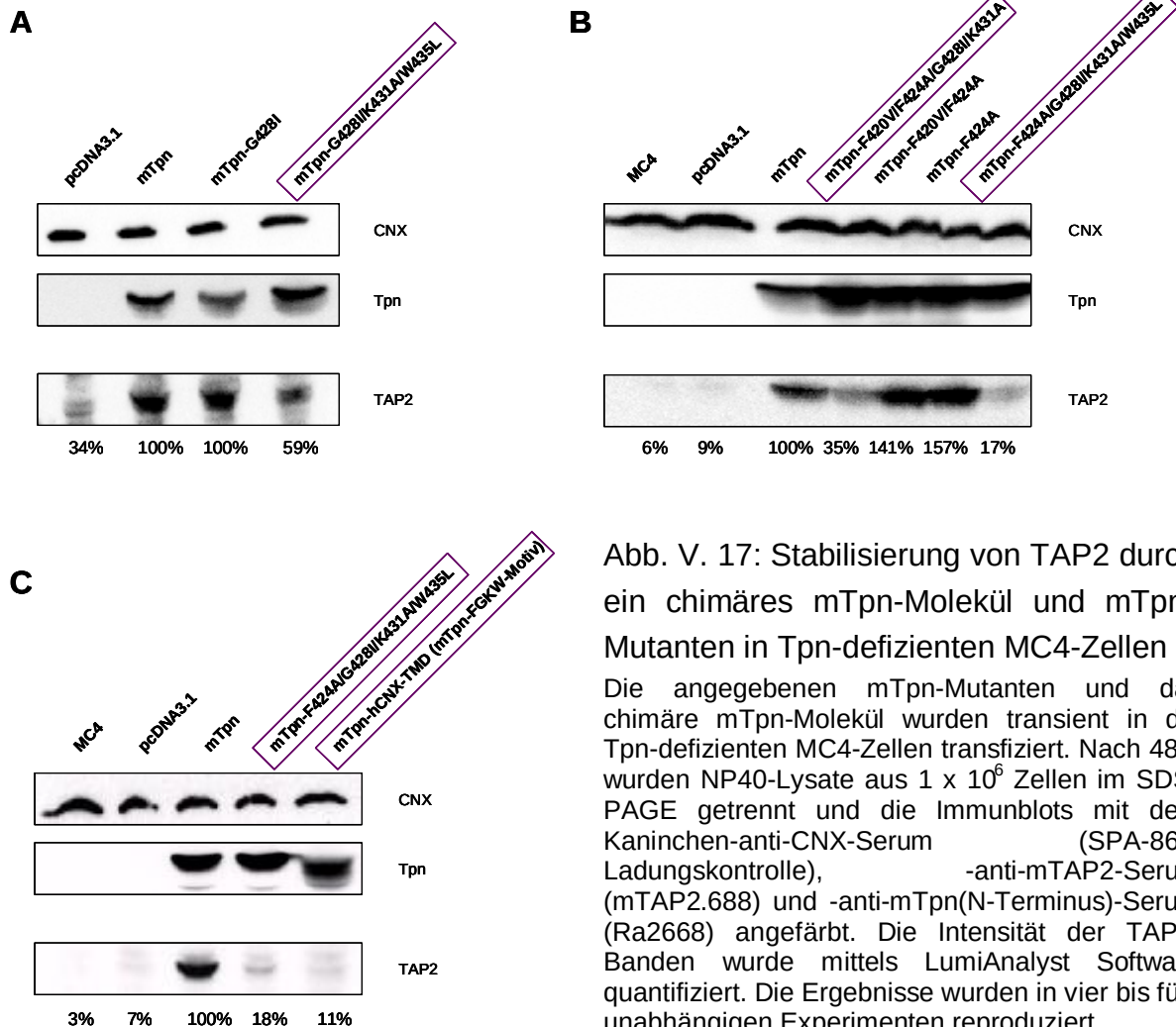


Abb. V. 17: Stabilisierung von TAP2 durch ein chimäres mTpn-Molekül und mTpn-Mutanten in Tpn-defizienten MC4-Zellen

Die angegebenen mTpn-Mutanten und das chimäre mTpn-Molekül wurden transient in die Tpn-defizienten MC4-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden NP40-Lysate aus 1×10^6 Zellen im SDS-PAGE getrennt und die Immunblots mit dem Kaninchen-anti-CN-X-Serum (SPA-860; Ladungskontrolle), -anti-mTAP2-Serum (mTAP2.688) und -anti-mTpn(N-Terminus)-Serum (Ra2668) angefärbt. Die Intensität der TAP2-Banden wurde mittels LumiAnalyst Software quantifiziert. Die Ergebnisse wurden in vier bis fünf unabhängigen Experimenten reproduziert.

Eine im Vergleich zur Tpn-Expression nicht reduzierte TAP2-Stabilisierung wurde bei mTpn-F424A und mTpn-F420V/F424A beobachtet (Abb. V. 17 B).

Diese verschiedenen Mutationen wurden nun mit K431A kombiniert. Die mTpn-TMD-Teilsequenzen sind in Abbildung V. 18 dargestellt. Die multiplen mTpn-Mutanten zeigten eine signifikante Reduktion der TAP2-Expression. Die 3-fach Mutante mTpn-G428I/K431A/W435L stabilisierte TAP2 nur zu 59 % (Abb. V. 17 A). Die TAP2-Expression wurde dagegen durch die erste 4-fach Mutante mTpn-F420V/F424A/G428I/K431A zu 35 % und durch die zweite 4-fach Mutante mTpn-F424A/G428I/K431A/W435L zu etwa 17,5 % stabilisiert (Abb. V. 17 B, C). Da die TAP2-Expression bei den 4-fach Mutanten nicht vollständig reduziert war, wird die TAP2-Stabilisierung wahrscheinlich durch ein räumliches Motiv bestehend aus den Aminosäuren F420/F424/G428/K431/W435 gemeinsam mit der sauren Aminosäure E414 vermittelt.

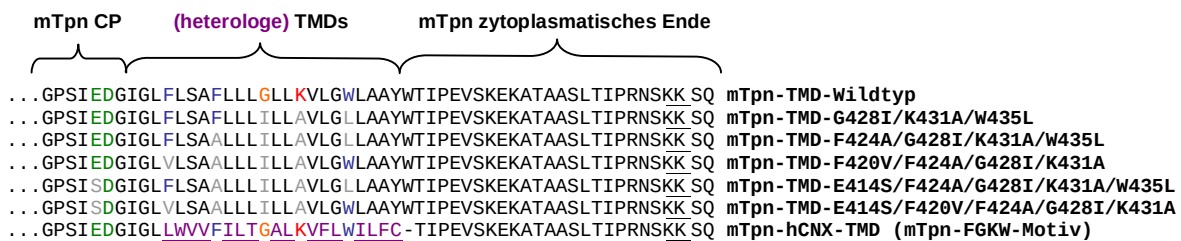


Abb. V. 18: Die Teilsequenzen der verschiedenen multiplen mTpn-Mutanten und des chimäre mTpn-Moleküls

Die konservierten Aminosäuren sind grün, blau, orange und rot dargestellt. Grau sind die ausgetauschten Aminosäuren der mTpn-TMD. Die ausgetauschten Aminosäuren der mTpn-TMD gegen die heterologe TMD von hCNX sind lila dargestellt und unterstrichen.

Um diese Vermutung zu untersuchen wurden 5-fach Mutanten mit den entsprechenden Substitutionen hergestellt (Abb. V. 18). Die Mutanten mTpn-E414S/F420V/F424A/G428I/K431A und mTpn-E414S/F424A/G428I/K431A/W435L wurden zwar genauso effizient exprimiert wie Wildtyp-mTpn, jedoch konnten diese kein TAP2 stabilisieren (Abb. V. 15). Dies deutet darauf hin, dass das räumliche Motiv (F420/F424/G428/K431/W435) die TAP2-Stabilisierung zusammen mit der Aminosäure E414 durch einen kooperativen Effekt vermittelt.

Im Gegensatz zu dem chimären Molekül mTpn-hTpn-R-TMD war die TAP2-Stabilisierung in Gegenwart von mTpn-hCNX-TMD vollständig verloren (Abb. V. 13 A). Daher wurde zur Rekonstitution der TAP2-Stabilisierungsfunktion versucht, das Motiv F---G---K---W in die TMD von hCNX einzufügen. Durch das chimäre Molekül

mTpn-Zebrafisch-Tpn-TMD-M407_z/A408_z wurde deutlich (Abb. V. 15), dass der Abstand zwischen dem sauren Motiv E414/D415 und K431 für die TAP2-Stabilisierung wichtig ist und blieb deshalb in dem Konstrukt mTpn-hCNX-TMD (mTpn-FGKW-Motiv) exakt wie in Wildtyp-mTpn erhalten (Abb. V. 18). Die mTpn-Expression von mTpn-hCNX-TMD (mTpn-FGKW-Motiv) entsprach der von Wildtyp-mTpn (Abb. V. 17 C). Allerdings war das Laufverhalten etwas schneller, was auf eine aberrante Komplexbildung mit SDS hinweisen könnte. Das chimäre mTpn-Molekül war unfähig TAP2 zu stabilisieren. Dies lässt vermuten, dass E414, F424, G428, K431 und W435 und möglicherweise auch F420 zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Tpn-vermittelte TAP2-Stabilisierung sind. Es scheint daher, dass der Sequenzzusammenhang essentielle zusätzliche Informationen für die TAP-Stabilisierung beisteuert.

2.8 MHC-Klasse-I-Induktion durch mTpn-Mutanten

Im folgenden wurde die peptidtransportabhängige Induktion von MHC-Klasse-I-Molekülen analysiert, um die funktionelle Bedeutung der TAP2-Stabilisierung durch die Tpn-Mutanten beurteilen zu können. Hierfür wurden MC4-Zellen transient mit den verschiedenen mTpn-Mutanten und EGFP, das als Transfektionskontrolle diente, kotransfiziert. Nach 48 h wurde die K^b-Oberflächenexpression in EGFP-positiven Zellen zytofluorimetrisch ermittelt. Die durch verschiedene Experimente erzielten Ergebnisse sind in Abbildung V. 19 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass Wildtyp-mTpn, die meisten mTpn-Mutanten und einige TMD-Chimären im Vergleich zur Vektorkontrolle pcDNA3.1 die K^b-Expression etwa 3- bis 4-fach erhöhen. Bei den mTpn-Chimären, welche die Sequenzen der TMD oder CP/TMD von hCNX oder hTpn-R-Protein enthalten, und den chimären mTpn-Molekülen mTpn-hCNX-TMD (mTpn-FGKW-Motiv) bzw. mTpn-Zebrafisch-Tpn-TMD-M407_z/A408_z sowie bei den TMD-Mutanten mTpn-E414S/F424A/G428I/K431A/W435L und mTpn-E414S/F420V/F424A/G428I/K431A, wurde keine signifikante K^b-Induktion beobachtet (Abb. V. 19 A, B, C, E, F). Die CP-Mutanten mTpn-E414S und mTpn-E414K/D415N und die TMD-Mutante mTpn-F424A/G428I/K431A/W435L zeigten eine deutlich reduzierte K^b-Induktion (Abb. IV. 19 A, D, E). Die K^b-Induktion war dagegen bei der Mutante mTpn-E414S/D414S und mTpn-G428I/K431A/W435L sowie bei dem chimären mTpn-Molekül mTpn-Zebrafisch-Tpn-TMD nur leicht verringert (Abb. V. 19 A, B, C). Die Mutante mTpn-F420V/F424A/G428I/K431A hatte trotz verminderter TAP2-Stabilisierung keinen negativen Einfluss auf die K^b-Induktion (Abb. V. 19 D).

Deutlich reduzierte Mengen an TAP2 in Anwesenheit der CP-Mutanten mTpn-E414S und mTpn-E414K/D415N bzw. der TMD-Mutante mTpn-F424A/G428I/K431A/W435L induzierte nachweisbar die Expression von K^b. Dagegen waren die chimären Mole-

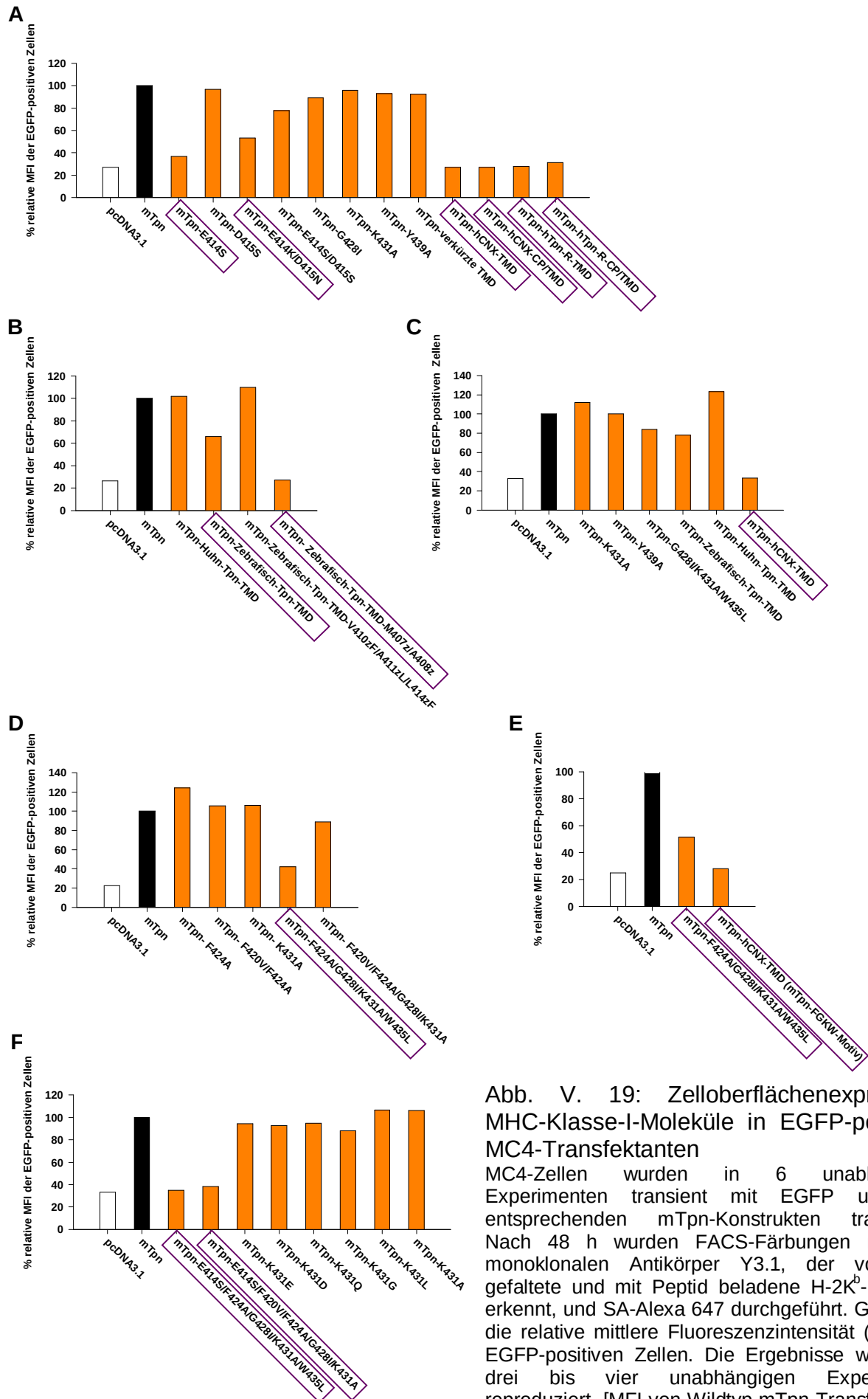


Abb. V. 19: Zelloberflächenexprimierte MHC-Klasse-I-Moleküle in EGFP-positiven MC4-Transfektanten

MC4-Zellen wurden in 6 unabhängigen Experimenten transient mit EGFP und den entsprechenden mTpn-Konstrukten transfiziert. Nach 48 h wurden FACS-Färbungen mit dem monoklonalen Antikörper Y3.1, der vollständig gefaltete und mit Peptid beladene H-2K^b-Moleküle erkennt, und SA-Alexa 647 durchgeführt. Gezeigt ist die relative mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der EGFP-positiven Zellen. Die Ergebnisse wurden in drei bis vier unabhängigen Experimenten reproduziert. [MFI von Wildtyp-mTpn-Transfektanten (schwankte zwischen 80-130)= 100%]

küle mTpn-hTpn-R-TMD, mTpn-hTpn-R-CP/TMD und mTpn-Zebrafisch-Tpn-TMD-M407_z/A408_z, die zwar ebenfalls noch geringe TAP2-Mengen stabilisierten, nicht funktionell in Bezug auf die peptidtransportabhängige Induktion der MHC-Klasse-I-Moleküle. Außerdem konnten bei Abwesenheit von stabilisiertem TAP2 die mTpn-Mutanten mTpn-E414S/F424A/G428I/K431A/W435L und mTpn-E414S/F420V/F424A/G428I/K431A sowie die Chimäre mTpn-hCNX-TMD (mTpn-FGKW-Motiv) und mTpn-hCNX-(CP)/TMD die K^b-Expression nicht erhöhen. Die Untersuchung der K^b-Induktion scheint daher wie der TAP2-Western Blot die Tpn-vermittelte Verstärkung der TAP-Expression sehr sensitiv widerzuspiegeln. Bei den verschiedenen Defektmutanten beobachteten wir leicht differierende Schwellenwerte bezüglich des Western Blot-Nachweises von mTAP2 und der Oberflächen-K^b-Expression.

2.9 Punktmutationen in der TMD von hTpn

Aus der Literatur gibt es nur für mTpn indirekte Hinweise, dass das CP für die TAP-Stabilisierung notwendig sein könnte (Boname et al., 2005). Es sollte daher in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob eine Substitution der konservierten Aminosäuren E411/D412 bzw. der einzelnen Aminosäure E411 im CP von hTpn die TAP2-Stabilisierung beeinflussen (Abb. V. 8). Von mTpn war bekannt (Abb. V. 13 B), dass E414 alleine für die TAP-Stabilisierung wichtig war, daher wurde für hTpn nur die stabile hTpn-E411S-Mutante generiert. Außerdem zeigte die Mutante mTpn-E414K/D415N einen starken Effekt auf die Reduktion der TAP2-Stabilisierung (Abb. IV. 13 B, C), daher wurde die Mutante hTpn-E411K/D412N hergestellt. Mutationen an der Position K428 und L430, sowie eine Glykosylierungsdefektmutante (N233Q) wurden ebenfalls analysiert (Abb. V. 8). Es wurden stabile LCL 721.220-hTpn-Transfektanten generiert und nach Lyse mit NP40 die TAP2-Expressionsniveaus im Western Blot mittels LumiAnalyst Software ermittelt.

Die hTpn-Expression war bei allen stabilen hTpn-Transfektanten ähnlich (Abb. V. 20). Wie in Maus war auch die TAP2-Stabilisierung in Anwesenheit von hTpn-E411K/D412N vermindert (Abb. V. 20). Die Mutante hTpn-E411S reduzierte die TAP2-Stabilisierung ebenfalls. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aminosäure Glu an Position 411 auch in hTpn für die TAP2-Stabilisierung notwendig ist. Die Mutanten hTpn-K428V und hTpn-L430F zeigten eine verminderte Stabilisierung der TAP2-Expression. Diese Ergebnisse stimmen mit den bereits bekannten Befunden aus der Literatur überein, dass die Tpn-Aminosäuren Lys408 und Leu410 (Zählung ohne Berücksichtigung des 20 Aminosäuren langen Signalpeptids) für die TAP-Stabilisierung in humanen Zellen wichtig sind (Tan et al., 2002; Peterson et al., 2005). Im Gegensatz dazu hatte die Mutation an der Glykosylierungsstelle in hTpn (N233Q) keinen Einfluss auf die TAP2-Stabilisierung.

Die Stabilisierung von hTAP2 durch hTpn scheint etwas anderen Gesetzmäßigkeiten als im Maussystem zu folgen, da beispielsweise die Punktmutation K428V einen stärker reduzierenden Einfluss auf die TAP2-Expression als die Punktmutation E411S hatte.

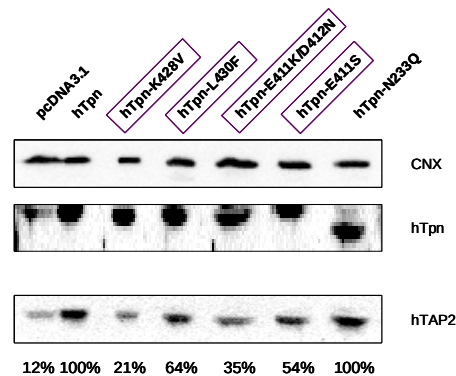


Abb. V. 20: Stabilisierung von hTAP2 durch die hTpn-Konstrukte in Tpn-defizienten .220-Zellen

$0,5 \times 10^6$ der stabilen Wildtyp-hTpn-Transfektanten und $0,2 - 1,7 \times 10^6$ der anderen oben genannten stabilen hTpn-Transfektanten wurden in Gegenwart von NP40 lysiert, um eine vergleichbare hTpn-Expression zu gewährleisten. Anschließend wurden die Lysate im SDS-PAGE getrennt und der Immunblot mit dem Kaninchen-anti-CN-X-Serum (SPA-860; Ladungskontrolle) und -anti-hTpn(C-terminal)-Serum (Rb α STC) und mit dem Maus-anti-hTAP2-Antikörper (429.4) angefärbt. Die Intensität der TAP2-Banden wurde mittels LumiAnalyst Software quantifiziert. Die Ergebnisse wurden in fünf unabhängigen Experimenten reproduziert.

VI. Diskussion

Die Peptidbeladung von MHC-Klasse-I-Molekülen im ER-Lumen wird durch das ER-residente Glykoprotein Tpn optimiert, indem es einerseits mit seiner N-terminalen Domäne und membranproximalen Ig-ähnlichen Domäne an die α_2 -Domäne bzw. α_3 -Domäne der MHC-I-Schwerkette und andererseits an TAP bindet (Momburg and Tan, 2002; Wright et al., 2004). Neben dieser Chaperonfunktion übt Tpn eine zweite aus, die unabhängig von der gleichzeitigen Bindung von MHC-Klasse-I ist (Bangia et al., 1999; Momburg and Tan, 2002; Garbi et al., 2003). Tpn erhöht die TAP-Expressionsniveaus ohne die TAP-Affinität für die Peptidsubstrate zu verändern (Lehner et al., 1998; Bangia et al., 1999; Momburg and Tan, 2002). Die Bindung von Tpn an die TAP1- und TAP2-Untereinheiten wird durch seinen C-Terminus vermittelt (Lehner et al., 1998; Bangia et al., 1999; Tan et al., 2002; Momburg and Tan, 2002). Auch ist bekannt, dass TAP1 und TAP2 unabhängig voneinander mit Tpn assoziieren können (Powis et al., 1997; Antoniou et al., 2002; Ragharuman et al., 2002). Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die N-terminalen Domänen des TAP-Heterodimers für die Tpn-Bindung essentiell sind (Koch et al., 2004; Procko et al., 2005; Leonhardt et al., 2005).

Ziel war es, die Tpn-Abhängigkeit der TAP1- und TAP2-Untereinheiten zu charakterisieren und den bisher kaum verstandenen molekularen Mechanismus der Tpn-vermittelten TAP-Stabilisierung näher zu untersuchen.

1. Die TAP2-Stabilisierung ist von TAP1 und Tpn abhängig

Um die am stärksten Tpn-abhängige Maus-TAP-Untereinheit für die spätere Charakterisierung der TAP-Stabilisierung in MC4-Zellen zu ermitteln, wurden TAP1- und TAP2-Untereinheiten voller Länge und N-terminal verkürzte TAP1- und TAP2-Untereinheiten aus Ratte und Maus, die jeweils C-terminal mit EGFP markiert waren, mit der entsprechenden komplementären TAP-Untereinheit in Tpn-defizienten MC4-Zellen oder in Tpn-kompetenten MCB6TAP1^{-/-}-Zellen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl mTAP1-EGFP als auch mTAP2-EGFP nach Kotransfektion mit der entsprechenden komplementären Wildtyp-TAP-Untereinheit in MCB6TAP1^{-/-}-Zellen exprimiert wurden und die MHC-Klasse-I-Expression induzierten und deshalb funktionell in Bezug auf die Peptidtranslokation sind (Abb. V. 3 und 4). In MCB6TAP1^{-/-}-Zellen aus der TAP1-knockout-Maus lässt sich kein TAP2-Protein nachweisen (Abb. V. 2). Daher ist unser Befund in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass in TAP-defizienten Zellen die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation nur nach Rekonstitution von beiden TAP-Untereinheiten und daher Bildung eines funktionellen, heterodimeren TAP-Komplexes wieder hergestellt werden konnte

(Powis et al., 1991; Spies and DeMars, 1991; Arnold et al., 1992; Kelly et al., 1992; Momburg et al., 1992; Spies et al., 1992). TAP1-EGFP bzw. Δ N-TAP1-EGFP aus Maus und Ratte ließen sich auch in Abwesenheit von Tpn und TAP2 exprimieren (Abb. V. 5). Tpn scheint daher von untergeordneter Bedeutung für die Stabilisierung der TAP1-Untereinheit zu sein. Im Gegensatz dazu war TAP2-EGFP vergleichsweise instabil, wenn dieses alleine exprimiert wurde, und benötigte die Koexpression von TAP1 und Tpn. Nur in Tpn-kompetenten MCB6TAP1^{-/-}-Zellen und nicht in Tpn-defizienten MC4-Zellen konnte daher eine starke Erhöhung der TAP2-EGFP-Expression bei Kotransfektion mit TAP1 (oder Δ N-TAP1) beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen, dass eine stabile TAP2-Expression auf die Anwesenheit von TAP1 angewiesen ist. Die TAP2-Expression war in Zellen, die von *Bare Lymphocytes Syndrome (BLS) type I* Patienten isoliert wurden und kein TAP1 exprimieren, nicht nachweisbar (De la Salle et al., 1999; Heintke et al., 2003). In der humanen Melanom-Zelllinie buf1280 hat das TAP1-Gen eine Deletionsmutation an Position 1489, die zu einem Frameshift und zu einem vorzeitigen Stopkodon führt (Seliger et al., 2001c). In diesen Zellen ist zwar die mRNA von TAP1 und TAP2 vorhanden, jedoch konnte auf Proteinebene weder TAP1 noch TAP2 nachgewiesen werden. Nach Wildtyp-TAP1-Gentransfer konnte in buf1280 die TAP1- und TAP2-Expression sowie der Peptidtransport wieder hergestellt werden. Ebenfalls konnte in TAP1- oder TAP2-exprimierenden Insektenzellen gezeigt werden, dass zwar die isolierte TAP1-Untereinheit aber nicht TAP2 allein exprimierbar ist (van Endert et al., 1999). Aus den hier vorliegenden und den bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnissen wird deutlich, dass TAP2 nur in Anwesenheit von TAP1 und Tpn stabil ist und einzelne TAP2-Moleküle vermutlich sofort nach Translokation aus dem ER und nachfolgender Ubiquitinierung durch das Proteasom degradiert werden (ER-assoziierte Protein-Degradation; ERAD; Keusekotten et al., 2006).

Weiterhin wurde hier gezeigt, dass eine heterodimere Steigerung der Expression von TAP1-EGFP und Δ N-TAP1-EGFP in Gegenwart von kotransfiziertem TAP2 voller Länge nur in Tpn-kompetenten MCB6TAP1^{-/-}-Zellen beobachtet werden konnte. Die Tpn-Bindung an die N-Domäne von TAP1 scheint für die TAP1-Stabilisierung nicht erforderlich zu sein, da TAP1-EGFP und das N-terminal verkürzte TAP1-EGFP-Molekül mit ähnlicher Effizienz in MCB6TAP1^{-/-} und MC4 exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu kann angenommen werden, dass die N-Domäne von TAP2 für die Tpn-Bindung und Stabilisierung des TAP1/TAP2-Heterodimers wichtig ist, da Δ N-TAP2-EGFP nur schwach in MC4- und MCB6TAP1^{-/-}-Zellen exprimiert und dessen Expression nicht durch Koexpression von TAP1 oder Δ N-TAP1 erhöht wurde. Δ N-TAP2 war auch nicht in der Lage die Expression von TAP1-EGFP oder Δ N-TAP1-EGFP zu steigern. Dies ist in Übereinstimmung mit Studien, die zeigen, dass Tpn an die N-Domäne von hTAP2 und rTAP2 bindet (Koch et al., 2004; Procko et al., 2005; Leonhardt et al., 2005). Aus den hier gezeigten Ergebnissen kann gefolgert werden,

dass die TAP2-Untereinheit für die Untersuchung der Tpn-vermittelten TAP-Stabilisierung in MC4-Zellen gut geeignet ist. Es wurde daher für die Analysen der TAP-Stabilisierung in MC4-Transfektanten im Western Blot ein anti-TAP2-Serum verwendet.

Die Deletion der N-Domäne von TAP1 und TAP2 aus Ratte und Mensch hatte in bisher veröffentlichten Studien keinen Effekt auf den Peptidtransport (Koch et al., 2004; Procko et al., 2005; Leonhardt et al., 2005). Außerdem war die 6 + 6 TM-Kerndomäne des TAP-Komplexes, die aus den TMs 5-10 von TAP1 und den TMs 4-9 von TAP2 besteht, für die korrekte Assemblierung des funktionellen heterodimeren TAP-Komplex ausreichend. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte dies für mTAP bestätigt werden, indem Wildtyp- und N-terminal verkürzte TAP1- und TAP2-Untereinheiten aus Maus transient in Tpn-kompetente MCB6TAP1^{-/-}-Zellen transfiziert und auf deren Transportfunktion hin analysiert wurden (Abb. V. 7). Die geringere Transportaktivität von mΔN-TAP1/mΔN-TAP2 im Vergleich zu den anderen Varianten kann durch die geringere mΔN-TAP2-Expression (Abb. V. 6) erklärt werden. Die 6 + 6 TM-Kerndomäne des TAP-Komplexes ist demnach spezieübergreifend für die heterodimerische Assemblierung und den Peptidtransport ausreichend.

2. Die Tpn-vermittelte TAP-Stabilisierung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine detaillierte Analyse des molekularen Mechanismus der Tpn-vermittelten TAP-Stabilisierung durchgeführt, da bisher kaum verstanden ist, wie der C-terminale Teil des Tpn-Moleküls seine TAP-Stabilisierungsfunktion ausübt. Die Interaktionsstellen für die TAP-Stabilisierung sollten biochemisch analysiert werden, da die Kristallstrukturen des vollständigen TAP-Heterodimers und Tpn fehlen. Dazu wurden in der TMD und/oder im N-terminal angrenzenden CP von mTpn oder hTpn einzelne bzw. multiple Aminosäuren ausgetauscht oder auch die gesamte TMD ersetzt. Diese Tpn-Mutanten wurden anschließend transient in MC4-Fibroblastenzellen aus der Tpn^{-/-}-Maus oder stabil in Tpn-defizienten B-lymphoblastoiden .220-Zellen exprimiert, um danach im FACS die peptidtransportabhängige MHC-Klasse-I-Induktion/TAP-Tpn-Interaktion und im Western Blot die TAP-Tpn-Interaktion zu analysieren.

2.1 Die Rolle ausgewählter Aminosäuren in der TMD bzw. im CP von Tpn bei der TAP2-Stabilisierung

Es fallen innerhalb des CP von mTpn die hochkonservierten Aminosäuren E414 und D415 auf, die auch Tpn-Moleküle von Ratte, Mensch, Huhn, Hund, Rind, Zebrafisch und Regenbogenforelle besitzen (Abb. V. 8). In der vorhergesagten TMD von mTpn

befinden sich andere hochkonservierte Aminosäuren (z. B. F420, F424, G428, K431, L433, W435), die in den Säugetiersequenzen von Ratte, Mensch, Rind und Hund vorhanden sind. In Huhn ist anstelle Lys an der Position 431 die andere positiv geladene Aminosäure Arg präsent. Der zytoplasmatische Terminus von mTpn besitzt keine signifikante Homologie (ausgenommen zu dem eng verwandten rTpn) zu Tpn aus anderen Spezies. Dieser endet allerdings bei allen Tpn-Sequenzen mit einem KKXX-ER-Retentionssignal (Frangoulis et al., 1999). mTpn kann hTpn in hTpn-defizienten Zellen funktionell ersetzen und umgekehrt (Peh et al., 2000; Tan et al., 2002). Diese Beobachtung zeigt, dass der zytoplasmatische Terminus für die TAP-Stabilisierung wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung ist und wurde hier daher in dieser Mutagenesestudie nicht näher untersucht.

Aufgrund der Sequenzvergleiche wurde der Einfluss des konservierten E414/D415-Motivs und der einzelnen konservierten Aminosäuren F420, F424, G428, K431, L433, W435 und Y439 auf die Tpn-Funktion in rekonstituierten, Tpn-defizienten MC4-Zellen untersucht. Außerdem wurden der aromatische Y439/W449-Cluster in mTpn und das konservierte KKXX-ER-Retentionssignal mutiert. Eine natürlich vorkommende mTpn-Spleißvariante mit einem zusätzlichen Val nach L436, die in Tpn-defizienten MC2-Zellen die MHC-Klasse-I-Expression wieder herstellte (Boname et al., 2005), wurde ebenfalls untersucht. In Übereinstimmung mit ersten indirekten Hinweisen durch ein CD8^{mTpn}-Hybrid, bei dem 5 CP-Aminosäuren N-terminal von der mTpn-TMD enthalten waren und das TAP stabilisierte (Boname et al., 2005), konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass das E414/D415-Motiv für die Stabilisierung der TAP2-Untereinheit wichtig ist (Abb. V. 9, 10 und 13). Die TAP2-Expression in MC4-Zellen war nach Mutation von E414 und D415 im Vergleich zu Wildtyp-mTpn sehr stark reduziert. Durch weitere Western Blot-Analysen mit den Mutanten mTpn-E414S und mTpn-D415S konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal in mTpn eine einzelne Aminosäure im CP identifiziert werden, die für die TAP2-Stabilisierung entscheidend ist, und zwar die Aminosäure Glu an Position 414 und nicht die Aminosäure Asp an Position 415 (Abb. V. 13). Es stellte sich außerdem heraus, dass der Austausch im E414/D415-Motiv von Glu an Position 414 gegen Lys einen stärkeren Effekt auf die TAP2-Reduktion hatte als ein Austausch gegen Ser (Abb. V. 13). Bei Annahme, dass Glu im CP mit positiv geladenen Aminosäuren innerhalb der N-terminalen Domänen des TAP1/TAP2-Heterodimers interagiert, stößt die basische Aminosäure Lys vermutlich, im Gegensatz zu der ungeladenen, polaren Seitenkette von Ser, diese basischen Aminosäuren stärker ab. Es wird dadurch deutlich, dass je nach ausgetauschter Aminosäure ein stärkerer oder schwächerer Effekt zu sehen ist. In den menschlichen Tpn-defizienten .220-Zellen konnte ebenfalls erstmals gezeigt werden, dass das CP und der gleiche Aminosäurerest (E411) wie in Maus eine Rolle bei der TAP-Stabilisierung spielen (Abb. V. 20). Im Gegensatz dazu beeinflusste die Glykosylierungsdefektmutante hTpn-N233Q das TAP2-Expressionsniveau in den .220-Zellen nicht. Dies ist in Übereinstimmung mit

der Beobachtung, dass eine am N-Terminus um 300 Aminosäuren verkürzte hTpn-Deletionsmutante, der ebenfalls die N-Glykosylierungsstelle fehlt, die gleiche TAP-Expression wie Wildtyp-hTpn aufwies (Bangia et al., 1999). Dies verdeutlicht, dass für die TAP-Stabilisierung die Glykosylierungsstelle in der Ektodomäne keine Rolle spielt.

Im Gegensatz zu E414 konnte kein Einfluss auf die TAP2-Stabilisierung durch die oben erwähnten anderen Einzel- und Doppel-mTpn-Mutanten in MC4 beobachtet werden (Abb. V. 9, 10, 13 und 17). Die TAP2-Expression konnte nicht signifikant durch die mTpn-K463A/K464A-Mutante, bei der das ER-Retensionsmotiv zerstört war, reduziert werden (Abb. V. 9 und 10). Diese Mutante ist vermutlich nach wie vor im ER lokalisiert. Dies deckt sich mit früheren Studien, die besagen, dass die ER-Retention von hTpn nicht allein durch das KKXX-Retentionsmotiv, sondern auch durch die TMD kontrolliert wird (Tan et al., 2002). Die mTpn-Spleißvariante V436a verhielt sich in Tpn-defizienten Maus-Zellen nicht nur in Bezug auf die MHC-Klasse-I-Expression (Boname et al., 2005), sondern auch bezüglich der TAP-Stabilisierung wie Wildtyp-mTpn (Abb. V. 9 und 10). Es bleibt offen, ob die natürlich vorkommende Speißvariante eine biologische Rolle spielt, die durch die verwendeten experimentellen Ansätze nicht erfasst wurden. Die Substitution des aromatischen Clusters Y439 und W440 gegen Ala/Leu im C-terminalen Teil der mTpn-TMD hatte ebenfalls keinen negativen Effekt auf die TAP2-Stabilisierung, jedoch wurde bei dieser Mutante ein reproduzierbares langsames Laufverhalten im SDS-PAGE beobachtet (Abb. V. 9 und 10). Dagegen zeigte die Punktmutante mTpn-Y439A ein normales Laufverhalten (Abb. V. 11 und 13). Die intrazelluläre Lokalisation dieser Mutanten wurde durch Verdau mit Endo H ermittelt (Abb. V. 11). Die mTpn-Mutanten Y439A und Y439A/W440L waren reproduzierbar Endo H sensitiv (ER-Lokalisation) und hatten nach Endo H-Verdau das gleiche Molekulargewicht. Die Sequenzierung der cDNA für mTpn-Y439A/W440L erbrachte keine Hinweise auf eine neue Glykosylierungsstelle. Diese Daten deuten daher darauf hin, dass mTpn-Y439A/W440L an der regulären Glykosylierungsstelle N233 überglykosyliert wurde. Frühere Mutationsstudien zeigten, dass Substitutionen der konservierten Aminosäure Leu an Position 410 gegen Phe und Lys an Position 408 gegen Ala oder Trp in der TMD von hTpn zu einem verminderten TAP-Expressionsniveau führten (Tan et al., 2002; Petersen et al., 2005). Bei diesen Punktmutanten beginnt die Aminosäurenzählung erst nach dem 20 Aminosäuren langen Signalpeptid von hTpn. In Analogie mit diesen Befunden war die TAP-Expression in Gegenwart der hTpn-K428V- und hTpn-L430F-Mutanten in den menschlichen Tpn-defizienten .220-Zellen reduziert (Abb. V. 20). Eine entsprechende Lys zu Ala Mutation (K408A) in der mTpn-TMD führte laut Petersen und Kollegen (2005) ebenfalls zu einer verminderten TAP-Stabilisierung. Die TAP-Expression von Wildtyp-mTpn war aber sehr gering und die reduzierte TAP-Stabilisierung in Anwesenheit der Mutante mTpn-K408A daher schwer zu erkennen. Die geringere TAP-Expression war deshalb im Vergleich zu

Wildtyp-mTpn bei der mTpn-K408A-Mutante nicht überzeugend. Eine detaillierte Analyse des Lys-Restes in den hier durchgeführten Experimenten zeigte, dass eine Substitution von K431 (Aminosäurezählung berücksichtigt das 23 Aminosäuren lange Signalpeptid von mTpn) gegen hydrophobe Aminosäuren oder Glycin (K431L, K431A, K431G) die Interaktion mit TAP und daher die TAP-Stabilisierung nicht reduziert (Abb. IV. 9 und 13). Auch bei den mTpn-Mutanten K431E und K431D, die an der Position 431 statt Lys eine saure Aminosäure haben, konnte keine verminderte TAP2-Stabilisierung im Vergleich zu Wildtyp-mTpn beobachtet werden. Die Mutante mTpn-K431Q, die statt einer geladenen Seitenkette eine große, polare Seitenkette besitzt, reduzierte ebenfalls das TAP2-Expressionsniveau nicht. Auch die konservierte Aminosäure L433 in der TMD von Tpn scheint nur in hTpn (Abb. V. 20; Tan et al., 2002) und nicht in mTpn eine Rolle für die TAP-Stabilisierung zu spielen, da das TAP2-Expressionsniveau in Anwesenheit von mTpn-L433F mit Wildtyp-mTpn vergleichbar war (Abb. V. 9 und 10). Trotz hoher Homologie zwischen mTpn und hTpn (74 % Identität) scheint der unterschiedliche Sequenzzusammenhang in der TMD möglicherweise zusätzliche jeweils andere Informationen zu liefern, der die TAP-Stabilisierung durch die Aminosäuren Leu und Lys in der TMD von mTpn und hTpn verschieden beeinflusst. Desweiteren kann die Stabilisierung von hTAP durch hTpn etwas andere Bedingungen haben als die Stabilisierung von mTAP durch mTpn.

2.2 Das saure Motiv im CP von Tpn ist nicht ausreichend für die TAP2-Stabilisierung

Um die Frage zu klären, ob das saure Motiv E414/D415 allein für die TAP2-Stabilisierung ausreichend ist, wurden mTpn-Hybride hergestellt, bei denen entweder nur die TMD oder das CP und die TMD von mTpn gegen diejenigen von hCNX oder hTpn-R-Protein ausgetauscht wurden (Abb. V. 12). Die Expression der Tpn-Hybride mTpn-hCNX-TMD und mTpn-hCNX-CP/TMD führte zu einem vollständigen Verlust der TAP2-Stabilisierung (Abb. V. 13). Bei den Hybriden mTpn-hTpn-R-TMD und mTpn-hTpn-R-CP/TMD wurde nur eine sehr geringe TAP2-Stabilisierung beobachtet (Abb. V. 13). Die Befunde zeigen, dass E414/D415 die TMDs von hCNX und hTpn-R-Protein nicht dazu befähigen kann, die TAP2-Expression zu erhöhen. Das saure Motiv im CP benötigt daher die TMD von Tpn, um TAP2 zu stabilisieren. Die geringe TAP2-Stabilisierung durch mTpn-hTpn-R-TMD und mTpn-hTpn-R-CP/TMD kann dadurch erklärt werden, dass im Gegensatz zu dem nichtverwandten hCNX eine Sequenzidentität von ungefähr 25 % zwischen Tpn und hTpn-R-Protein innerhalb der TMD besteht. Außerdem verdeutlichen die Ergebnisse zusammen mit den Befunden mit den löslichen hTpn-Varianten $\Delta C35$ und $\Delta C33$, in denen das E-D-Motiv im CP

erhalten war (Lehner et al., 1998; Tan et al., 2002), dass die TMD-Sequenz von Tpn für die TAP-Stabilisierung essentiell ist.

Sequenzinformationen im N-terminalen Bereich der TMD von mTpn scheinen zur TAP2-Stabilisierung beizutragen. Die heterologen TMDs der phylogenetisch von mTpn weit entfernten Huhn- und Zebrafisch-Tpn-Moleküle wurden für Analysen zwischen dem CP und der zytoplasmatischen Domäne von mTpn eingefügt (Abb. V. 14). Nur das chimäre Molekül mTpn-Huhn-Tpn-TMD konnte TAP2 wie Wildtyp-Tpn stabilisieren (Abb. V. 13 und 15). Im Vergleich zu Zebrafisch-Tpn hat Huhn-Tpn im TMD-Bereich, der N-terminal von der konservierten basischen Aminosäure liegt, eine größere Homologie mit mTpn (Abb. V. 8). Dieser Befund spricht für Sequenzinformationen im N-terminalen Teil der TMD von Tpn, die für die TAP2-Stabilisierung essentiell sein könnten. Dafür spricht auch, dass eine am C-terminalen Teil der TMD um 8 Aminosäuren verkürzte mTpn-Mutante trotz schwacher Tpn-Expression, die wahrscheinlich mit ineffizienter Membranintegration dieser sehr kurzen TM zusammenhängt, eine TAP2-Stabilisierung von etwa 70 % aufwies (Abb. V. 13). Es stellte sich durch Analyse der Revertante mTpn-Zebrafisch-Tpn-TMD-V410_zF/A411_zL/L414_zF heraus, dass die sonst im N-terminalen Bereich der Zebrafisch-Tpn-TMD fehlenden hydrophoben Aminosäuren F420/L421 und F424 der wahrscheinliche Grund für die reduzierte TAP2-Stabilisierung des mTpn-Zebrafisch-Tpn-TMD war (Abb. V. 15). Um den Abstand zwischen E414/D415 und K431 zu erhalten wurden die hydrophoben Aminosäuren M407 und A408 in dem Konstrukt mTpn-Zebrafisch-Tpn-TMD zunächst nicht eingefügt. Das nachträgliche Einfügen verlängerte die potentielle TM und verringerte die Fähigkeit der Zebrafisch-Tpn-TMD mTAP2 zu stabilisieren (Abb. V. 15). Dieser Befund weist darauf hin, dass nicht nur die Hydrophobizität, sondern auch die Länge des N-terminalen TMD-Bereichs für die TAP2-Stabilisierung wichtig ist.

2.3 Ein räumliches Motiv in der TMD von Tpn ist zusammen mit der Aminosäure E414 im CP an der TAP2-Stabilisierung beteiligt

Die TAP-Expression war bei den hier untersuchten Einzel- und Doppel-Tpn-Mutanten und bei den in der Literatur beschriebenen Tpn-Punktmutanten (Tan et al., 2002; Petersen et al., 2005) entweder nicht oder nur partiell reduziert. Dies spricht dafür, dass die TAP-Stabilisierungsfunktion von Tpn nicht durch einzelne Aminosäuren, sondern durch ein Bindungsmotiv aus mehreren, kooperativ wirkenden Aminosäuren vermittelt wird. Die helikale Projektion der TMD von mTpn zeigt, dass vermutlich die in allen Säugetier-Tpn-Sequenzen konservierten Aminosäuren F420, F424, G428, K431 und W435 auf der gleichen Seite der membranquerenden α -Helix lokalisiert sind (Abb. V. 16). Eine Analyse der TAP2-Expressionsniveaus ergab, dass die

TAP2-Stabilisierung durch die 3-fach Mutante mTpn-G428I/K431A/W435L und die 4-fach Mutanten mTpn-F420V/F424A/G428I/K431A bzw. mTpn-F424A/G428I/K431A/W435L zwar stark bis sehr stark reduziert war, aber nicht vollständig (Abb. V. 17). Ebenso war die TAP2-Expression in Gegenwart von mTpn-E414S noch geringgradig vorhanden (Abb. V. 13). Erst in Anwesenheit der 5-fach Mutanten mTpn-E414S/F420V/F424A/G428I/K431A und mTpn-E414S/F424A/G428I/K431A/W435L konnte zum ersten Mal eine vollständige Reduktion der TAP2-Stabilisierung beobachtet werden (Abb. V. 15). Diese Ergebnisse deuten an, dass das räumliche Motiv F420/F424/G428/K431/W435 zusammen mit der Aminosäure E414 im CP die TAP-Stabilisierung vermittelt und zwar durch einen kooperativen Effekt. Die im räumlichen Motiv lokalisierten Aminosäuren befinden sich mit Ausnahme von W435 im N-terminalen Teil der TMD von mTpn der die wesentlichen Sequenzinformationen für die TAP2-Stabilisierung besitzt (siehe Diskussion 2.2), für den im Gegensatz zum C-terminalen Teil eine hohe α -Helix-Wahrscheinlichkeit vorhergesagt wird und der in seiner Länge und Sequenzhomologie konserviert ist (Abb. V. 8). Studien mit N-terminal verkürztem TAP-Heterodimer aus Mensch und Ratte zeigten, dass Tpn innerhalb der hydrophoben N-Domäne von TAP1 und TAP2 bindet (Koch et al., 2004; Procko et al., 2005; Leonhardt et al., 2005). Der saure Aminosäurerest im CP könnte über eine Ionenbindung mit einer positiv geladenen Aminosäure (Lys/Arg) in einer ER-exponierten Schleife innerhalb der N-Domänen des TAP1/TAP2-Heterodimers interagieren. Die konservierten Aminosäuren F420, F424, G428, K431 und W435 der TMD von Tpn könnten mit einer oder mehreren TM innerhalb der N-Domänen des TAP-Heterodimers interagieren. In Ermangelung einer Kristallstruktur der TMD von Tpn bzw. eines realistischen computergestützten Modellings muss an dieser Stelle offen bleiben, ob entweder die membranquerende Helix von Tpn mit dem konservierten basischen Rest endet und das C-terminale Ende abknickt und parallel zur Membran arrangiert ist, oder ob alternativ das konservierte Lys/Arg in der membranquerenden Helix verborgen ist.

Es wurde gezeigt, dass ein TAP-Heterodimer vier Tpn-Moleküle bindet und das Verhältnis von Tpn und MHC-Klasse-I 1:1 ist (Ortmann et al., 1997; Bangia und Cresswell, 2005). Allerdings ist bisher unklar, wie vier Tpn-MHC-Klasse-I-Subkomplexe durch die beiden TAP-Untereinheiten organisiert sind. Hinzu kommt, dass Tpn unabhängig voneinander an TAP1 bzw. TAP2 binden kann (Powis et al., 1997; Antoniou et al., 2002; Ragharuman et al., 2002). Die Assemblierung des TAP-Heterodimers ist von einer Tpn-Verlagerung von der Kerndomäne zur N-Domäne in TAP1 begleitet (Leonhardt et al., 2005). Im Gegensatz dazu interagiert TAP2 mit Tpn ausschließlich über die N-Domäne. Es wird aufgrund von strukturellen Daten der ABC-Transporter P-Glykoprotein und MsbA (Loo und Clarke, 2000; Chang, 2003) spekuliert, dass die N-terminalen Domänen von TAP1 und TAP2 im Heterodimer gegenüberliegen, wenn die Kerndomänen gepaart sind (Abb. VI. 1 A). Dadurch

bilden sich wahrscheinlich zwei separate Plattformen für die Assemblierung mit Tpn und demzufolge mit dem Peptidbeladungskomplex. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass Tpn Dimere, Trimere oder Tetramere bildet (Bangia und Cresswell, 2005). Diese Daten und die Daten aus der vorliegenden Arbeit zeigen die Möglichkeit auf, dass Tpn mittels des TMD-Bindungsmotivs und der sauren Aminosäure E414 mit vier unabhängigen Bindungsstellen innerhalb der N-Domänen des TAP-Heterodimers assoziiert. Aufgrund einer möglichen anderen Konformation der einzelnen TAP-Monomere im Vergleich zu einem TAP-Heterodimer könnte Tpn mit Hilfe des TMD-Motivs und der Aminosäure E414 mit vier unabhängigen Bindungsstellen innerhalb der N-Domäne der isolierten TAP2-Untereinheit sowie innerhalb der Kerndomäne von isoliertem TAP1 assoziieren.

Die Rekonstitution der TAP2-Stabilisierungsfunktion wurde mit Hilfe des chimären Tpn-Moleküls mTpn-hCNX-TMD (mTpn-FGKW-Motiv), bei dem das Motiv F---G--K---W in die TMD von hCNX eingefügt wurde und der Abstand zwischen dem sauren Motiv E414/D415 und K431 wie in Wildtyp-mTpn erhalten blieb, untersucht. Das chimäre mTpn-Molekül, das diese Hybrid-TMD-Sequenz enthält, konnte TAP2 nicht stabilisieren (Abb. V. 17). Die Aminosäuren E414, F424, G428, K431, W435 und (vermutlich auch F420) scheinen daher zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Tpn-Funktion zu sein. Benachbarte Aminosäuren der oben genannten Aminosäuren innerhalb der TMD liefern anscheinend zusätzliche essentielle strukturelle Informationen für die TAP-Stabilisierung.

2.4 Induktion der MHC-Klasse-I-Expression durch mTpn-Mutanten

Die Induktion der peptidtransportabhängigen MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression durch die verschiedenen mTpn-Mutanten wurde zytofluorimetrisch ermittelt. Aufgrund hoher TAP2-Expressionsniveaus wurde die K^b-Oberflächenexpression in Anwesenheit von Wildtyp-mTpn, einigen Tpn-Chimären und den meisten mutierten mTpn-Molekülen etwa 3- bis 4-fach im Vergleich zur Vektorkontrolle pcDNA3.1 induziert (Abb. V. 19). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass deutlich reduzierte TAP2-Mengen in Gegenwart der CP-Mutanten mTpn-E414S und mTpn-E414K/D415N bzw. der mTpn-TMD-Mutante mTpn-F424A/G428I/K431A/W435L, ausreichen, um die Expression von K^b zu induzieren. Auch die TMD-Mutanten von hTpn an den Positionen K408A, K408W und L410F erhöhten die MHC-Klasse-I-Expression trotz verminderter TAP-Expressionsniveaus (Tan et al., 2002; Petersen et al., 2005). In dieser Arbeit konnte allerdings die K^b-Expression nach Transfektion der Tpn-Chimäre mTpn-hTpn-R-TMD, mTpn-hTpn-R-CP/TMD und mTpn-Zebrafisch-Tpn-TMD-M407_z/A408_z nicht signifikant induziert werden, obwohl geringe TAP2-Mengen vorhanden waren (Abb. V. 19). Speziell diese chimären Tpn-Moleküle

könnten bewirken, dass die MHC-Klasse-I/Tpn-Bindung durch eine indirekte Konformationsänderung in der heterologen TMD negativ beeinflusst wird und dadurch eine MHC-Klasse-I-Peptidbeladung erschwert wird. TAP2 und daher der funktionelle TAP1/TAP2-Transporter fehlten in den Transfektanten mit mTpn-E414S/F424A/G428I/K431A/W435L, mTpn-E414S/F420V/F424A/G428I/K431A, mTpn-hCNX-TMD (mTpn-FGKW-Motiv) und mTpn-hCNX-(CP)/TMD (Abb. V. 17). Konsequenterweise waren diese Mutanten nicht mehr funktionell in Bezug auf die Peptidtransportabhängige K^b -Induktion (Abb. V. 19). Diese Ergebnisse verdeutlichen jedoch zusammenfassend, dass die Untersuchung der K^b -Induktion genauso aussagekräftig in Bezug auf die Tpn-vermittelte TAP-Stabilisierung ist wie der TAP2-Western Blot.

Die Daten dieser Arbeit zeigen insgesamt zum ersten Mal, dass mTpn das mTAP2-Protein mit Hilfe der konservierten Aminosäuren F420, F424, G428, K431 und W435, die ein räumliches Motiv innerhalb der TMD bilden, und der sauren Aminosäure E414 im CP stabilisiert (Abb. VI. 1). Für die mTpn-vermittelte Stabilisierung von mTAP2 ist die N-Domäne essentiell, während mTAP1 (mit oder ohne N-Domäne) vergleichsweise stabil auch ohne mTpn ist.

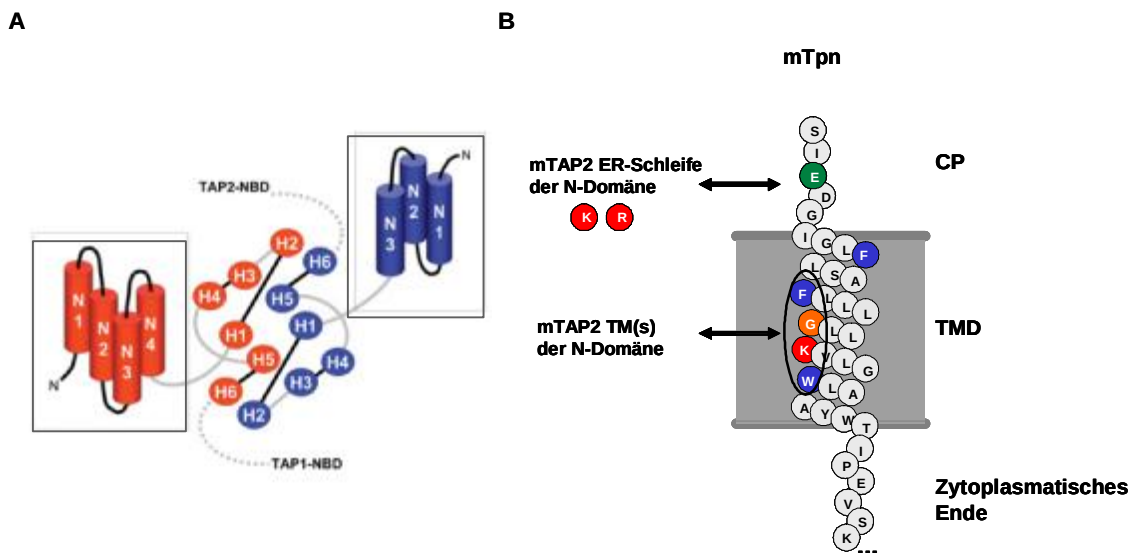


Abb. VI. 1: TAP-Tpn-Interaktion

A) Die hypothetische Überlagerung der TMD von TAP und MsbA (Chang, 2003). Die Kerndomäne des TAP-Komplexes (H1-6) enthält die Substratbindungsstelle und bildet die Translokationspore. Die N-Domänen (N1-4 und N1-3), die vermutlich gegenüberliegen, wenn die Kerndomänen gepaart sind, bilden separate Plattformen für die Assemblierung mit Tpn. B) Entsprechend dieser Arbeit sind die konservierten Aminosäuren F420, F424, G428, K431 und W435 in der TMD von mTpn und die Aminosäure E414 im CP von mTpn essentiell für die Interaktion mit mTAP2. Die mTpn-Bindung scheint nur für die mTAP2-Stabilisierung notwendig zu sein, jedoch nicht für die mTAP1-Stabilisierung.

VII. Literaturverzeichnis

- Abele, R., and Tampé, R (1999). Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim Biophys Acta* 1461, 405-19.
- Ackerman, A. L., and Cresswell, P. (2005). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* 5, 678-84.
- Aldrich, C. J., Ljunggren, H. G., Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P. G., Tonegawa, S., and Forman, J. (1994). Positive selection of self- and alloreactive CD8⁺ T cells in Tap-1 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6525-8.
- Androlewicz, M. J., and Cresswell, P. (1994). Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity* 1, 7-14.
- Antonny, B., and Schekman, R. (2001). ER export: public transportation by the COPII coach. *Curr Opin Cell Biol* 13, 438-43.
- Antoniou, A. N., Ford, S., Pilley, E. S., Blake, N., and Powis SJ. (2002). Interactions formed by individually expressed TAP1 and TAP2 polypeptide subunits. *Immunology* 106, 182-9.
- Armandola, E. A., Momburg, F., Nijenhuis, M., Bulbuc, N., Fruh, K., Hämmerling, G. J. (1996). A point mutation in the human transporter associated with antigen processing (TAP2) alters the peptide transport specificity. *Eur J Immunol* 26, 1748-55.
- Arnold, D., Driscoll, J., Androlewicz, M., Hughes, E., Cresswell, P., and Spies, T. (1992). Proteasome subunits encoded in the MHC are not generally required for the processing of peptides bound by MHC class I molecules. *Nature* 360, 171-4.
- Balow, J. P., Weissman, J. D., and Kearse, K. P. (1995). Unique expression of major histocompatibility complex class I proteins in the absence of glucose trimming and calnexin association. *J Biol Chem* 270, 29025-9.
- Bangia, N., Lehner, P. J., Hughes, E. A., Surman, M., and Cresswell P. (1999). The N-terminal region of tapasin is required to stabilize the MHC class I loading complex. *Eur J Immunol* 29, 1858-70.
- Bangia, N., and Cresswell, P. (2005). Stoichiometric tapasin interactions in the catalysis of major histocompatibility complex class I molecule assembly. *Immunology* 114, 346-53.
- Barnden, M. J., Purcell, A. W., Gorman, J. J., and McCluskey, J. (2000). Tapasin-mediated retention and optimization of peptide ligands during the assembly of class I molecules. *J Immunol* 165, 322-30.
- Beismann-Driemeyer, S., and Tampé, R. (2004). Function of the antigen transport complex TAP in cellular immunity. *Angew Chem Int Ed Engl* 43, 4014-31.

- Beissbarth, T., Sun, J., Kavathas, P. B., and Ortmann, B. (2000). Increased efficiency of folding and peptide loading of mutant MHC class I molecules. *Eur J Immunol* 30, 1203-13.
- Beninga, J., Rock, K. L., and Goldberg, A. L. (1998). Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem* 273, 18734-42.
- Bergeron, J. J., Brenner, M. B., Thomas, D. Y., and Williams, D. B. (1994). Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 19,124-8.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D.C. (1987a). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-12.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. (1987b). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329, 512-8.
- Boname, J. M., May, J. S., and Stevenson, P. G. (2005). The murine gamma-herpesvirus-68 MK3 protein causes TAP degradation independent of MHC class I heavy chain degradation. *Eur J Immunol* 35, 171-9.
- Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D., and Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* 1, 221-6.
- Brocke, P., Garbi, N., Momburg, F., and Hämmerling, G.J. (2002). HLA-DM, HLA-DO and tapasin: functional similarities and differences. *Curr Opin Immunol* 14, 22-9
- Carreno, B. M., Solheim, J. C., Harris, M., Stroynowski, I., Connolly, J. M., and Hansen, T. H. (1995). TAP associates with a unique class I conformation, whereas calnexin associates with multiple class I forms in mouse and man. *J Immunol* 155, 4726-33.
- Chang, G. (2003). Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J Mol Biol* 330, 419-30.
- Chang, S. C., Momburg, F., Bhutani, N., and 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 U S A* 102, 17107-12.
- Chen, M., Abele, R., and Tampé, R. (2003). Peptides induce ATP hydrolysis at both subunits of the transporter associated with antigen processing. *J Biol Chem* 278, 29686-92.
- Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., and Strober, W. (1994). Current protocols in immunology. Volume 1-5. John Wiley & Sons, Inc. (USA).
- Collins, F. S. (1992). Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256, 774-9.

- Copeman, J., Bangia, N., Cross, J. C., and Cresswell, P. (1998). Elucidation of the genetic basis of the antigen presentation defects in the mutant cell line .220 reveals polymorphism and alternative splicing of the tapasin gene. *Eur J Immunol* 28, 3783-91.
- Corbett, E. F., Oikawa, K., Francois, P., Tessier, D. C., Kay, C., Bergeron, J. J., Thomas, D. Y., Krause, K. H., and Michalak, M. (1999). Ca²⁺ regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *J Biol Chem* 274, 6203-11.
- Cosson, P., Lankford, S. P., Bonifacino, J. S., and Klausner, R. D. (1991). Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs. *Nature* 351, 414-6.
- Cotten, J. F., Ostedgaard, L. S., Carson, M. R., and Welsh, M. J. (1996). Effect of cystic fibrosis-associated mutations in the fourth intracellular loop of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 271, 21279-84.
- De la Salle, H., Zimmer, J., Fricker, D., Angenieux, C., Cazenave, J. P., Okubo, M., Maeda, H., Plebani, A., Tongio, M. M., Dormoy, A., and Hanau, D. (1999). HLA class I deficiencies due to mutations in subunit 1 of the peptide transporter TAP1. *J Clin Invest* 103, R9-R13.
- Dick, T. P., Bangia, N., Peaper, D. R., and Cresswell P. (2002). Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Immunity* 16, 87-98.
- Diedrich, G., Bangia, N., Pan, M., and Cresswell, P. (2001). A role for calnexin in the assembly of the MHC class I loading complex in the endoplasmic reticulum. *J Immunol* 166, 1703-9.
- Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K., and Rechsteiner, M. (1992). Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 267, 22369-77.
- Duden, R. (2003). ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review). *Mol Membr Biol* 20, 197-207.
- Ellgaard, L., Riek, R., Herrmann, T., Guntert, P., Braun, D., Helenius, A., and Wuthrich, K. (2001). NMR structure of the calreticulin P-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3133-8.
- Elliott, T., Smith, M., Driscoll, P., and McMichael, A. (1993). Peptide selection by class I molecules of the major histocompatibility complex. *Curr Biol* 3, 854-66.
- Elliott, T. (1997). How does TAP associate with MHC class I molecules? *Immunol Today* 18, 375-9.
- Farmery, M. R., Allen, S., Allen, A. J., and Bulleid, N. J. (2000). The role of ERp57 in disulfide bond formation during the assembly of major histocompatibility complex class I in a synchronized semipermeabilized cell translation system. *J Biol Chem* 275, 14933-8.

- Felmlee, T., Pellett, S., Lee, E. Y., and Welch, R. A. (1985). Escherichia coli hemolysin is released extracellularly without cleavage of a signal peptide. *J Bacteriol* 163, 88-93.
- Frangoulis, B., Park, I., Guillemot, F., Severac, V., Auffray, C., and Zoorob, R. (1999). Identification of the Tapasin gene in the chicken major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 49, 328-37.
- Frickel, E. M., Riek, R., Jelesarov, I., Helenius, A., Wuthrich, K., and Ellgaard, L. (2002). TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1954-9.
- Gao, B., Adhikari, R., Howarth, M., Nakamura, K., Gold, M. C., Hill, A. B., Knee, R., Michalak, M., and Elliott, T. (2002). Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity* 16, 99-109.
- Garbi, N., Tan, P., Diehl, A. D., Chambers, B. J., Ljunggren, H. G., Momburg, F., and Hämmerling, G. J. (2000). Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nat Immunol* 1, 234-8.
- Garbi, N., Tiwari, N., Momburg, F., and Hämmerling, G. J. (2003). A major role for tapasin as a stabilizer of the TAP peptide transporter and consequences for MHC class I expression. *Eur J Immunol* 33, 264-73.
- Garbi, N., Tanaka, S., van den Broek, M., Momburg, F., and Hämmerling, G. J. (2005). Accessory molecules in the assembly of major histocompatibility complex class I/peptide complexes: how essential are they for CD8(+) T-cell immune responses? *Immunol Rev* 207, 77-88.
- Garbi, N., Tanaka, S., Momburg, F., and Hämmerling, G. J. (2006). Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57. *Nat Immunol* 7, 93-102.
- Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E., and Wiley, D. C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384, 134-41.
- Gaudet, R., and Wiley, D. C. (2001). Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J* 20, 4964-72.
- Gething, M. J., and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
- Gil-Torregrosa, B. C., Castano, A. R., Lopez, D., and Del Val, M. (2000). Generation of MHC class I peptide antigens by protein processing in the secretory route by furin. *Traffic* 1, 641-51.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A., and Finley, D. (1998). A subcomplex of the proteasome

- regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615-23.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., and Osborne, B. A. (2000). *Kuby immunology*. Fourth Edition.
- Gorbulev, S., Abele, R., and Tampé, R. (2001). Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3732-7.
- Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62, 385-427.
- Grande III, A. G., Androlewicz, M. J., Athwal, R. S., Geraghty, D. E., and Spies, T. (1995). Dependence of peptide binding by MHC class I molecules on their interaction with TAP. *Science* 270, 105-8.
- Grande III, A. G., Comber, P. G., Wenderfer, S. E., Schoenhals, G., Fruh, K., Monaco, J. J., and Spies, T. (1998). Sequence, linkage to H2-K, and function of mouse tapasin in MHC class I assembly. *Immunogenetics* 48, 260-5.
- Grande III, A. G., Golovina, T. N., Hamilton, S. E., Sriram, V., Spies, T., Brutkiewicz, R. R., Harty, J. T., Eisenlohr, L. C., and Van Kaer, L. (2000). Impaired assembly yet normal trafficking of MHC class I molecules in Tapasin mutant mice. *Immunity* 13, 213-22.
- Greenwood, R., Shimizu, Y., Sekhon, G. S., and DeMars, R. (1994). Novel allele-specific, post-translational reduction in HLA class I surface expression in a mutant human B cell line. *J Immunol* 153, 5525-36.
- Griffin, T. A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H. J., Kaer, L. V., Monaco, J. J., and Colbert, R. A. (1998). Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J Exp Med* 187, 97-104.
- Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T. P., Schild, H., Rammensee, H. G., Koszinowski, U. H., and Kloetzel, P. M. (1996). A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* 381, 166-8.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H., and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7, 1062-7.
- Gromme, M., van der Valk, R., Sliedregt, K., Vernie, L., Liskamp, R., Hämmerling, G., Koopmann, J. O., Momburg, F., and Neefjes, J. (1997). The rational design of TAP inhibitors using peptide substrate modifications and peptidomimetics. *Eur J Immunol* 27, 898-904.
- Hanson, I. M., and Trowsdale, J. (1991). Colinearity of novel genes in the class II regions of the MHC in mouse and human. *Immunogenetics* 34, 5-11.
- Harris, M. R., Lybarger, L., Yu, Y. Y., Myers, N. B., and Hansen, T. H. (2001). Association of ERp57 with mouse MHC class I molecules is tapasin

- dependent and mimics that of calreticulin and not calnexin. *J Immunol* 166, 6686-92.
- Hebert, D. N., Foellmer, B., and Helenius, A. (1996). Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. *EMBO J* 15, 2961-8.
- Hebert, D. N., Garman, S. C., Molinari, M. (2005). The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends Cell Biol* 15, 364-70.
- Heemels, M. T., Schumacher, T. N., Wonigeit, K., and Ploegh, H. L. (1993). Peptide translocation by variants of the transporter associated with antigen processing. *Science* 262, 2059-63.
- Heemels, M. T., and Ploegh, H. L. (1994). Substrate specificity of allelic variants of the TAP peptide transporter. *Immunity* 1, 775-84.
- Heintke, S., Chen, M., Ritz, U., Lankat-Buttgereit, B., Koch, J., Abele, R., Seliger, B., Tampé, R. (2003). Functional cysteine-less subunits of the transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) by de novo gene assembly. *FEBS Lett* 533, 42-6.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-9.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73, 1019-49.
- Herberg, J. A., Sgouros J., Jones, T., Copeman, J., Humphray, S. J., Sheer, D., Cresswell, P., Beck, S., and Trowsdale, J. (1998). Genomic analysis of the Tapasin gene, located close to the TAP loci in the MHC. *Eur J Immunol* 28, 459-67.
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8, 67-113.
- Hirano, N., Shibasaki, F., Sakai, R., Tanaka, T., Nishida, J., Yazaki, Y., Takenawa, T., and Hirai, H. (1995). Molecular cloning of the human glucose-regulated protein ERp57/GRP58, a thiol-dependent reductase. Identification of its secretory form and inducible expression by the oncogenic transformation. *Eur J Biochem* 234, 336-42.
- Holland, I. B. and Blight, M.A. (1999). ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* 293, 381-99.
- Hopfner, K. P., Karcher, A., Shin, D. S., Craig, L., Arthur, L. M., Carney, J. P., and Tainer, J. A. (2000). Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* 101, 789-800.

- Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihuzi, T., Tremblay, L. O., Herscovics, A., and Nagata, K. (2001). A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* 2, 415-22.
- Howarth, M., Williams, A., Tolstrup, A. B., and Elliott, T. (2004). Tapasin enhances MHC class I peptide presentation according to peptide half-life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11737-42.
- Hughes, E. A., and Cresswell, P. (1998). The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr Biol* 8, 709-12.
- Hung, L. W., Wang, I. X., Nikaido, K., Liu, P. Q., Ames, G. F., and Kim, S. H. (1998). Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 396, 703-7.
- Jacob, J. P., Milne, S., Beck, S., and Kaufman, J. (2000). The major and a minor class II beta-chain (B-LB) gene flank the Tapasin gene in the B-F /B-L region of the chicken major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 51, 138-47.
- Jakob, C. A., Bodmer, D., Spirig, U., Battig, P., Marcil, A., Dignard, D., Bergeron, J. J., Thomas, D. Y., and Aebi, M. (2001). Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep* 2, 423-30.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2002). *Immunologie*. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2005). *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 6th Edition, Garland Science Publishing, New York (USA).
- Jerzy K. Kulski, J. K., Shiina, T., Anzai, T., Kohara, S., and Inoko, H. (2002). Comparative genomic analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man. *Immunol Rev* 190, 95-122.
- Joly, E., Deverson, E. V., Coadwell, J. W., Gunther, E., Howard, J. C., and Butcher, G. W. (1994). The distribution of Tap2 alleles among laboratory rat RT1 haplotypes. *Immunogenetics* 40, 45-53.
- Jones, B. and Janeway, C. A. Jr. (1981). Functional activities of antibodies against brain-associated T cell antigens. I. Induction of T cell proliferation. *Eur J Immunol* 11, 584-92.
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292, 195-202.
- Kapoor, M., Srinivas, H., Kandiah, E., Gemma, E., Ellgaard, L., Oscarson, S., Helenius, A., and Surolia, A. (2003). Interactions of substrate with calreticulin, an endoplasmic reticulum chaperone. *J Biol Chem* 278, 6194-200.
- Karttunen, J. T., Lehner, P. J., Gupta, S. S., Hewitt, E. W., and Cresswell, P. (2001). Distinct functions and cooperative interaction of the subunits of the transporter associated with antigen processing (TAP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7431-6.

- Kelly, A., Powis, S. H., Kerr, L. A., Mockridge, I., Elliott, T., Bastin, J., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Trowsdale, J., and Townsend, A. (1992). Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* 355, 641-4.
- Keusekotten, K., Leonhardt, R. M., Ehse, S., and Knittler, M. R. (2006). Biogenesis of functional antigenic peptide-transporter TAP requires assembly of pre-existing TAP1 with newly synthesized TAP2. *J Biol Chem* Apr 19, (Epub ahead of print).
- Khan, S., van den Broek, M., Schwarz, K., de Giuli, R., Diener, P. A., and Groettrup, M. (2001). Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver. *J Immunol* 167, 6859-68.
- Kisselev, A. F., Garcia-Calvo, M., Overkleeft, H. S., Peterson, E., Pennington, M. W., Ploegh, H. L., Thornberry, N. A., and Goldberg, A. L. (2003). The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J Biol Chem* 278, 35869-77.
- Kleijmeer, M. J. Kelly, A., Geuze, H. J., Slot, J. W., Townsend, A., and Trowsdale, J. (1992). Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature* 357, 342-4.
- Klein, J., and Sato, A. (1998). Birth of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 47,199-209.
- Kloetzel, P. M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 179-87.
- Kloetzel, P. M. (2004). The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta* 1695, 225-33.
- Knowlton, J. R., Johnston, S. C., Whitby, F. G., Realini, C., Zhang, Z., Rechsteiner, M., and Hill, C. P. (1997). Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha). *Nature* 390, 639-43.
- Koch, J., Guntrum, R., Heintke, S., Kyritsis, C., and Tampé, R. (2004). Functional dissection of the transmembrane domains of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Biol Chem* 279, 10142-7.
- Koopmann, J. O., Post, M., Neefjes, J. J., Hämmerling, G. J., and Momburg F. (1996). Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur J Immunol* 26, 1720-8.
- Koopmann, J. O., Albring, J., Huter, E., Bulbuc, N., Spee, P., Neefjes, J., Hämmerling, G. J., and Momburg, F. (2000). Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* 13, 117-27.

- Kostova, Z., and Wolf, D. H. (2003). For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J* 22, 2309-17.
- Kunisawa, J., and Shastri, N. (2003). The group II chaperonin TRiC protects proteolytic intermediates from degradation in the MHC class I antigen processing pathway. *Mol Cell* 12, 565-76.
- Lacaille, V. G., and Androlewicz, M. J. (1998). Herpes simplex virus inhibitor ICP47 destabilizes the transporter associated with antigen processing (TAP) heterodimer. *J Biol Chem* 273, 17386-90.
- Lapinski, P. E., Neubig, R. R., and Raghavan, M. (2001). Walker A lysine mutations of TAP1 and TAP2 interfere with peptide translocation but not peptide binding. *J Biol Chem* 276, 7526-33.
- Lautier, D., Canitrot, Y., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (1996). Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochem Pharmacol* 52, 967-77.
- Lauvau, G., Kakimi, K., Niedermann, G., Ostankovitch, M., Yotnda, P., Firat, H., Chisari, F. V., and van Endert, P. M. (1999). Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells. *J Exp Med* 190, 1227-40.
- Leach, M. R., Cohen-Doyle, M. F., Thomas, D. Y., and Williams, D. B. (2002). Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin. *J Biol Chem* 277, 29686-97.
- Leach, M. R., and Williams, D. B. (2004). Lectin-deficient calnexin is capable of binding class I histocompatibility molecules in vivo and preventing their degradation. *J Biol Chem* 279, 9072-9.
- Lehner, P. J., Surman, M. J., and Cresswell, P. (1998). Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity* 8, 221-31.
- Leonhardt, R. M., Keusekotten, K., Bekpen, C., and Knittler, M. R. (2005). Critical role for the tapasin-docking site of TAP2 in the functional integrity of the MHC class I-peptide-loading complex. *J Immunol* 175, 5104-14.
- Levy, F., Burri, L., Morel, S., Peitrequin, A. L., Levy, N., Bachi, A., Hellman, U., Van den Eynde, B. J., and Servis, C. (2002). The final N-terminal trimming of a subaminoterminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases. *J Immunol* 169, 4161-71.
- Lewis, J. W., and Elliott, T. (1998). Evidence for successive peptide binding and quality control stages during MHC class I assembly. *Curr Biol* 8, 717-20.
- Lewis, J. W., Sewell, A., Price, D., and Elliott, T. (1998). HLA-A*0201 presents TAP-dependent peptide epitopes to cytotoxic T lymphocytes in the absence of tapasin. *Eur J Immunol* 28, 3214-20.

- Li, S., Sjogren, H. O., Hellman, U., Pettersson, R. F., and Wang, P. (1997). Cloning and functional characterization of a subunit of the transporter associated with antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8708-13.
- Li, S., Paulsson, K. M., Sjogren, H. O., and Wang, P. (1999). Peptide-bound major histocompatibility complex class I molecules associate with tapasin before dissociation from transporter associated with antigen processing. *J Biol Chem* 274, 8649-54.
- Lindquist, J. A., Jensen, O. N., Mann, M., and Hämmerling, G. J. (1998). ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *EMBO J* 17, 2186-95.
- Ljunggren, H. G. and Karre K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med* 162, 1745-59.
- Lobigs, M., Chelvanayagam, G., and Mullbacher, A. (2000). Proteolytic processing of peptides in the lumen of the endoplasmic reticulum for antigen presentation by major histocompatibility class I. *Eur J Immunol* 30, 1496-506.
- Loo, T. W., and Clarke, D. M. (2000). The packing of the transmembrane segments of human multidrug resistance P-glycoprotein is revealed by disulfide cross-linking analysis. *J Biol Chem* 275, 5253-6.
- Loo, T. W., Bartlett, M. C., and Clarke, D. M. (2002). The "LSGGQ" motif in each nucleotide-binding domain of human P-glycoprotein is adjacent to the opposing walker A sequence. *J Biol Chem* 277, 41303-6.
- Madden, D. R. (1995). The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 13, 587-622.
- Mancias, J. D., and Goldberg, J. (2005). Exiting the endoplasmic reticulum. *Traffic* 6, 278-85.
- Marguet, D., Spiliotis, E. T., Pentcheva, T., Lebowitz, M., Schneck, J., and Edidin, M. (1999). Lateral diffusion of GFP-tagged H2Ld molecules and of GFP-TAP1 reports on the assembly and retention of these molecules in the endoplasmic reticulum. *Immunity* 11, 231-40.
- Marsh, S. G. E., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B., Erlich, H. A., Geraghty, D. E., Hansen, J. A., Mach, B., Mayr, W. R., Parham, P., Petersdorf, E. W., Sasazuki, T., Schreuder, G. M. T., Strominger, J. L., Svejgaard A., and Paul I. Terasaki P. I. (2002). Nomenclature for factors of the HLA system. *Hum Immunol* 63, 1213-68.
- Marusina, K., Iyer, M., and Monaco, J. J. (1997). Allelic variation in the mouse Tap-1 and Tap-2 transporter genes. *J Immunol* 158, 5251-6.
- Meyer, T. H., van Endert, P. M., Uebel, S., Ehring, B., and Tampe, R. (1994). Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells. *FEBS Lett* 351, 443-7.

- Momburg, F., Ortiz-Navarrete, V., Neefjes, J., Goulmy, E., van de Wal, Y., Spits, H., Powis, S. J., Butcher, G. W., Howard, J. C., Walden, P., and Hämmerling, G. J. (1992). Proteasome subunits encoded by the major histocompatibility complex are not essential for antigen presentation. *Nature* 360, 174-7.
- Momburg, F., Roelse, J., Hämmerling, G. J., and Neefjes, J. J. (1994a). Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp Med* 179, 1613-23.
- Momburg, F., Roelse, J., Howard, J. C., Butcher, G. W., Hämmerling, G. J., and Neefjes, J. J. (1994b). Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature* 367, 648-51.
- Momburg, F., Armandola, E. A., Post, M., and Hämmerling, G.J. (1996). Residues in TAP2 peptide transporters controlling substrate specificity. *J Immunol* 156, 1756-63.
- Momburg, F., and Hämmerling, G.J. (1998). Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv Immunol* 68, 191-256.
- Momburg, F., and 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, 217-33.
- Müller, K. M., Ebensperger, C., and Tampé R. (1994). Nucleotide binding to the hydrophilic C-terminal domain of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Biol Chem* 269, 14032-7.
- Neefjes, J. J., Momburg, F., and Hämmerling, G. J. (1993). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 261, 769-71.
- Neisig, A., Roelse, J., Sijts, A. J., Ossendorp, F., Feltkamp, M. C., Kast, W. M., Melief, C. J., and Neefjes, J. J. (1995). Major differences in transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent translocation of MHC class I-presentable peptides and the effect of flanking sequences. *J Immunol* 154, 1273-9.
- Neisig, A., Wubbolts, R., Zang, X., Melief, C., and Neefjes, J. (1996). Allele-specific differences in the interaction of MHC class I molecules with transporters associated with antigen processing. *J Immunol* 156, 3196-206.
- Neumann, L., and Tampé, R. (1999). Kinetic analysis of peptide binding to the TAP transport complex: evidence for structural rearrangements induced by substrate binding. *J Mol Biol* 294, 1203-13.
- Neumann, L., Abele, R., and Tampé, R. (2002). Thermodynamics of peptide binding to the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Mol Biol* 324, 965-73.

- Nijenhuis, M. and Hämmerling, G.J. (1996). Multiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J Immunol* 157, 5467-77.
- Nijenhuis, M., Schmitt, S., Armandola, E. A., Obst, R., Brunner, J., and Hämmerling, G. J. (1996). Identification of a contact region for peptide on the TAP1 chain of the transporter associated with antigen processing. *J Immunol* 156, 2186-95.
- Obst, R., Armandola, E. A., Nijenhuis, M., Momburg, F., and Hämmerling, G. J. (1995). TAP polymorphism does not influence transport of peptide variants in mice and humans. *Eur J Immunol* 25, 2170-6.
- Oliveira, V., Campos, M., Melo, R. L., Ferro, E. S., Camargo, A. C., Juliano, M. A., and Juliano, L. (2001). Substrate specificity characterization of recombinant metallo oligo-peptidases thimet oligopeptidase and neurolysin. *Biochemistry* 40, 4417-25.
- Oliver, J. D., Roderick, H. L., Llewellyn, D. H., and High, S. (1999). ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol Biol Cell* 10, 2573-82.
- Ortmann, B., Androlewicz, M. J., and Cresswell, P. (1994). MHC class I/beta 2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 368, 864-7.
- Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P. J., Sadasivan, B., Herberg, J. A., Grandea, A. G., Riddell, S. R., Tampe, R., Spies, T., Trowsdale, J., and Cresswell, P. (1997). A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 277, 1306-9.
- Pamer, E., and Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing *Annu Rev Immunol* 16, 323-58.
- Paquet, M. E., Cohen-Doyle, M., Shore, G. C., and Williams, D. B. (2004). Bap29/31 influences the intracellular traffic of MHC class I molecules. *J Immunol* 172, 7548-55.
- Park, B., Lee, S., Kim, E., and Ahn, K. (2003). A single polymorphic residue within the peptide-binding cleft of MHC class I molecules determines spectrum of tapasin dependence. *J Immunol* 170, 961-8.
- Paulsson, K. M., Kleijmeer, M. J., Griffith, J., Jevon, M., Chen, S., Anderson, P. O., Sjogren, H. O., Li, S., and Wang, P. (2002). Association of tapasin and COPI provides a mechanism for the retrograde transport of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 277, 18266-71.
- Paulsson, K., and Wang, P. (2003). Chaperones and folding of MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1641, 1-12.
- Peh, C. A., Burrows, S. R., Barnden, M., Khanna, R., Cresswell, P., Moss, D. J., and McCluskey, J. (1998). HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence

- of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading. *Immunity* 8, 531-42.
- Peh, C. A., Laham, N., Burrows, S. R., Zhu, Y., and McCluskey, J. (2000). Distinct functions of tapasin revealed by polymorphism in MHC class I peptide loading. *J Immunol* 164, 292-9.
- Pentcheva, T., Spiliotis, E. T., and Edidin, M. (2002). Cutting edge: Tapasin is retained in the endoplasmic reticulum by dynamic clustering and exclusion from endoplasmic reticulum exit sites. *J Immunol* 168, 1538-41.
- Petersen, J. L., Hickman-Miller, H. D., McIlhaney, M. M., Vargas, S. E., Purcell, A. W., Hildebrand, W. H., and Solheim, J. C. (2005). A charged amino acid residue in the transmembrane/cytoplasmic region of tapasin influences MHC class I assembly and maturation. *J Immunol* 174, 962-9.
- Pollock, S., Kozlov, G., Pelletier, M. F., Trempe, J. F., Jansen, G., Sitnikov, D., Bergeron, J. J., Gehring, K., Ekiel, I., and Thomas, D. Y. (2004). Specific interaction of ERp57 and calnexin determined by NMR spectroscopy and an ER two-hybrid system. *EMBO J* 23, 1020-9.
- Powis, S. J., Townsend, A. R., Deverson, E. V., Bastin, J., Butcher, G. W., and Howard, J. C. (1991). Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature* 354, 528-31.
- Powis, S. J., Deverson, E. V., Coadwell, W. J., Ciruela, A., Huskisson, N. S., Smith, H., Butcher, G. W., and Howard, J. C. (1992). Effect of polymorphism of an MHC-linked transporter on the peptides assembled in a class I molecule. *Nature* 357, 211-5.
- Powis, S. H., Tonks, S., Mockridge, I., Kelly, A. P., Bodmer, J. G., and Trowsdale, J. (1993). Alleles and haplotypes of the MHC-encoded ABC transporters TAP1 and TAP2. *Immunogenetics* 37, 373-80.
- Powis, S. J., Young, L. L., Joly, E., Barker, P. J., Richardson, L., Brandt, R. P., Melief, C. J., Howard, J. C., and Butcher, G. W. (1996). The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* 4, 159-65.
- Procko, E., Raghuraman, G., Wiley, D. C., Raghavan, M., and Gaudet, R. (2005). Identification of domain boundaries within the N-termini of TAP1 and TAP2 and their importance in tapasin binding and tapasin-mediated increase in peptide loading of MHC class I. *Immunol Cell Biol* 83, 475-82.
- Purcell, A. W., Gorman, J. J., Garcia-Peydro, M., Paradela, A., Burrows, S. R., Talbo, G. H., Laham, N., Peh, C. A., Reynolds, E. C., Lopez De Castro, J. A., and McCluskey, J. (2001). Quantitative and qualitative influences of tapasin on the class I peptide repertoire. *J Immunol* 166, 1016-27.
- Raghuraman, G., Lapinski, P. E., and Raghavan M. (2002). Tapasin interacts with the membrane-spanning domains of both TAP subunits and enhances the structural stability of TAP1 x TAP2 Complexes. *J Biol Chem* 277, 41786-94.

- Rajagopalan, S., Xu, Y., and Brenner, M. B. (1994). Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin. *Science* 263, 387-90.
- Rammensee, H. G., Falk, K., and Rotzschke, O. (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 11, 213-44.
- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J. W., and Neefjes, J. (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* 18, 97-108.
- Reits, E., Neijssen, J., Herberts, C., Benckhuijsen, W., Janssen, L., Drijfhout, J. W., and Neefjes, J. (2004). A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* 20, 495-506.
- Ritz, U., Momburg, F., Pilch, H., Huber, C., Maeurer, M. J., and Seliger, B. (2001). Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. *Int J Oncol* 19, 1211-20.
- Rock, K. L., York, I. A., and Goldberg, A. L. (2004). Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat Immunol* 5, 670-7.
- Russ, G., Esquivel, F., Yewdell, J. W., Cresswell, P., Spies, T., and Bennink, J. R. (1995). Assembly, intracellular localization, and nucleotide binding properties of the human peptide transporters TAP1 and TAP2 expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Biol Chem* 270, 21312-8.
- Sadasivan, B. K., Cariappa, A., Waneck, G. L., and Cresswell, P. (1995). Assembly, peptide loading, and transport of MHC class I molecules in a calnexin-negative cell line. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60, 267-75.
- Sadasivan, B., Lehner, P. J., Ortmann, B., Spies, T., and Cresswell, P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5, 103-14.
- Saric, T., Benigna, J., Graef, C. I., Akopian, T. N., Rock, K. L., Goldberg, A. L. (2001). Major histocompatibility complex class I-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimet oligopeptidase. *J Biol Chem* 276, 36474-81.
- Saric, T., Chang, S. C., Hattori, A., York, I. A., Markant, S., Rock, K. L., Tsujimoto, M., and Goldberg, A. L. (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* 3, 1169-76.
- Schmees, G., Stein, A., Hunke, S., Landmesser, H., and Schneider, E. (1999). Functional consequences of mutations in the conserved 'signature sequence' of the ATP-binding-cassette protein MalK. *Eur J Biochem* 266, 420-30.

- Schoenhals, G. J., Krishna, R. M., Grandea III, A. G., Spies, T., Peterson, P. A., Yang, Y., and Fruh, K. (1999). Retention of empty MHC class I molecules by tapasin is essential to reconstitute antigen presentation in invertebrate cells. *EMBO J* 18, 743-53.
- Schrag, J. D., Bergeron, J. J., Li, Y., Borisova, S., Hahn, M., Thomas, D. Y., and Cygler, M. (2001). The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell* 8, 633-44.
- Schrodt, S., Koch, J., and Tampé, R. (2006). Membrane topology of the transporter associated with antigen processing (TAP1) within an assembled functional peptide-loading complex. *J Biol Chem* 281, 6455-62.
- Scott, J. E., and Dawson, J. R. (1995). MHC class I expression and transport in a calnexin-deficient cell line. *J Immunol* 155, 143-8.
- Seifert, U., Maranon, C., Shmueli, A., Desoutter, J. F., Wesoloski, L., Janek, K., Henklein, P., Diescher, S., Andrieu, M., de la Salle, H., Weinschenk, T., Schild, H., Laderach, D., Galy, A., Haas, G., Kloetzel, P. M., Reiss, Y., and Hosmalin, A. (2003). An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat Immunol* 4, 375-9.
- Seliger, B., Schreiber, K., Delp, K., Meissner, M., Hammers, S., Reichert, T., Pawlischko, K., Tampé, R., and Huber, C. (2001a). Downregulation of the constitutive tapasin expression in human tumor cells of distinct origin and its transcriptional upregulation by cytokines. *Tissue Antigens* 57, 39-45.
- Seliger, B., Wollscheid, U., Momburg, F., Blankenstein, T., and Huber, C. (2001b). Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells. *Cancer Res* 61, 1095-9.
- Seliger, B., Ritz, U., Abele, R., Bock, M., Tampé, R., Sutter, G., Drexler, I., Huber, C., and Ferrone, S. (2001c). Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res* 61, 8647-50.
- Serwold, T., Gaw, S., and Shastri, N. (2001). ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nat Immunol* 2, 644-51.
- Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., and Shastri, N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419, 480-3.
- Sevier, C. S., and Kaiser, C. A. (2002). Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 836-47.
- Shimizu, Y., and DeMars, R. (1989). Production of human cells expressing individual transferred HLA-A,-B,-C genes using an HLA-A,-B,-C null human cell line. *J Immunol* 142, 3320-8.
- Shusta, E. V., Holler, P. D., Kieke, M. C., Kranz, D. M., and Wittrup, K. D. (2000). Directed evolution of a stable scaffold for T-cell receptor engineering. *Nat Biotechnol* 18, 754-9.

- Shyamala, V., Baichwal, V., Beall, E., and Ames, G. F. (1991). Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J Biol Chem* 266, 18714-9.
- Sijts, A. J., Standera, S., Toes, R. E., Ruppert, T., Beekman, N. J., van Veelen, P. A., Ossendorp, F. A., Melief, C. J., and Kloetzel, P. M. (2000). MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. *J Immunol* 164, 4500-6.
- Smith, P. C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J. E., Rosen, J., Thomas, P. J., and Hunt, J. F. (2002). ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* 10, 139-49.
- Solheim, J. C., Harris, M. R., Kindle, C. S., and Hansen, T. H. (1997). Prominence of beta 2-microglobulin, class I heavy chain conformation, and tapasin in the interactions of class I heavy chain with calreticulin and the transporter associated with antigen processing. *J Immunol* 158, 2236-41.
- Spies, T., and DeMars, R. (1991). Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature* 351, 323-4.
- Spies, T., Cerundolo, V., Colonna, M., Cresswell, P., Townsend, A., and DeMars, R. (1992). Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature* 355, 644-6.
- Spiliotis, E. T., Manley, H., Osorio, M., Zuniga, M. C., Edidin, M. (2000). Selective export of MHC class I molecules from the ER after their dissociation from TAP. *Immunity* 13, 841-51.
- Stohwasser, R., Salzmann, U., Giesebrecht, J., Kloetzel, P. M., and Holzhutter, H. G. (2000). Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur J Biochem* 267, 6221-30.
- Stoltze, L., Schirle, M., Schwarz, G., Schroter, C., Thompson, M. W., Hersh, L. B., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Rammensee, H. G., and Schild, H. (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol* 1, 413-8.
- Suh, W. K., Mitchell, E. K., Yang, Y., Peterson, P. A., Waneck, G. L., and Williams, D. B. (1996). MHC class I molecules form ternary complexes with calnexin and TAP and undergo peptide-regulated interaction with TAP via their extracellular domains. *J Exp Med* 184, 337-48.
- Szakacs, G., Ozvegy, C., Bakos, E., Sarkadi, B., and Varadi, A. (2001). Role of glycine-534 and glycine-1179 of human multidrug resistance protein (MDR1) in drug-mediated control of ATP hydrolysis. *Biochem J* 356, 71-5.
- Tan, P. (1997). Analyse des Retentionsmechanismus von TAP-Peptid-Transporter-Molekülen im Endoplasmatischen Retikulum. Freie Universität Berlin, Diplom-Arbeit.
- Tan, P., Kropshofer, H., Mandelboim, O., Bulbuc, N., Hämmerling, G. J., and 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. *J Immunol* 168, 1950-60.
- Tanioka, T., Hattori, A. Masuda, S., Nomura, Y., Nakayama, H., Mizutani, S., and Tsujimoto, M. (2003). Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J Biol Chem* 278, 32275-83.
- Teng, M. S., Stephens, R., Du Pasquier, L., Freeman, T., Lindquist, J. A., and Trowsdale, J. (2002). A human TAPBP (TAPASIN)-related gene, TAPBP-R. *Eur J Immunol* 32, 1059-68.
- Toes, R. E., Nussbaum, A. K., Degermann, S., Schirle, M., Emmerich, N. P., Kraft, M., Laplace, C., Zwinderman, A., Dick, T. P., Müller, J., Schonfisch, B., Schmid, C., Fehling, H. J., Stevanovic, S., Rammensee, H. G., and Schild, H. (2001). Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med* 194, 1-12.
- Tomazin, R., Hill, A. B., Jugovic, P., York, I., van Endert, P., Ploegh, H. L., Andrews, D. W., and Johnson, D. C. (1996). Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. *EMBO J* 15, 3256-66.
- Turnquist, H. R., Thomas, H. J., Prilliman, K. R., Lutz, C. T., Hildebrand, W. H., and Solheim, J. C. (2000). HLA-B polymorphism affects interactions with multiple endoplasmic reticulum proteins. *Eur J Immunol* 30, 3021-8.
- Turnquist, H. R., Vargas, S. E., Reber, A. J., McIlhaney, M. M., Li, S., Wang, P., Sanderson, S. D., Gubler, B., van Endert, P., and Solheim, J. C. (2001). A region of tapasin that affects L(d) binding and assembly. *J Immunol* 167, 4443-9.
- Turnquist, H. R., Petersen, J. L., Vargas, S. E., McIlhaney, M. M., Bedows, E., Mayer, W. E., Grande III, A. G., Van Kaer, L., and Solheim, J. C. (2004). The Ig-like domain of tapasin influences intermolecular interactions. *J Immunol* 172, 2976-84.
- Uebel, S., Kraas, W., Kienle, S., Wiesmüller, K. H., Jung, G., and Tampé, R. (1997). Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8976-81.
- Uebel, S., and Tampé, R. (1999). Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr Opin Immunol* 11, 203-8.
- Urlinger, S., Kuchler, K., Meyer, T. H., Uebel, S., and Tampé, R. (1997). Intracellular location, complex formation, and function of the transporter associated with antigen processing in yeast. *Eur J Biochem* 245, 266-72.
- Van Endert, P. M., Tampé, R., Meyer, T. H., Tisch, R., Bach, J. F., and McDevitt, H. O. (1994). A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity* 1, 491-500.

- Van Endert, P. M. (1999). Role of nucleotides and peptide substrate for stability and functional state of the human ABC family transporters associated with antigen processing. *J Biol Chem* 274, 14632-8.
- Van Kaer, L., Ashton Rickardt, P. G., Ploegh, H.L., and Tonewaga, S. (1992). TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell* 71, 1205-14.
- Vassilakos, A., Cohen-Doyle, M. F., Peterson, P. A., Jackson, M. R., and Williams, D. B. (1996). The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO J* 15, 1495-506.
- Velarde, G., Ford, R. C., Rosenberg, M. F., and Powis, S. J. (2001). Three-dimensional structure of transporter associated with antigen processing (TAP) obtained by single Particle image analysis. *J Biol Chem* 276, 46054-63.
- Vos, J. C., Spee, P., Momburg, F., and Neefjes, J. (1999). Membrane topology and dimerization of the two subunits of the transporter associated with antigen processing reveal a three-domain structure. *J Immunol* 163, 6679-85.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1, 945-51.
- Wei, M. L., and Cresswell, P. (1992). HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature* 356, 443-6.
- Welsh, M. J., and Smith, A. E. (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73, 1251-4.
- Williams, A. P., Peh, C. A., Purcell, A. W., McCluskey, J., and Elliott, T. (2002). Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. *Immunity* 16, 509-20.
- Wright, C. A., Kozik, P., Zacharias, M., and Springer, S. (2004). Tapasin and other chaperones: models of the MHC class I loading complex. *Biol Chem* 385, 763-78.
- Yewdell, J. W. (2001). Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol* 11, 294-7.
- York, I. A., Chang, S. C., Saric, T., Keys, J. A., Favreau, J. M., Goldberg, A. L., and Rock, K. L. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol* 3, 1177-84.
- York, I. A., Mo, A. X., Lemerise, K., Zeng, W., Shen, Y., Abraham, C. R., Saric, T., Goldberg, A. L., and Rock, K. L. (2003). The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity* 18, 429-40.

- Yu, Y. Y., Turnquist, H. R., Myers, N. B., Balendiran, G. K., Hansen, T. H., and Solheim, J. C. (1999). An extensive region of an MHC class I alpha 2 domain loop influences interaction with the assembly complex. *J Immunol* 163, 4427-33.
- Zacharias, M., and Springer, S. (2004). Conformational flexibility of the MHC class I alpha1-alpha2 domain in peptide bound and free states: a molecular dynamics simulation study. *Biophys J* 87, 2203-14.
- Zapun, A., Petrescu, S. M., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Thomas, D. Y., and Bergeron, J. J. (1997). Conformation-independent binding of monoglucosylated ribonuclease B to calnexin. *Cell* 88, 29-38.
- 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., and Engelhard, V. H. (2003). Tapasin is a facilitator, not an editor, of class I MHC peptide binding. *J Immunol* 171, 5287-95.
- Zernich, D., Purcell, A. W., Macdonald, W. A., Kjer-Nielsen, L., El, 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., and McCluskey, J. (2004). Natural HLA class I polymorphism controls the pathway of antigen presentation and susceptibility to viral evasion. *J Exp Med* 200, 13-24.
- Zhang, Q., Tector, M., and Salter, R.D. (1995). Calnexin recognizes carbohydrate and protein determinants of class I major histocompatibility complex molecules. *J Biol Chem* 270, 3944-8.
- Zhang, Q., and Salter, R. D. (1998). Distinct patterns of folding and interactions with calnexin and calreticulin in human class I MHC proteins with altered N-glycosylation. *J Immunol* 160, 831-7.
- Zhang, C., Anderson, A., and DeLisi, C. (1998). Structural principles that govern the peptide-binding motifs of class I MHC molecules. *J Mol Biol* 281, 929-47.

VIII. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Frank Momburg der Abteilung „Molekulare Immunologie“ des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg angefertigt.

Ich möchte mich hier ganz herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich PD Dr. Frank Momburg für die Themenbereitstellung, die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, für seine aktive Hilfe bei den molekularbiologischen Arbeiten, für sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit und für seine ständige Diskussionsbereitschaft danken. Auch danke ich ihm dafür, dass ich die Unterstützung der Auszubildenden Petra Ludwig genießen konnte.

Prof. Dr. Günter J. Hämmerling danke ich für seine Unterstützung durch die Bereitstellung aller notwendigen Arbeitsmittel.

PD Dr. Harald Kropshofer danke ich dafür, dass er sich bereit erklärt hat, meine Arbeit als Zeitgutachter vor der Fakultät zu vertreten.

Ich möchte mich außerdem bei Petra Ludwig bedanken, die mich als Auszubildende tatkräftig unterstützt hat. Besonders möchte ich mich für ihren Einsatz, ihre Präzision und phänomenale Geschwindigkeit bedanken.

Bei Klaus Hexel und Manuel Scheuermann möchte ich mich für die hilfreiche Unterstützung am FACS bedanken.

Dr. Gerhard Moldenhauer möchte ich für die Bereitstellung von Antikörpern und anderer Reagenzien danken.

Dr. Ted Hansen möchte ich für das Antiserum gegen mTpn danken, dass er mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung für die große Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere möchte ich Dr. Natalio Garbi und Dr. Thilo Oelert für ihre hilfreichen Ratschläge bei der Erstellung der Promotion danken. Nadja Bulbuc möchte ich für ihre Unterstützung bei der Etablierung des Western Blots danken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Steffi für ihre Geduld und Unterstützung aller Art, sowie für das mir entgegenbrachte Verständnis und die Aufmunterungen während der Anfertigung der Dissertation.

Meinem Bruder danke ich dafür, dass er immer für mich da ist, wenn ich ihn brauche, und für seine Ratschläge zur Behebung von Schwierigkeiten am Computer.

Meinen Eltern möchte ich besonders für das in mich gesetzte Vertrauen, den Rückhalt und die Unterstützung in jeder Hinsicht danken.