

**Analyse der ATPase-Aktivität des rekonstituierten
Antigenpeptid-Transporters TAP**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Chemische und Pharmazeutische
Wissenschaften (FB 14)
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Stanislav Gorbulev
aus Moskau

Frankfurt am Main 2004

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften (FB 14)
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. R. Tampé, Prof. B. Ludwig

Datum der Disputation: 22. Dezember 2004

**Analyse der ATPase-Aktivität des rekonstituierten
Antigenpeptid-Transporters TAP**



Angefertigt an der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Die vorliegende Arbeit wurde an der Philipps-Universität Marburg am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II und am Institut für Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Anleitung von Prof. Dr. Robert Tampé angefertigt.

Teile der vorgelegten Arbeit sind veröffentlicht in:

Gorbulev, S., Abele, R. & Tampé, R. (2001) Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 3732-3737.

Kyritsis, C., Gorbulev, S., Hutschenreiter, S., Pawlitschko, K., Abele, R. & Tampé, R. (2001) Molecular Mechanism and Structural Aspects of TAP Inhibition by the cytomegalievirus Protein US6. *J. Biol. Chem.* **276**, 48031-48039.

Danksagung

Ich bedanke mich zunächst bei Prof. Dr. Robert Tampé für die interessante Themenstellung, intensive Betreuung der vorliegenden Arbeit und die Möglichkeit, diese in seinem Institut durchführen zu können. Bei Prof. Dr. Bernd Ludwig bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferates.

Ganz besonders danke ich all den Kollegen, die die Zeit der Promotion zu einer wunderbaren Zeit gemacht haben: Stephan Uebel, Lars Neumann, Stefan Ammer, Kurt Pawlitschko, Min Chen, Ulf Rädler, Nils Hanekop, Carsten Horn, Silke Hutschenreiter, Carmen Graf, Matthias Hofacker, Susanne Heintke, Suman Lata, Martynas Gavutis, Dr. Rupert Abele, Dr. Lutz Schmitt, Dr. Jacob Piehler, Dr. Joachim Koch, Dr. Dagmar Bauer, Dr. Sascha Lankat-Buttgereit, Dr. Hans Bäumert, Hilke Zander, Sylvia Blunck, Robert Ernst, Peter Lamken, Lena Zaitseva, Karl-Heinz Burk, Nicole Löwer, Ute Beck, Charlotte Jung, Gudrun Illig, Gerhard Spatz-Kümbel, Renate Guntrum.

Besonderer Dank gebührt Christoph Kyritsis für die produktive Zusammenarbeit an dem US6-Projekt und Eckhart Linker für seine Unterstützung in der Zellkultur.

Zu guter Letzt danke ich besonders meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung und Motivation das Studium erst ermöglicht haben und meiner Frau Mascha, die in guten und in schlechten Zeiten immer für mich da war.

Meinen Eltern

1	EINLEITUNG	1
1.1	Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle	1
1.2	Membrantransport durch ABC-Transporter	5
1.3	Antigenpeptid-Transporter TAP	11
1.4	Virale Inhibition des TAP-Komplexes	17
1.5	Motivation und Zielsetzung	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Material	20
2.1.1	Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	20
2.1.2	Verbrauchsmaterial	21
2.1.3	Puffer	22
2.1.4	Geräte	29
2.1.5	Zellen und Zellkulturmedia	30
2.1.6	Antikörper, Lipide und Peptide	31
2.2	Methoden	31
2.2.1	Zellkultur	31
2.2.2	Markierungsverfahren	32
2.2.2.1	Chloramin-T-Methode (geändert nach McConahey)	32
2.2.2.2	Chloramin-T-beschichtete Reaktionsgefäße	32
2.2.3	Allgemeine biochemische Methoden	32
2.2.3.1	TCA-Fällung von Proteinen	32
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	33
2.2.3.2.1	BCA-Methode	33
2.2.3.2.2	Absorptionsspektroskopie	33
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.2.3.4	Protein-Silberfärbung in Polyacrylamidgelen	34
2.2.3.5	Immunoblot	35
2.2.3.5.1	Tank-Blot	35

2.2.3.5.2	Semi-dry Blot	35
2.2.3.5.3	ECL-Färbung	35
2.2.4	Rekonstitution des TAP-Komplexes	36
2.2.4.1	Liposomen-Präparation	36
2.2.4.2	Liposomendichteassay	37
2.2.4.3	Phospholipidbestimmung (nach Bartlett)	37
2.2.4.4	Mikrosomen-Präparation	37
2.2.4.5	Solubilisierung	38
2.2.4.6	Isolierung des TAP-Komplexes	39
2.2.4.6.1	Reinigung mit ATP-Agarose	39
2.2.4.6.2	Reinigung durch Gelfiltration	39
2.2.4.7	Rekonstitution in Liposomen	40
2.2.4.7.1	Rekonstitution durch Gelfiltration	40
2.2.4.7.2	Rekonstitution durch hydrophobe Adsorption (BioBeads®)	41
2.2.4.8	Abtrennung des Sec61-Komplexes durch Affinitätschromatographie	41
2.2.4.8.1	Antikörperkopplung an die CNBr-aktivierte Sepharose	41
2.2.4.8.2	Affinitätschromatographie	42
2.2.5	Funktionalitätsassays	42
2.2.5.1	Sättigungsbindungsassay	42
2.2.5.2	Filterbindungsassay	43
2.2.5.3	Kompetitionsassay	44
2.2.5.4	Peptidtransportassay I	45
2.2.5.5	Peptidtransportassay II	45
2.2.5.6	ATP-Hydrolyseassay	46
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Biochemische Charakterisierung des TAP-Komplexes	48
3.1.1	Rekonstitution des TAP-Komplexes in Liposomen	48
3.1.2	Charakterisierung der Proteoliposomen	49
3.1.3	Aktivität des rekonstituierten TAP-Komplexes	51
3.1.3.1	TAP-abhängiger Peptidtransport	52
3.1.3.2	ATPase-Aktivität des TAP-Komplexes	53
3.1.3.2.1	Peptid-stimulierte ATP-Hydrolyse des TAP-Komplexes	54

3.1.3.2.2	Kinetische Parameter der TAP-spezifischen ATP-Hydrolyse	56
3.1.3.2.3	Stimulation durch verzweigte Peptide	58
3.1.4	Stöchiometrie des Transportvorganges	60
3.2	Untersuchungen des viralen TAP-Inhibitors US6	68
3.2.1	Lokalisierung von US6(Δ 147-183) in den Proteoliposomen	68
3.2.2	US6(Δ 147-183) inhibiert den TAP-spezifischen Peptidtransport	69
3.2.3	US6(Δ 147-183) inhibiert ATPase-Aktivität von TAP	71
4	DISKUSSION	72
4.1	Rekonstitution des TAP-Komplexes	73
4.2	ATPase-Aktivität des TAP-Komplexes	74
4.3	Stöchiometrie des Peptidtransportes	79
4.4	Inhibition von TAP durch US6	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	85
6	ABKÜRZUNGEN	86
7	LITERATURVERZEICHNIS	90
8	CURRICULUM VITAE	110

1 Einleitung

1.1 Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle

Täglich wird der menschliche Organismus von unzähligen Krankheitserregern angegriffen. Gleichzeitig entarten ständig gewöhnliche Körperzellen zu Tumorzellen. Um auf diese Herausforderung effizient und flexibel reagieren zu können, hat sich im Zuge der Evolution bei Wirbeltieren das adaptive Immunsystem entwickelt (Engelhard, 1994). Dieses komplizierte Abwehrsystem lässt sich in eine humorale (Vitetta *et al.*, 1989) und eine zelluläre Immunität (Kupfer & Singer, 1989) gliedern.

Das humorale Immunsystem beruht auf Rezeptoren (Antikörper), die von Plasmazellen produziert werden und für die spezifische Erkennung von zellfremden Strukturen (Antigene) verantwortlich sind. Die Bindung von Antikörpern an Antigene wie z.B. Oberflächenstrukturen von Bakterien oder Viren, markiert diese für den Abbau durch phagozytierende Zellen oder für die Eliminierung durch das Komplementsystem, bei dem es sich um eine Kaskade aus interagierenden Proteinen handelt.

Die zelluläre Immunität basiert auf der Erkennung von Antigenen in Assoziation mit speziellen Oberflächenproteinen, dem Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC), durch T-Lymphozyten (Watts *et al.*, 1984). Zur Antigenpräsentation steht zum einen der MHC-Klasse-I- und zum anderen der MHC-Klasse-II-Komplex zur Verfügung (Klein *et al.*, 1993). Während MHC-Klasse-II-Komplexe für die Stimulation der antikörpervermittelten Teil des Immunantwortes zur Bekämpfung extrazelluläre Pathogene gebraucht werden, sind MHC-Klasse-I-Moleküle entscheidend an der Bekämpfung von Tumorzellen und intrazellulären Erregern wie z.B. Viren beteiligt. Der MHC-Klasse-II-vermittelte Teil des Immunsystems bildet das Bindeglied zwischen humoraler und zellulärer Immunität. MHC-Klasse-II-Komplexe präsentieren auf der Oberfläche spezialisierter antigenpräsentierender Zellen (*antigen presenting cells*, APC) Fragmente von phagozytierten extrazellulären Strukturen. So genannte T-Helfer-Zellen (CD4+ T-Lymphozyten) leiten die Reifung von Plasmazellen und die Produktion von spezifischen Antikörpern ein, sobald sie ein präsentiertes Peptid als fremd erkennen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Antigenpeptid-Transporter TAP (*transporter associated with antigen processing*). Da der TAP-Komplex eine

entscheidende Rolle in der MHC-Klasse-I-vermittelten Antigenpräsentation spielt, wird im Folgenden dieser Zweig des Immunsystems detailliert beschrieben (Abb. 1).

MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren auf der Oberfläche aller kernhaltigen Körperzellen Fragmente (Peptide) von zytosolischen Proteinen. Die Erkennung eines MHC-Klasse-I-gebundenen Peptids als Teil eines körperfremden Proteins durch zytotoxische T-Zellen (CD8⁺-T-Lymphozyten) führt zur Sekretion des Proteins Perforin und einiger weiterer Faktoren, die die Lyse bzw. Apoptose der präsentierenden Zelle einleiten (Townsend & Bodmer, 1989). Um die Eliminierung gesunder Körperzellen zu verhindern, werden im Laufe ihres Entwicklungsprozesses nur selbsttolerante T-Lymphozyten bis zur vollständigen Reife entwickelt (von Boehmer, 1994). Auf diese Weise werden nur Zellen lysiert, die z.B. virale oder tumorspezifische Strukturen präsentieren. MHC-Klasse-II-Moleküle sind im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Proteinen kaum an der Bekämpfung intrazellulärer Erreger beteiligt.

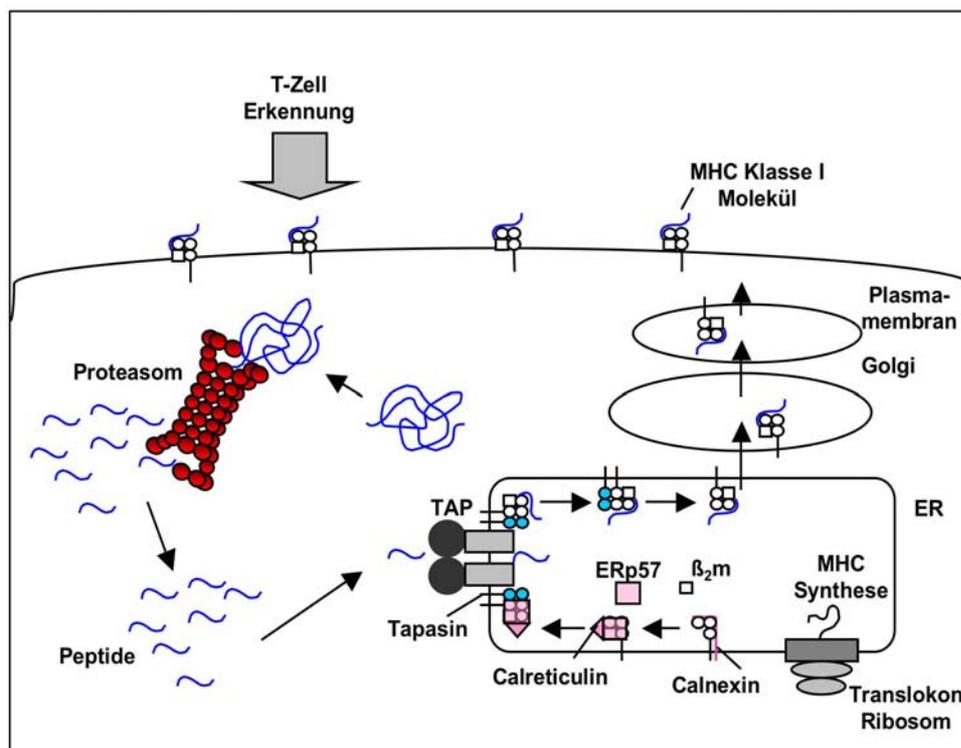


Abb. 1 Antigenprozessierung und -präsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle. Endogene Proteine werden durch den Proteasomkomplex zu Peptiden degradiert und TAP-abhängig in das ER transportiert. Mit Hilfe des Beladungskomplexes, der aus dem Antigenpeptid-Transporter TAP, Tapasin, Calreticulin, ERp57 und MHC-Klasse-I besteht, werden Peptide an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden und über den Golgi-Apparat auf die Zelloberfläche geleitet. Stammt das Peptid aus einem körperfremden Protein, wird die präsentierende Zelle von spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt und zur Apoptose angeregt. Die Assemblierung der MHC-Klasse-I-Moleküle wird durch die Chaperone Calnexin,

Calreticulin sowie durch die thiolabhängige Reduktase ERp57 unterstützt (modifiziert aus Lankat-Buttgereit & Tampé, 2002).

Damit zytosolische Proteinbruchstücke präsentiert werden können, müssen Proteine abgebaut werden. Für diesen Prozess ist der multikatalytische 26S Proteasomkomplex verantwortlich (Seufert & Jentsch, 1992; Rock & Goldberg, 1999), der endogene Proteine zu kurzen Peptiden (8-13 Aminosäuren) degradiert (Wenzel *et al.*, 1994; Ehring *et al.*, 1996; Kisselev *et al.*, 1998). Das katalytische Zentrum des 26S Proteasomkomplexes wird durch das 20S Proteasom gebildet, das aus 28 fassförmig angeordneten Untereinheiten besteht (Baumeister *et al.*, 1998). Röntgenstrukturanalysen der Proteasomkomplexe aus *Thermoplasma acidophilum* (Lowe *et al.*, 1995) und *Saccharomyces cerevisiae* (Groll *et al.*, 1997) zeigten, dass die 28 Untereinheiten vier übereinander gelagerte Ringe bilden. Der obere und untere Ring werden durch je 7 α -Untereinheiten geformt, während die beiden inneren Ringe aus je 7 β -Untereinheiten bestehen.

Die generierten Peptide werden durch den Antigenpeptid-Transporter TAP ATP-abhängig vom Zytosol in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert (Androlewicz *et al.*, 1993; Neefjes *et al.*, 1993; Shepherd *et al.*, 1993) (Abb. 1). Dem Translokationsschritt geht ein ATP-unabhängiger Peptidbindungsschritt voraus (van Endert *et al.*, 1994; Uebel *et al.*, 1995). Der TAP-Komplex liegt als Heterodimer der Untereinheiten TAP1 (81 kDa) und TAP2 (75 kDa) vor (Spies *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1994) und gehört zur Proteinsuperfamilie der *ATP binding cassette* (ABC)-Transporter.

Im ER werden die Peptide auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen. MHC-Klasse-I Moleküle bestehen aus zwei Untereinheiten. Die erste Untereinheit wird durch die schwere Kette (45 kDa) gebildet, die aus den drei Domänen $\alpha 1$ - $\alpha 3$ aufgebaut ist. Die zweite Untereinheit besteht aus der β_2 -Mikroglobulinkette (β_2 -m, 12 kDa). Der Peptidbindende Spalt wird durch $\alpha 1$ und $\alpha 2$ geformt, während β_2 -m über die $\alpha 3$ -Einheit gebunden wird. Für die Membranverankerung ist die schwere Kette verantwortlich (Engelhard, 1994). Strukturelle Untersuchungen zeigten, dass der Peptidbindungsspalt an beiden Enden verschlossen ist, was das relativ enge Längenoptimum (8-10 AS) für gebundene Peptide erklärt (Schumacher *et al.*, 1991; Fremont *et al.*, 1992; Madden *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1992; Bouvier & Wiley, 1994).

Für die Peptidbeladung des MHC-Klasse-I-Moleküls sind mehrere Hilfsproteine notwendig (Lehner & Trowsdale, 1998; Elliott, 1997, Paulsson & Wang, 2004). So ist

Tapasin, ein Typ I Transmembranglykoprotein (48 kDa) für die Verbindung zwischen TAP und MHC I verantwortlich. Es erhöht die Stabilität von TAP (Bangia *et al.*, 1999; Lehner *et al.*, 1998; Raghuraman *et al.*, 2002). Tapasin hält unbeladene MHC I-Moleküle im ER zurück (Schoenhals *et al.*, 1999) und erleichtert bzw. editiert die Beladung von einigen MHC I-Molekülen (Lauvau *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2002; Zarling *et al.*, 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass Tapasin die Zahl funktionaler TAP-Komplexe erhöht und so für einen effizienteren Peptidtransport vom ER in das Zytosol sorgt (Lehner & Trowsdale, 1998; Lehner *et al.*, 1998). Tapasin besteht aus einer ER-luminalen Domäne, einer Transmembranhelix und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne am C-Terminus des Proteins (Ortmann *et al.*, 1997; Sadasivan *et al.*, 1996). Die Bindungsstelle zu TAP befindet sich im Bereich der letzten 33 Aminosäuren am C-Terminus. Für die Interaktion mit den MHC-Klasse-I-Molekülen ist die ER-luminale Domäne von Tapasin verantwortlich (Antoniou *et al.*, 2003a; Lehner *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2002; Turnquist *et al.*, 2002c). Tapasin bindet an die N-terminalen Bereiche von TAP-TMD (Koch *et al.*, 2004).

Das Ca^{2+} -bindende, ER-ständige Transmembranprotein Calnexin bindet und stabilisiert die naszierende schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls (Vassilakos *et al.*, 1996). Die thiolabhängige Reduktase ERp57 bindet ebenfalls an den Komplex aus schwerer Kette und dem Chaperon Calnexin und unterstützt die Bildung der korrekten Disulfidbrücken. ERp57 bildet selber Disulfidbrücken mit Tapasin, was möglicherweise von Bedeutung für die Peptidbeladung ist (Hughes & Cresswell, 1998; Lindquist *et al.*, 1998; Morrice & Powis, 1998). Anschließend wird Calnexin durch das Chaperon Calreticulin ausgetauscht und β_2 -Mikroglobulin gebunden (Sadasivan *et al.*, 1996). Schließlich bildet sich der Beladungskomplex, der die effiziente Peptid-MHC-Klasse-I-Assemblierung ermöglicht. Diese makromolekulare Struktur besteht aus vier MHC-Klasse-I-Molekülen, die wahrscheinlich über vier Tapasinproteine mit einem Molekül TAP komplexiert sind. Zusätzlich wurden Calreticulin und ERp57 in einem nicht stöchiometrischen Verhältnis im Beladungskomplex gefunden (Ortmann *et al.*, 1997; Hughes & Cresswell, 1998; Cresswell *et al.*, 1999). Der direkte physische Kontakt erleichtert die Übergabe des transportierten Peptids vom TAP-Komplex zum MHC-Klasse-I-Protein.

Nachdem MHC mit dem hochaffinen Peptid beladen ist, zerfällt der ternäre Komplex und die beladenen MHC-Klasse-I-Moleküle werden über das Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche transportiert (Suh *et al.*, 1996; Knittler *et al.*, 1999). Von 500 –

2000 in der Zelle generierten Peptiden wird im Durchschnitt nur ein einziges über MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert (Princiotta *et al.*, 2003). Die generierten Peptide können innerhalb der Zelle nachfolgend auf vielfältige Weise degradiert werden (Übersicht s. in Yewdell *et al.*, 2003c). So werden viele der Peptide zum Beispiel im Zytoplasma und ER-Lumen durch Aminopeptidasen N-terminal verkürzt (Brooks *et al.*, 2000).

1.2 Membrantransport durch ABC-Transporter

Transportvorgänge an Membranen zählen zu den elementarsten Vorgängen lebender Organismen. Nur sie erlauben es Zellen über ihre Plasmamembran mit der Umwelt in Kontakt zu treten. Die Kompartimentierung eukaryotischer Zellen erfordert zusätzlich Transportprozesse über die intrazellulären Organellmembranen. Lediglich kleine hydrophobe Moleküle und Wasser können die Phospholipidmembranen ungehindert durchdringen. Ionen und die meisten polaren Substanzen dagegen sind auf die Hilfe spezieller Transportproteine angewiesen. Solche Proteine ermöglichen die selektive Aufnahme von Nährstoffen in die Zelle, den Erhalt von Ionengradienten, die Ausschleusung von Toxinen und Signalstoffen, die interzelluläre Verteilung von Proteinen und vieles mehr. Bei Transportvorgängen wird zwischen passivem und aktivem Transport unterschieden.

Passiver Transport verläuft entlang eines Konzentrationsgradienten und erfordert nur die spezifische Erhöhung der Membranpermeabilität für den zu transportierenden Stoff. So bildet z.B. das Antibiotikum Gramicidin A eine Membranpore, die Protonen und Alkaliionen aber keine Ca^{2+} -Ionen passieren lässt (Weinstein *et al.*, 1979; Anderson, 1984). Das *Carrier*-Molekül Valinomycin dagegen bildet mit K^+ -Ionen einen membrangängigen Komplex und ermöglicht so die K^+ -Diffusion durch Membranen (Krasne *et al.*, 1971).

Im Gegensatz zum passiven Transport wird beim aktiven Transport gegen ein Konzentrationsgefälle transportiert. Die dafür notwendige Energie kann aus unterschiedlichen Quellen stammen. So wird die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin durch die Absorption von Lichtquanten getrieben (Stoeckenius, 1976). Der Komplex I (NADH-Coenzym-Q-Reduktase) aus der oxidativen Phosphorylierungskaskade erzeugt einen Protonengradienten mit Hilfe der Energie, die bei der Oxidation von NADH (Nikotinamidadenindinukleotid) frei wird (Hatefi, 1985). Solche Konzentrationsgradienten werden wiederum verwendet, um andere Verbindungen aktiv

zu transportieren. Die Laktosepermease von *Escherichia coli* (*E. coli*) transportiert gleichzeitig ein Proton und ein Laktosemolekül in die Zelle. Der Protonenfluss entlang des Protonengradienten energetisiert hierbei den Laktosetransport (Wright *et al.*, 1986). Neben diesem Symportmechanismus, bei dem verschiedene Molekülsorten in die gleiche Richtung transportiert werden, sind auch Antiporter bekannt. So wird der Ca^{2+} -Export mit Hilfe des Na^+ - Ca^{2+} -Antiporters durch den Einstrom von Na^+ -Ionen angetrieben (Carafoli, 1987).

Häufig wird die Energie allerdings durch die Hydrolyse von ATP bereitgestellt. Das am gründlichsten untersuchte Beispiel hierfür stellt die Na^+ - K^+ -ATPase der Plasmamembran dar, die unter Hydrolyse von einem ATP-Molekül drei Na^+ -Ionen in die Zelle hinein- und zwei K^+ -Ionen hinaus transportiert (Cantley *et al.*, 1983). Nach einem vergleichbaren Mechanismus werden die so genannten ABC-Transporter angetrieben, zu denen auch der Antigenpeptid-Transporter TAP gehört.

Bei der Proteinsuperfamilie der ABC-Transporter handelt es sich um eine weit verbreitete Proteingruppe. Innerhalb allen Lebensformen, vom Bakterium bis zum Menschen, übernimmt diese Molekülfamilie den Transport eines weiten Substratspektrums über Zell- und Organellmembranen. Etwa 2 % der Gene von *E. coli* kodieren für ABC-Transporter, 28 ABC-Transporter wurden im Hefegenom gefunden und das menschliche Genom verfügt über 48 Gene, die für ABC-Transporter kodieren (Higgins, 1992; Holland & Blight, 1999). Das Aufgabenfeld der ABC-Transporter ist sehr weit. Die ABC-Transporter von *E. coli* GlnHPQ (Nohno *et al.*, 1986) oder MalFGK/E (Gilson *et al.*, 1982; Froshauer & Beckwith, 1984; Dassa & Hofnung, 1985) dienen der Aufnahme von Nährstoffen wie Glutamin oder Maltose. Andere ABC-Transporter vermitteln den Ex- und Import von Proteinen. Hämolysin B exportiert z.B. das 107 kDa Toxin α -Hämolysin über die Plasma- und Außenmembran von *E. coli* (Felmlee *et al.*, 1985). Zahlreiche weitere Vertreter dieser Proteinfamilie sind von klinischem Interesse. So sind ABC-Transporter für viele Pharmakaresistenzen verantwortlich. Die Erythromycin-Resistenz von *Staphylococcus* lässt sich auf die Wirkung des ABC-Proteins MsrA zurückführen, das das Antibiotikum aus dem Bakterium transportiert (Ross *et al.*, 1990). Der ABC-Transporter MDR1 (*multidrug resistance protein 1*) erzeugt durch seine Überexpression in Tumorzellen eine Resistenz gegen Zytostatika, indem es die intrazelluläre Konzentration der Medikamente durch Export herabsetzt (Endicott & Ling, 1989; Gottesman & Pastan, 1993). Die Adrenoleukodystrophie, hervorgerufen durch eine unzureichende β -Oxidation langer

Fettsäureketten in den Peroxisomen, wird auf die Mutationen im Gen für das Adrenoleukodystrophieprotein ALDP zurückgeführt (Kamijo *et al.*, 1990). Defekte im Chloridkanal *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) führen zur Mukoviszidose, der häufigsten tödlichen Erbkrankheit in Europa und den USA, bei der es aufgrund eines gestörten Wasserhaushalts der Epithelzellschicht in den Lungen der Patienten zu einer erhöhten Viskosität des Sekrets der mukösen Drüsen kommt (Collins, 1992). Veränderungen in der Nukleotidbindungsdomäne des Sulfonylharnstoff-Rezeptors SUR1 rufen das Krankheitsbild der *persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy* (PHHI) hervor, bei der es zu einer erhöhten Insulinsekretion kommt (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1995). Der in der ER-Membran lokalisierte Antigenpeptid-Transporter TAP ist schließlich entscheidend an der Immunabwehr von Tumorzellen und intrazellulären Pathogenen wie z.B. Viren beteiligt (Abele & Tampé, 1999).

Alle ABC-Transporter haben einen ähnlichen Aufbau aus mindestens vier Domänen. Zwei Domänen bilden den hydrophoben Transmembranbereich, zwei weitere sind auf der zytosolischen Membranseite lokalisiert und formen die Nukleotidbindungsdomänen, die für die Energetisierung der ABC-Transporter verantwortlich sind (Abb. 2). Während die Transmembrandomänen innerhalb der ABC-Transporterfamilie nur geringe Sequenzhomologie aufweisen, zeigen die Nukleotidbindungsdomänen eine Sequenzidentität von ca. 30 %. In jeder Nukleotidbindungsdomäne liegen die für ABC-Transporter charakteristischen hochkonservierten Walker A und Walker B Motive. Zusätzlich sind ABC-Transporter durch den so genannten *C-loop* gekennzeichnet, der 20-30 Aminosäuren N-terminal von der Walker B Region lokalisiert ist (Higgins, 1992). Das Walker A Motiv hat eine Konsensussequenz GXXXXGKS/T, während das Walker B Motiv aus vier hydrophoben Aminosäuren und einem Aspartat- oder Glutamatrest besteht (Walker *et al.*, 1982). Basierend auf Röntgenstrukturanalysen von ATPasen, die ebenfalls Walker A und B Motive enthalten, wie Ras p21 (Egner *et al.*, 1987), der F1F0-ATPase (Abrahams *et al.*, 1994) oder dem Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) (Berchtold *et al.*, 1993) sowie aufgrund der kürzlich gelösten Strukturen der Nukleotidbindungsdomäne einiger ABC-Transporter (Hung *et al.*, 1998; Diederichs *et al.*, 2000; Karpowich *et al.*, 2001; Gaudet & Wiley, 2001; Schmitt *et al.* 2003) wird angenommen, dass das Lysin in der Walker A Region eine Salzbrücke zu der γ -Phosphatgruppe des gebundenen ATP bildet. Die Walker B Region koordiniert das Mg^{2+} -Ion des Mg^{2+} -ATP-Komplexes

(Boos & Welte, 2000; Jones & George, 2002). Der *C-loop* mit der Konsensussequenz LSGGQ kommt ausschließlich in ABC-Transportern und G-Proteinen vor (Lambright *et al.*, 1994; Manavalan *et al.*, 1995).

Neulich publizierte Strukturen der ABC-Transporter deuten daraufhin, dass diese Region mit dem aus den zwei α -Helices bestehenden *L-loop* (ähnlich der EAA-Region bei den bakteriellen ABC-Transporter, deren Bedeutung durch Mutationsstudien gezeigt wurde) kommuniziert und auf diese Weise Informationen von der Nukleotidbindungs- an die Substratbindungsstelle weiterleiten (Dassa, 1990; Cotten *et al.*, 1996; Mourez *et al.* 1997, Locher *et al.* 2002).

Eine Reihe von kürzlich erschienenen Publikationen zeigt, dass monomere NBD von ABC-Transportern in Anwesenheit von ATP miteinander interagieren (Chen *et al.*, 2003a; Fetsch & Davidson, 2002; Horn *et al.*, 2003; Janas *et al.*, 2003; Loo *et al.*, 2002; Moody *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002). Zwei ATP-Moleküle werden sowohl durch die Walker A und B Regionen, als auch durch den *C-loop* beider NBD koordiniert. Außerdem legt der Vergleich verschiedener Kristallstrukturen der NBD die Vermutung nahe, dass der *Q-loop* eine Wasserstoffbrücke zum γ -Phosphat des ATP-Moleküls ausbildet (Chen *et al.*, 2003a; Hung *et al.*, 1998; Karpowich *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002). Die Nukleotidbindung und ATP-Hydrolyse soll durch den C-terminalen Bereich der jeweils anderen NBD beeinflusst sein (Bouabe & Knittler, 2003).

Im Gegensatz zu den Nukleotidbindungsdomänen sind die Transmembrandomänen kaum konserviert. Trotz der geringen Sequenzhomologie wird eine ähnliche Faltung angenommen. Für CFTR und MDR1 wurde experimentell nachgewiesen, dass jede Transmembrandomäne aus sechs Transmembranhelices besteht (Wang *et al.*, 1991; Ames & Lecar, 1992; Gentshev & Goebel, 1992; Gottesman & Pastan, 1993; Loo & Clarke, 1993a; Loo & Clarke, 1993b). Basierend auf Hydrophobizitätsanalysen werden für MalF, die ABC-Komponente des *E. coli* Maltosetransporters, acht Transmembranhelices vorhergesagt (Froshauer *et al.*, 1988), während die Transmembrandomänen des Antigenpeptid-Transporters TAP die Membran jeweils sieben- bis zehnmal durchspannen (Gileadi & Higgins, 1997; Tampé *et al.*, 1997; Vos *et al.*, 1999) (Abb. 4). Photoquervernetzungsstudien haben gezeigt, dass sowohl bei MDR1 (Greenberger, 1993; Morris *et al.*, 1994) als auch beim Antigenpeptid-Transporter TAP beide Transmembrandomänen (Nijenhuis & Hämmerling, 1996; Nijenhuis *et al.*, 1996) gemeinsam die Substratbindungsstelle bilden.

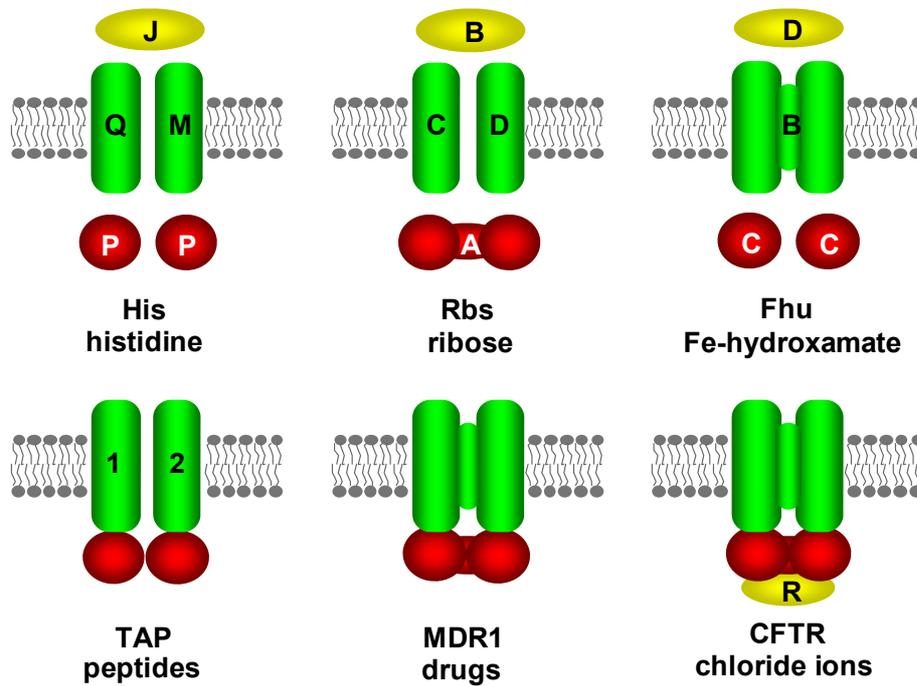


Abb.2 Struktur von ABC-Transportern. ABC-Transporter bestehen aus zwei Transmembrandomänen (grün), die die Membran mit fünf bis zehn α -Helices durchspannen und zwei hydrophilen, zytosolischen Domänen (rot) in denen die hochkonservierten ATP-Bindungsregionen liegen. Die Verknüpfung der vier Domänen kann auf verschiedene Weise stattfinden. Prokaryonten synthetisieren vorwiegend alle Untereinheiten als getrennte Polypeptidketten, die miteinander zum funktionalen Transportkomplex assemblieren (Doige & Ames, 1993). Eukaryonten dagegen exprimieren häufig die einzelnen Domänen auf einem oder zwei Polypeptidsträngen. Der Antigenpeptid-Transportkomplex TAP baut sich z.B. aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2 auf, die jeweils aus einer Transmembrandomäne und einer Nukleotidbindungsdomäne bestehen (Spies *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 1992), während beim Multidrogenresistenzprotein MDR1 alle Domänen auf einer einzigen Polypeptidkette liegen. Zusätzlich zu den vier Domänen können weitere vorhanden sein. So findet man beispielsweise beim CFTR-Protein eine fünfte regulatorische Domäne R (Cheng *et al.*, 1991) und bei den bakteriellen Importern, wie zum Beispiel Maltosetransporter MalFGK/E ein zusätzliches periplasmatisches Bindungsprotein E (Reidl *et al.*, 1989).

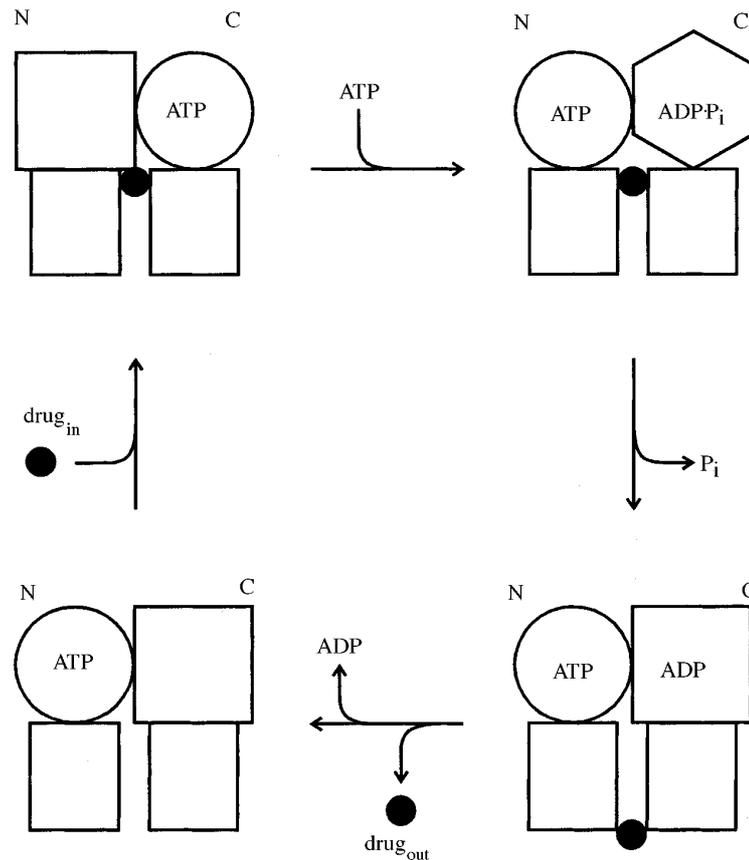


Abb. 3 Modell für den Transportzyklus von MDR1. Die Rechtecke repräsentieren die Transmembrandomänen, während die offenen Kreise, Quadrate und das Sechseck verschiedenen Konformationen der Nukleotidbindungsdomänen entsprechen. Der geschlossene Kreis stellt das Substrat dar. Die beiden Nukleotidbindungsdomänen wurden entsprechend ihrer relativen Lage zum N- bzw. C-Terminus mit N oder C bezeichnet (aus Senior & Gadsby, 1997). Im nächsten Transportzyklus tauschen die beiden Nukleotidbindungsdomänen ihre Rollen und die ATP-Hydrolyse findet in der N-Nukleotidbindungsdomäne statt.

Für MDR1, einem engen Verwandten des Antigenpeptid-Transporters TAP, wird folgender Mechanismus angenommen (Abb. 3). Zu Beginn des Zyklus ist ATP z.B. an der C-terminalen Nukleotidbindungsdomäne (C-Nukleotidbindungsdomäne) gebunden. Zusätzlich bindet das zu transportierende Substrat an die Substratbindungsstelle. Die Bindung eines zweiten ATP-Moleküls an die N-terminale Nukleotidbindungsstelle (N-Nukleotidbindungsdomäne) induziert die ATP-Hydrolyse in der C-Nukleotidbindungsdomäne. Mit Hilfe der freiwerdenden Energie wird die C-Nukleotidbindungsdomäne in eine energiereiche Konformation überführt. Im Gegensatz zu den P-Typ-ATPasen wie z.B. der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase werden die ABC-Transporter

hierbei nicht kovalent phosphoryliert. Gleichzeitig nimmt die N-Nukleotidbindungsdomäne eine Struktur an, die die ATP-Hydrolyse verhindert. Bei der Relaxation der C-Domäne wird das Substrat von der hochaffinen zytosolischen Substratbindungsstelle zur niederaffinen extrazellulären Bindungsstelle bewegt und das anorganische Phosphat verlässt die C-Nukleotidbindungsdomäne. Nachdem das Substrat und das ADP von MDR1 dissoziiert sind, kehrt der Transporter durch die Bindung eines neuen Substratmoleküls in seinen Ausgangszustand zurück und der Zyklus kann erneut durchlaufen werden. Im zweiten Transportzyklus haben die beiden Nukleotidbindungsdomänen allerdings ihre Rollen vertauscht und die ATP-Hydrolyse findet jetzt in der N-Nukleotidbindungsdomäne statt (Senior & Gadsby, 1997).

1.3 Antigenpeptid-Transporter TAP

Aufgrund der Zugehörigkeit des TAP-Komplexes zur Proteinfamilie der ABC-Transporter und der Kodierung beider Untereinheiten TAP1 und TAP2 im MHC-Klasse-II-Genlocus wurde schon unmittelbar nach seiner Sequenzierung spekuliert, ob diese Proteine die für die Assemblierung der MHC-Klasse-I benötigten Peptide in das ER transportieren (Townsend & Bodmer, 1989; Deverson *et al.*, 1990; Monaco *et al.*, 1990; Spies *et al.*, 1990; Trowsdale *et al.*, 1990). Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung gestützt, dass sich auf der Oberfläche von TAP-Defektzelllinien instabile, also "leere" MHC-Klasse-I-Komplexe befinden (Townsend & Bodmer, 1989; Ljunggren *et al.*, 1990; Townsend *et al.*, 1990), während Zellen, die mit den fehlenden TAP-Genen transfiziert wurden, Oberflächenexpression von peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Komplexen zeigen (Powis *et al.*, 1991; Attaya *et al.*, 1992). Mit Hilfe der im ER-Lumen lokalisierten Glykosylierungsmaschinerie konnte schließlich direkt bewiesen werden, dass Peptide TAP- und ATP-abhängig in das ER transportiert werden. So wurden TAP-exprimierende und TAP-defiziente Zellen mit Streptolysin-O, einem bakteriellen Toxin, das in der Plasmamembran von Eukaryonten Poren bildet, permeabilisiert und in An- und Abwesenheit von ATP mit radioaktiv markierten Peptiden inkubiert, die eine N-Glykosylierungskonsensussequenz (NXS/T) trugen. Glykosylierte und folglich in das ER transportierte Peptide wurden nach der Lyse der Zellen mit Hilfe Zucker-bindender Concanavalin A-Sepharose isoliert und über Radioaktivitätsmessung quantifiziert (Neeffjes *et al.*, 1993; Androlewicz & Cresswell, 1994). Analoge Experimente mit TAP-haltigen und TAP-freien Mikrosomen führten zu gleichen Ergebnissen (Meyer *et al.*, 1994). Einen weiteren Beweis für die Funktion des

TAP-Komplexes lieferte die ATP- und TAP-abhängige Beladung von ER-ständigen MHC-Klasse-I-Molekülen mit radioaktiv markierten Peptiden (Androlewicz *et al.*, 1993; Shepherd *et al.*, 1993). Zusätzlich wurde gezeigt, dass nur in Anwesenheit des TAP-Komplexes und ATP Peptid-bindende Proteine im ER mit photoreaktiven Peptiden markiert werden können (Lammert *et al.*, 1997; (Marusina *et al.*, 1997; Spee & Neefjes, 1997). Diese indirekten Methoden zum Nachweis des Peptidtransports in das ER waren notwendig, da neben dem Transportsystem TAP ein zusätzliches, Peptidexportsystem existiert, das die Peptidakkumulation im ER verhindert (Roelse *et al.*, 1994; Koopmann *et al.*, 2000). Weitere 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 (Meyer, 1996). Durch die Verwendung von nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga wie AMP-PNP oder AMP-PCP wurde sichergestellt, dass nicht die ATP-Bindung, sondern die ATP-Hydrolyse für die Transportaktivität des TAP-Komplexes verantwortlich ist (Neefjes *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1994). Neben der Hydrolyse von ATP ist auch die folgende Dissoziation des TAP-ADP-Phosphat-Komplexes entscheidend. So blockiert das zum Phosphation strukturanaloge Vanadat die Funktion von TAP, indem es durch seine hohe Affinität zur Phosphatbindungsstelle die Dissoziation dieses Komplexes verhindert (Meyer, 1996). Die Beteiligung weiterer Proteine an der TAP-abhängigen Peptidtranslokation ist unwahrscheinlich, wie die funktionale, heterologe Expression von humanem Antigenpeptid-Transporter TAP in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Insektenzellen (Meyer *et al.*, 1994) und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Urlinger *et al.*, 1997) zeigt, denen die Faktoren eines hochentwickelten Vertebraten-Immunsystems fehlen. Die Anwesenheit beider Untereinheiten TAP1 (748 AS, berechnet 81 kDa) und TAP2 (686, berechnet 75 kDa) ist dagegen für die Funktion des TAP-Komplexes essentiell (Kelly *et al.*, 1992; Spies *et al.*, 1992; Neefjes *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1994). Zwischen TAP1 und TAP2 wurde eine Sequenzidentität von 60 % für die Nukleotidbindungsdomänen gefunden, während die Transmembrandomänen nur eine Identität von 30 % aufweisen. Hydrophobizitätsberechnungen ergaben sechs bis zehn Transmembranhelices für TAP1 und TAP2 (Momburg *et al.*, 1996; Nijenhuis & Hämmerling, 1996; Elliott, 1997; Tampé *et al.*, 1997) (Abb. 4). Zum eigentlichen Kern der Transmembrandomäne (*core domain*) werden allerdings nur die jeweils sechs C-terminalen Transmembranhelices (TM 5-10 bei TAP1 und TM 4-9 bei TAP2) gerechnet, da die übrigen Transmembranbereiche keine Homologie zu anderen ABC-

Transportern (mit Ausnahme von so genanntem TAP-like Transporter ABCB9 (Zhang *et al.*, 2000)) aufweisen. Die N-terminale Domäne der TMD von TAP1 und TAP2 sind nicht notwendig für den Peptidtransport (Koch *et al.*, 2004).

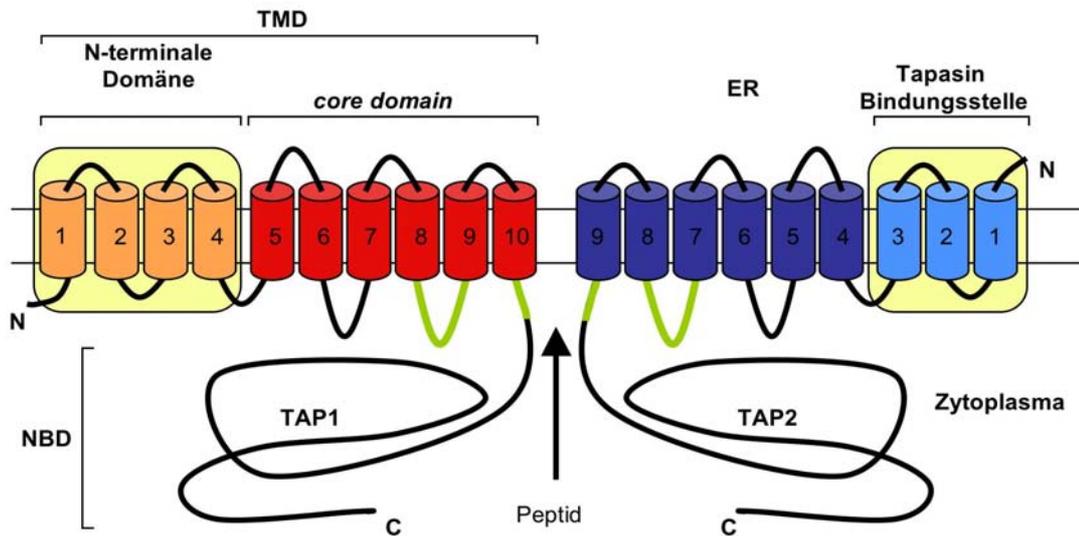


Abb. 4 Membrantopologie des TAP-Komplexes. Die Transmembranhelices (TM), die auch in anderen ABC-Transportern gefunden worden sind (*core domains*), sind als Zylinder dargestellt (rot bei TAP1 und blau bei TAP2). Transmembrandomänen, die ausschließlich für TAP1 bzw. TAP2 vorhergesagt werden, sind durch orange Zylinder bei TAP1 und hellblaue Zylinder bei TAP2 repräsentiert. Diese N-terminalen Bereiche sind für die Bindung von Tapasin verantwortlich. Bereiche, die an der Peptidbindung beteiligt sind, sind durch grüne Linien hervorgehoben (modifiziert aus (Koch *et al.*, 2004)).

Die dreidimensionale Kristallstruktur von hTAP1-NBD konnte vor kurzem aufgeklärt werden (Gaudet & Wiley, 2001). Wie die NBD von bakteriellen ABC-Transportern (Hung *et al.*, 1998; Diederichs *et al.*, 2000; Karpowich *et al.*, 2001; Gaudet & Wiley, 2001; Schmitt *et al.* 2003) bildet die NBD von TAP1 die Form eines „L“. Dabei trägt der längere Arm die Bezeichnung *arm I* und der kürzere Arm – *arm II*. Im *arm I* sind die Walker A und Walker B Motive lokalisiert, welche für die Bindung und Hydrolyse von ATP essentiell sind (Walker *et al.*, 1982). Der längere Arm enthält noch die so genannten *D-loop* und *H-loop*, *arm II* enthält dagegen die *C-loop* und *Q-loop* (Hung *et al.*, 1998; Diederichs *et al.*, 2000; Hopfner *et al.*, 2000; Gaudet & Wiley, 2001; Schmitt & Tampé, 2002; Yuan *et al.*, 2001; Schmitt *et al.* 2003).

Die Peptidbindungstasche wird von TAP1 und TAP2 gemeinsam gebildet und beide Untereinheiten des TAP-Komplexes werden für die Peptidbindung benötigt. (Nijenhuis & Hämmerling, 1996; Nijenhuis *et al.*, 1996). Durch Experimente mit

photoreaktiven radioaktiv markierten Peptiden konnten einige diskrete Regionen innerhalb der Transmembrandomänen von TAP1 und TAP2 eingegrenzt werden, die an der Peptidbindung beteiligt sind. Nach der partiellen Spaltung des TAP-Komplexes ließen sich die markierten TAP-Fragmente mit Hilfe von regiospezifischen Antikörpern identifizieren. Demnach sind neben den zum Zytosol orientierten, C-terminalen Schleifen von TAP1 und TAP2 die TM5 und TM6 von TAP1 sowie die TM4, TM5 und TM6 von TAP2 an der Peptidbindung beteiligt (Abb. 4). Über den Transportmechanismus des TAP-Komplexes oder über potentielle Intermediate innerhalb des Transportzyklusses ist sehr wenig bekannt. Untersuchungen des TAP-Komplexes bei verschiedenen Temperaturen zeigten, dass der Transportprozess unterhalb 15°C auf der Stufe der Peptidbindung quasi eingefroren werden kann. Die Peptidbindung ist im Gegensatz zum Peptidtransport ATP-unabhängig. So konnte sowohl die ATP-unabhängige kovalente Markierung des TAP-Komplexes mit photoreaktiven Peptiden (Androlewicz & Cresswell, 1994; Nijenhuis *et al.*, 1996) als auch die spezifische Peptidassoziation an TAP-haltige Mikrosomen nachgewiesen werden (van Endert *et al.*, 1994; Uebel *et al.*, 1995). Deswegen wird von einem Minimalmodell für den TAP-vermittelten Peptidtransport ausgegangen. Demzufolge setzt sich der Peptidtransport aus einem ATP-unabhängigen Peptidbindungsschritt und einem ATP-abhängigen Peptidtranslokationsschritt zusammen (Abb. 5). Durchgeführte thermodynamische und kinetische Studien zeigten zusätzlich eine langsame Isomerisierung des TAP-Komplexes nach der Peptidbindung (Neumann & Tampé, 1999). Bei diesem peptidinduzierten Konformationswechsel handelt es sich um eine drastische Reorganisation der TAP-Struktur (Neumann *et al.*, 2002). Noch eindeutiger dokumentierte die ungewöhnlich große Wärmekapazitätsänderung während der Assoziation des Peptid-TAP-Komplexes den weitreichenden Konformationswechsel. Die Analyse der Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten zeigte, dass diese Umstrukturierung nicht für die hohe Substrataffinität erforderlich ist. Deswegen wird spekuliert, dass der Konformationswechsel die Peptidbeladung signalisiert, die strukturellen Voraussetzungen für die ATP-Hydrolyse schafft und auf diese Weise als „molekularer Schalter“ fungiert. (Neumann & Tampé, 1999). Darüber hinaus, wie die Studien an GFP-markiertem Protein belegen, beeinflusst diese Konformationsänderung die laterale Mobilität des TAP-Komplexes (Reits *et al.*, 2000). Vergleichbare Zweistufenprozesse wurden bereits für zahlreiche Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen gefunden (z.B. für den muskarinischen Acetylcholinrezeptor und den Toxin der grünen

Mamba (Toomela *et al.*, 1994), Lysozym und N-Acetylglucosamin (Holler *et al.*, 1969)).

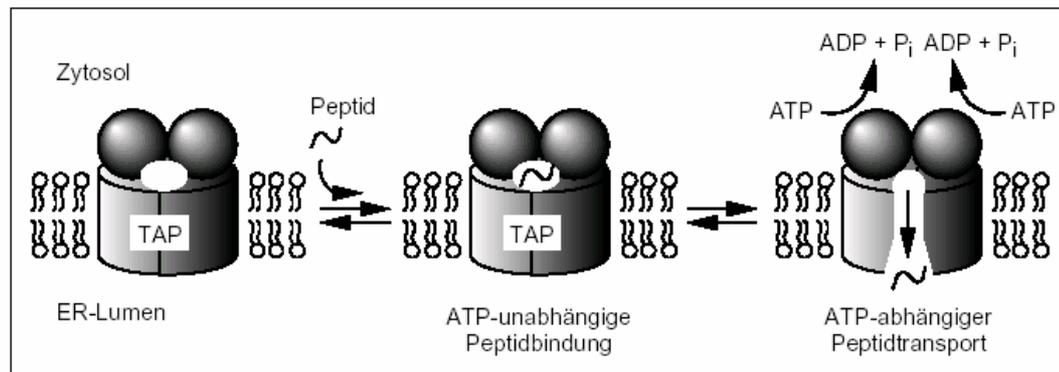


Abb. 5 Minimalmodell für den TAP-vermittelten Peptidtransport. Der TAP-vermittelte Peptidtransport besteht aus einem ATP-unabhängigen Peptidbindungsschritt, der sich aus der schnellen Assoziation und einer langsamen Isomerisierung zusammensetzt, und einem ATP-abhängigen Peptidtranslokationsschritt, der in ATP-Hydrolyse und Substratübertragung aufgeteilt werden kann. Die Kugeln deuten die Nukleotidbindungsdomänen an, während der Zylinder die Transmembrandomänen repräsentiert (aus Neumann, 2000).

Eine auffällige Eigenschaft des TAP-Komplexes ist die große Zahl verschiedener Peptide, die transportiert werden können (Uebel *et al.*, 1997a). Dies ist entscheidend, um das Repertoire der präsentierten Antigene nicht durch die Antigenprozessierung zu limitieren (Uebel & Tampé, 1999). Der Antigenpeptid-Transporter transportiert Peptide mit einem Längenoptimum zwischen acht und zwölf Aminosäuren (Koopmann *et al.*, 1996), während Peptide mit acht bis sechzehn Aminosäuren bevorzugt gebunden werden (van Endert *et al.*, 1994). Eine ähnliche Längenverteilung (8-10 AS) zeigen die Peptide, die von MHC-Klasse-I-Molekülen gebunden werden (Falk *et al.*, 1990; Engelhard, 1994; Rammensee, 1995). Außerdem haben Untersuchungen mit kombinatorischen Peptidbibliotheken ergeben, dass lediglich die Aminosäuren an den ersten drei N-terminalen und an der C-terminalen Position die Bindungsaffinität beeinflussen (Uebel *et al.*, 1997a). Die Seitenreste an den übrigen Positionen haben nur einen geringen Einfluss auf die Substraterkennung. An den Positionen 1 und 2 werden basische Aminosäuren bevorzugt, während aromatische Aminosäuren an Position 3 die Affinität zum TAP-Komplex erhöhen. Saure Reste an den Positionen 1 oder 3 und besonders ein Prolinrest an Position 2 reduzieren die Bindungsaffinität (Abb. 6). Am C-Terminus werden aromatische und basische Aminosäuren bevorzugt (Uebel *et al.*, 1997a; Uebel & Tampé, 1999). Der Einfluss des Peptidrückgrats wurde mit Hilfe von

Peptidbibliotheken untersucht, die D-Aminosäuren enthielten. Demzufolge reduzieren D-Aminosäuren die Bindungsaffinität ausschließlich, wenn sie an den ersten drei N-terminalen bzw. der C-terminalen Position eingebaut werden (Uebel *et al.*, 1997a). Zusätzlich zeigt sich, dass ein freier N- und C-Terminus strikte Voraussetzung für die Substraterkennung durch den TAP-Komplex darstellt (Momburg *et al.*, 1994; Schumacher *et al.*, 1994). Aufgrund der vorliegenden Daten wird davon ausgegangen, dass der TAP-Komplex Peptide hauptsächlich über das Peptidrückgrat der ersten drei N-terminalen Aminosäuren sowie der C-terminalen Aminosäure und die Amino- bzw. Carboxylgruppe der Termini bindet. Für die Aminosäuren zwischen den ersten drei und der letzten Position wurden kaum sterische Restriktionen gefunden. Dies wird zusätzlich dadurch unterstrichen, dass der TAP-Komplex sogar verzweigte Peptide mit einer Seitenkettenlänge bis zu 20 Aminosäuren bindet (Grommé *et al.*, 1997). Auch Peptide mit artifiziellen räumlich anspruchsvollen Seitenketten wie Fluorophoren (Uebel *et al.*, 1995; Blevitt *et al.*, 1999) oder Goldcluster mit einem Durchmesser von 1,4 nm (Neumann & Tampé, *unveröffentlichte Daten*) werden vom Antigenpeptidkomplex als Substrat erkannt.

In der letzten Zeit werden auch immer mehr Arbeiten der Frage gewidmet, wie die verschiedenen Domänen von TAP1 und TAP2 an dem Transportvorgang beteiligt sind. So wurden einzelne Domänen untereinander ausgetauscht (Arora *et al.*, 2001; Daumke & Knittler, 2001b) und an der ATP-Bindung bzw. ATP-Hydrolyse beteiligte Aminosäuren mutiert (Hewitt & Lehner, 2003a; Karttunen *et al.*, 2001; Knittler *et al.*, 1999; Saveanu *et al.*, 2001).

Für die Peptidbindung ist die TMD sowohl von TAP1 als auch von TAP2 notwendig (Arora *et al.*, 2001). Trotzdem wurde auch berichtet, dass Chimärkomplexe aus zwei TAP1-TMD oder zwei TAP2-TMD zu einer reduzierten Peptidbindung fähig sind (Daumke & Knittler, 2001b). Funktionalität beider NBD ist jedoch für die ATPase-Aktivität und somit für den gesamten Transportvorgang von TAP erforderlich (Chen *et al.*, 2003).

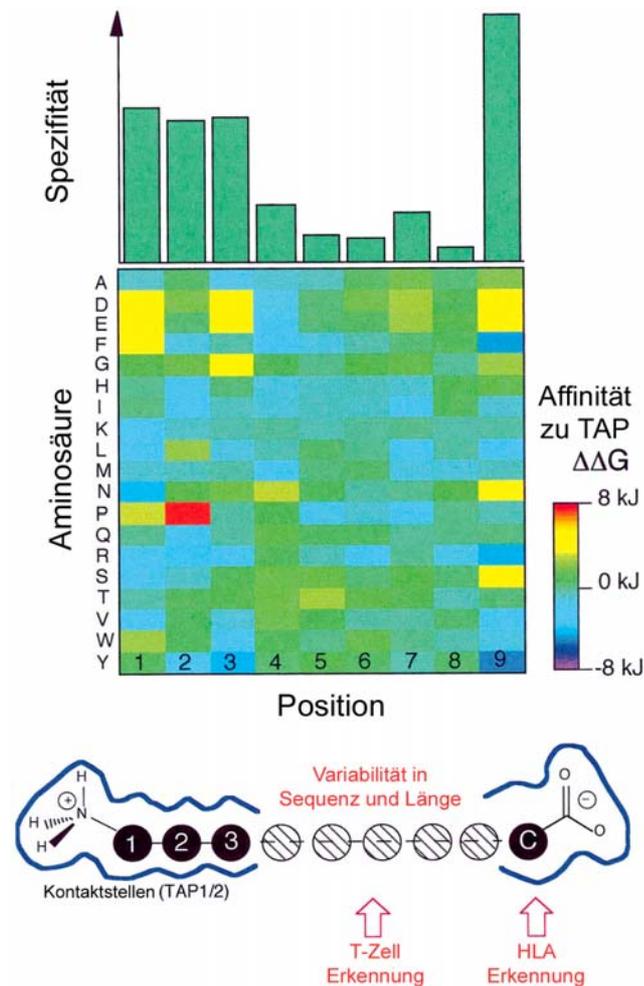


Abb. 6 Peptidspezifität des Antigenpeptid-Transporters. *Oben:* Substratspezifität von TAP. Die ersten drei N-terminalen Aminosäuren und die letzte C-terminale Aminosäure sind für die Stabilisierung der Peptidbindung an TAP verantwortlich. *Mitte:* Die für die Bindung günstigen Aminosäuren an bestimmten Positionen werden blau dargestellt (negative $\Delta\Delta G$), die für die Bindung ungünstigen Aminosäuren an bestimmten Positionen werden gelb oder rot dargestellt (positive $\Delta\Delta G$). Zum Beispiel für die ersten drei Positionen werden K, N oder R bevorzugt. D, E oder F in dieser Positionen, dagegen, vermindern die Peptidbindung an TAP. *Unten:* schematisches Modell der Substratbindungstasche von TAP (nach Lankat-Buttgereit & Tampé, 2002)

1.4 Virale Inhibition des TAP-Komplexes

Der durch MHC-Klasse-I-Moleküle vermittelte Zweig des Immunsystems ist eine sehr effiziente Waffe gegen intrazelluläre Pathogene wie z.B. Viren. So ist es nicht überraschend, dass Viren im Laufe der Evolution Strategien entwickelt haben, dieser Immunüberwachung zu entgehen. Während kleinere Viren, die nur eine geringe Zahl von Genen in ihrem Kapsid transportieren, ihre Immunerkennung hauptsächlich durch

eine hohe Mutationsrate erschweren, exprimieren größere Viren Proteine, die direkt mit einzelnen Komponenten des Immunsystems interagieren und deren Funktion modulieren. Zahlreiche Viren kodieren für Proteine, die mit der Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I Moleküle interagieren. So bindet das vom Adenovirus E3 kodierte 19 kDa Protein E3/19K an MHC-Klasse-I Moleküle und verhindert ihre Präsentation auf der Zelloberfläche (Andersson *et al.*, 1985; Burgert & Kvist, 1985).

Die Bindung der von dem humanpathogenen Zytomegalievirus (HCMV) kodierten Proteine US2 und US11 an die naszierende schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls führt zu ihrer Mislokation in das Zytosol. Das HCMV-Protein US3 und das Adenovirusprotein E3/19K binden MHC-Klasse-I-Moleküle und bewirken deren ER-Retention. Zusätzlich bindet E3/19K an Tapasin und verhindert die Assemblierung des Beladungskomplexes. Das HCMV-kodierte Protein UL18 wird in Assoziation mit der β_2 -m-Kette und einem Peptid auf die Zelloberfläche transportiert, um natürlichen Killerzellen eine MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression vorzutäuschen. Das Protein ICP47 des *Herpes Simplex* Viruses (HSV-1 und HSV-2) und das HCMV-Protein US6 inhibieren den Antigenpeptid-Transporter TAP. Es konnte gezeigt werden, dass ICP47 den TAP-vermittelten Peptidtransport in das ER von Streptolysin-O-permeabilisierten Zellen inhibiert, indem es direkt an den TAP-Komplex bindet (Früh *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 1995). *In vitro* Studien zeigten, dass ICP47 den Peptidbindungsschritt an den TAP-Komplex blockiert (Ahn *et al.*, 1996; Tomazin *et al.*, 1996). Die hohe Bindungsaffinität von ICP47 zum humanen TAP-Komplex, die um das zwei- bis fünffache höher liegt als die der transportierten Peptide, erklärt die effektive Blockierung der Antigenprozessierung in HSV-infizierten humanen Zellen. Neben dem HSV blockiert auch der HCMV den TAP-Komplex. Die Expression des 21 kDa ER-ständigen Transmembranglykoproteins US6 führt zu einer Reduktion der Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen und der Anhäufung von unbeladenen MHC-Klasse-I-Proteinen im ER und im *cis*-Golgiapparat. Koimmunopräzipitationsexperimente mit Antikörpern gegen US6 belegten, dass US6 an den Komplex aus TAP1, TAP2, Tapasin, der schweren Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls, β_2 -m und Calreticulin bindet. Vergleichbar zu ICP47 unterbricht US6 die Peptidversorgung der MHC-Klasse-I-Moleküle, indem es den TAP-vermittelten Peptidtransport in das ER inhibiert. Im Gegensatz zu ICP47 blockiert US6 allerdings nicht den Bindungsschritt des Antigenpeptids (Hengel *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 1997).

1.5 Motivation und Zielsetzung

Der TAP-Komplex spielt eine zentrale Rolle bei der MHC-Klasse-I-vermittelten Antigenpräsentation. Die im Zytosol durch Degradation endogener Proteine entstehenden Peptide werden von TAP auf die luminal Seite des endoplasmatischen Retikulums transportiert, wo sie auf die MHC-Klasse-I-Moleküle übertragen werden. Der Transportmechanismus des TAP-Komplexes kann in zwei grundlegende Schritte unterteilt werden: die ATP-unabhängige Peptidbindung und den ATP-abhängigen Peptidtransport. In der vorliegenden Dissertation sollte der energieliefernde Schritt des Transporterzyklus, die ATP-Hydrolyse, nachgewiesen und im Detail untersucht werden.

Es sollte eine Technik entwickelt werden, die die direkte Beobachtung der TAP-spezifischen ATP-Hydrolyse erlaubt. Hierfür war es zwingend, den aktiven TAP-Komplex zu isolieren und durch den Einbau in künstliche Lipidvesikel seine Funktion wiederherzustellen (Rekonstitution). Die anschließenden Untersuchungen am funktional rekonstituierten TAP-Komplex sollten folgende Fragen zum Transportmechanismus des Antigenpeptid-Transporters beantworten: 1) Welche molekularen Vorgänge liegen diesem Prozess zugrunde? 2) Welche Kinetik folgt die ATP-Spaltung? 3) Gibt es essentielle Zwischenstufen? 4) Mit welcher Stöchiometrie erfolgt die Peptidübertragung?

Virale TAP-Inhibitoren, wie ICP47 oder US6 sind Werkzeuge, mit deren Hilfe Einblicke in den Prozess der Antigenprozessierung erhalten werden können. Sie tragen auch dazu bei, unsere Kenntnis über die Funktionsweise von TAP zu erweitern. Während die molekularen Wirkprinzipien von ICP47 bereits untersucht sind, bleibt der Inhibitionsmechanismus von US6, einem Typ I Transmembranglykoprotein des humanpathogenen Zytomegalievirus (HCMV), weitgehend ungeklärt. Es sollten Techniken entwickelt werden, die es erlauben, die Wechselwirkung zwischen dem TAP-Komplex und US6 *in vitro* zu untersuchen, um dessen Einfluss auf verschiedene Aspekte der TAP-Aktivität – Peptidbindung, ATP-Hydrolyse und Peptidtransport zu analysieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

1,4-Dithio-DL-threitol	Sigma
Aceton	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (30/08)	National Diagnostics
Adenosindiphosphat	Sigma
Adenosintriphosphat	Sigma
AEBSF	Calbiochem
Ammoniumheptamolybdat	Merck
Aprotinin	Sigma
APS	Sigma
Apyrase (<i>Grade VI</i> , aus der Kartoffel)	Sigma
ATP-Agarose (A-2767)	Sigma
[γ ³² P]ATP	Amersham
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
Chloramin-T	Sigma
Concanavalin-A Sepharose	Sigma
Cyclohexan	Roth
D-[2- ³ H]Mannose	ICN
D-Sucrose	Merck
Decylmaltosid	Calbiochem
Digitonin	Calbiochem
Dowex 1X8	Sigma
ECL-Kit	Amersham Biosciences
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
FCS (<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum)	Boehringer

<i>Fiske-Subbarow reducer</i>	Sigma
Glycerol	Roth
HEPES	Merck
Isobutanol	Roth
Leupeptin	Sigma
L-Glutamin	Gibco
Magermilchpulver	Fluka
<i>Micro-BCA Protein Assay Reagent Kit</i>	Pierce
Molekulargewichtsstandard, <i>prestained</i>	BioRad
Natriumazid	Sigma
Natriumiodid (¹²⁵ I-markiert)	Amersham
Natriumpyruvat	Gibco
Natriumvanadat	Sigma
Ouabain	Sigma
Ovalbumin	Sigma
Penicillin/Streptomycin Mix	Gibco
Pepstatin	Sigma
PMSF	Sigma
Polylysin	Sigma
Sephadex G-10	Sigma
Sephadex G-50, <i>medium</i>	Sigma
Streptavidin	Gibco
Szintillazionsflüssigkeit für organische Proben	Packard (Microscint-O)
Szintillazionsflüssigkeit für wässrige Proben	Roth
TEMED	Sigma
Trichloressigsäure	Sigma
Tyrosin	Sigma
Wasserstoffperoxid	Sigma
α -D-Methylmannosid	Sigma

2.1.2 Verbrauchsmaterial

96- <i>well</i> -Mikrotiterplatten	Greiner, Nuncolon
BioBeads SM2	BioRad

ECL-Hyperfilm	Amersham
Einmal-Plastiksäulen (10 ml)	BIO-RAD
Einmal-Spritzen (1 ml)	Braun
Filter (0,45 µm, Acetonitril beständig)	Millipore
Filteraufsatz für 1 ml Einwegspritzen (Porengröße 0,45 µm)	Millipore (Typ HV)
<i>IODO-GEN Precoated Iodination Tubes</i>	Pierce
Kanülen (0,45 mm)	Braun
Kanülen (0,60 mm)	Braun
<i>Multiscreen filtration plates (0,65 µm hydrophilic, low protein binding)</i>	Millipore
Nitrozellulosemembran (0,45 µm)	Schleicher und Schuell (Obtitran BA-S 83)
Pipettenspitzen	Peske
Polycarbonatmembrane Poren Ø 200 nm	Avestin
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Falcon
<i>Whatman-3MM-Filterpapier</i>	Kobe
Zellkulturflaschen	Nuncolon

2.1.3 Puffer

Alle Puffer wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

Ammoniummolybdat-Lösung (für Bartlettassay):

500 mM H₂SO₄

7,12 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄* 4H₂O

ATPase-Puffer:

20 mM HEPES

150 mM NaCl

1 mM KCl

2 mM MgCl₂

0,5 mM MnCl₂

20 % Glycerin

1,8 mM Ouabain

9 mM NaN₃

1 mM DTT

pH 7,4

4x Auftragspuffer:

200 mM Tris/HCl

40 % (v/v) Glycerin

8 % (w/v) SDS

0,06 % (w/v) Bromphenolblau

80 mM DTT

pH 6,8

Biotinylierter Molekulargewichtsmarker *broad range* (Sigma):

α2-Makroglobulin	205 kDa
β-Galaktosidase	116 kDa
Phosphorylase B	97,4 kDa
Katalase	58,1 kDa
Alkoholdehydrogenase	39,8 kDa
Karbonatanhydrase	29 kDa
Trypsin Inhibitor	20,1 kDa
Lysozym	14,3 kDa
Aprotinin	6,5 kDa

Blockpuffer:

7 % (w/v) Magermilchpulver

0,05 % (v/v) Tween 20

0,05 % (w/v) NaN₃

in TBS-Puffer

Borat-Puffer:

20 mM Borat/NaOH

pH 8,3

Chromatographie-Laufpuffer (Gelfiltration, ATP-Agarose):

20 mM HEPES

150 mM NaCl

1 mM KCl

2 mM MgCl₂

0,5 mM MnCl₂

20 % Glycerin

1 mM DTT

1,5 CMC Detergenz (2,4 mM für Decylmaltosid)

pH 7,4

Elutionspuffer (ATP-Agarose):

20 mM HEPES

150 mM NaCl

1 mM KCl

2 mM MgCl₂

0,5 mM MnCl₂

20 % Glycerin

1 mM DTT

1,5 CMC Detergenz (2,4 mM für Decylmaltosid)

5 mM ATP

pH 7,4

Entwicklerlösung:

100 ml 2,5 % Na₂CO₃

40 µl Formaldehyd

Färbelösung:

80 ml 10 % (NH₄)₂SO₄

2 % H₃PO₄

20 ml Methanol

1 ml 5 % Coomassie G250

in Wasser

Fixierlösung:

30 % (v/v) Ethanol

10 % (v/v) Essigsäure

HEPES-Puffer:

20 mM HEPES

150 mM NaCl

1 mM KCl

2 mM MgCl₂

0,5 mM MnCl₂

20 % Glycerin

1 mM DTT

pH 7,4

Kavitationspuffer (Raji Zellen):

25 mM KOAc

5 mM MgOAc

0,5 mM CaOAc

20 mM HEPES

1 mM DTT

pH 7,4

Kavitationspuffer (SF9 Zellen):

250 mM Sucrose

25 mM KOAc

5 mM MgOAc

0,5 mM CaOAc

50 mM Tris/HCl

pH 7,4

Konditionierer (für Silberfärbung):

30 ml Ethanol

20 ml 2 M NaOAc pH 6,0

2 ml 25 % Glutaraldehyd
100 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$
48 ml Wasser

Liposomenpuffer:

20 mM HEPES
150 mM NaCl
1 mM KCl
pH 7,4

NP40-Lysepuffer:

150 mM NaCl
5 mM KCl
5 mM MgCl_2
2 mM CaCl_2
50 mM Tris/HCl
1 % NP40
pH 7,4

Organische Phase (ATPase-Assay) :

45 % (v/v) Isobutanol
45 % (v/v) Cyclohexan
9 % (v/v) Aceton
1 % (v/v) wässrige Phase (s. dort)

PBS:

150 mM NaCl
1,3 mM KCl
10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$
Der pH-Wert wurde durch
das Verhältnis $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ eingestellt.

Protease-Inhibitormix:

50 $\mu\text{g/ml}$ AEBSF

1 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin
5 µg/ml Pepstatin
25 µl Formaldehyd
75 ml Wasser

Rekonstitutions-Puffer (Gelfiltration):

20 mM HEPES
150 mM NaCl
1 mM KCl
2 mM MgCl₂
0,5 mM MnCl₂
20 % Glycerin
1 mM DTT
0,2 mM ATP
pH 7,4

Sammelgel (5 %):

7,1 ml Protogel (Acrylamid/Bisacrylamid 30/0,8)
5,25 ml 1,0 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
28,6 ml Wasser
0,42 ml 10 % (w/v) SDS in Wasser
420 µl 10 % (w/v) APS in Wasser
42 µl TEMED
die angegebenen Mengen reichen für acht Minigele

Solubilisationspuffer:

20 mM HEPES
150 mM NaCl
1 mM KCl
2 mM MgCl₂
0,5 mM MnCl₂
20 % Glycerin
1 mM DTT

Detergenz (Konzentrationsberechnung s. 2.2.4.5)

pH 7,4

Stopplösung (Silberfärbung):

10 % (v/v) Essigsäure

Stoppuffer (Iodierung):

1 mg/ml Na₂S₂O₅ in PBS pH 7,4

Sucrose-Puffer:

50 mM Tris/HCl

150 mM KOAc

5 mM MgOAc

0,4/1,8/2,7 M Sucrose

pH 7,4

TBS-Puffer:

10 mM Tris/HCl

150 mM NaCl

pH 7,5

TBS-T-Puffer:

0,05 % (v/v) Triton X-100

in TBS-Puffer

TCA-Fix:

15 % (w/v) TCA

50 % (v/v) Methanol

TE Puffer:

50 mM Tris-HCl

0,1 mM EDTA

pH 7,9

Transferpuffer:

39 mM Glycerin

48 mM Tris

0,037 % (w/v) SDS

20 % (v/v) Methanol

Trenngel (10 %):

25 ml Protogel (Acrylamid/Bisacrylamid 30/0,8)

18,8 ml 1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS (pH 8,8)

21,3 ml Wasser

112,5 µl 10 % (w/v) APS in Wasser

75 µl TEMED

die angegebenen Mengen reichen für acht Minigele

Wässrige Phase (ATPase-Assay):1 M H₂SO₄10 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ * 4H₂O**2.1.4 Geräte**

Brutschränke	Heraeus
<i>Douncer</i> -Homogenisator (10 ml)	Braun Melsungen
<i>Douncer</i> -Homogenisator (30 ml)	Braun Melsungen
Entwicklermaschine	AGFA (Curix 60)
Filtrationseinrichtung für Transportassay	Millipore
Fluoreszenz-ELISA	Messgerät bmG (POLARstar Galaxy)
Fluoreszenzspektrometer	Instruments S.A., HORIBA Group (Fluorolog-3)
Geldokumentationssystem	Amersham-Pharmacia (Hoefer SE 660)
Hämatozytometer	Brand
<i>Hamilton</i> -Spritzen	Mettler-Toledo
LipoFast Extruder	Avestin, Ottawa, Ontario, Canada
Mikro-HPLC-System	Pharmacia Biotech (SMART-System)

Mikroskop	Zeiss (Axiovert 10)
Milli-Q-Wasserdeionisierungsanlage	Millipore
Multipipette	Millipore
Quarzdreiecksküvette (1ml) für Fluoreszenzspektroskopie	Hellma
Quarzküvette (500 μ l) für Fluoreszenz und UV/Vis-Spektroskopie	Hellma
Rotoren für Ultrazentrifugation	Beckman (SW 28.1, Ti 70.1)
Schüttelinkubatoren	Infors AG (HT)
<i>Semidry-Blot</i> -Apparatur	Eigenbau (Werkstatt), BioRad
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments (Hera safe)
<i>Speed Vac</i> -Konzentrator	Buchofer
Spektralphotometer (UV/Vis)	Perkin Elmer (Lambda 2)
Suspensionszellkulturflaschen	Technomara
Tank- <i>Blot</i> -Apparatur	Eigenbau (Werkstatt)
Thermomixer	Eppendorf (5430)
Ultraschallgenerator	Branson (Sonifier 250)
Ultrazentrifuge	Beckman (TLA-100, L8-60M)
UV/Vis-Spektrometer	Pharmacia Biotech (Ultrospec 3000)
Vakuumbank (<i>Multiscreen Filtration System</i>)	Millipore
Waagen	Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore (Milli-Q UF Plus)
Zentrifugen	Eppendorf (5415C, 5403), Heraeus (Omnifuge 2)
β -Zähler	Beckman
γ -Zähler	Packard (Cobra II, MR480)

2.1.5 Zellen und Zellkulturmedia

Es wurden folgende Zelllinien benutzt: Sf9 Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*, ATCC CRL 1711 (Vaughn *et al.*, 1977) und humane Raji-Zellen (humane Burkitt Lymphom, ATCC CCL 86 (Epstein *et al.*, 1966). Die Zellkulturmedia und Zusätze wurden von Gibco BRL bezogen.

2.1.6 Antikörper, Lipide und Peptide

Für die Immunodetektion wurden C-terminal gerichtete monoklonale Antikörper 148.3 gegen TAP1 (Meyer *et al.*, 1994) und 435.3 gegen TAP2 (van Endert *et al.*, 1994) benutzt. Tapasin wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 7F6 (AG Tampé, *unveröffentlichte Daten*), schwere Kette von MHC Klasse I mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers A1.4 (Bushkin *et al.*, 1986) visualisiert. Für die Immunoblots und Affinitätsäulen gegen humanes Sec61-Komplex wurde der polyklonale Antikörper sc12322 verwendet (Santa Cruz Biotechnology). Die sekundären anti-Maus, anti-Ratte und anti-Kaninchen Antikörper wurden von Sigma, anti-Ziege und anti-Biotin Antikörper von Pierce bezogen. Die verwendeten Peptide wurden von W. Kraas in der Gruppe von Prof. Jung am Institut für Organische Chemie, Eberhardt Karls Universität Tübingen, von der Peptidsyntheseeinrichtung des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried oder von Dr. M. Krause am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität in Marburg nach der konventionellen Fmoc-Methode synthetisiert. Die verzweigten Peptide wurden uns von Prof. J. Neefjes (Amsterdam, Holland) zur Verfügung gestellt. Lipide wurden von Avanti Polar Lipids (Eugene, USA) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Raji-Zelllinie wurde im RPMI 1640 Glutamax I, supplementiert mit 10% FCS (1 h bei 55°C inaktiviert), 40 U/ml Penicillin, 40 µg/ml Streptomycin und 1 mM Natriumpyruvat, in Drehflaschen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden jeden 3. Tag durch Verdünnung auf 50% der Ausgangsdichte passagiert. Am 9. Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 1000 x g, 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde einmal mit eiskaltem PBS (pH 7,4) gewaschen und bei -20°C gelagert (Meyer *et al.*, 1994).

Die Insektenzellen wurden in SF900 II Medium kultiviert, das mit 10% FCS, 40 U/ml Penicillin, 40 µg/ml Streptomycin supplementiert wurde. Um den TAP-Komplex zu exprimieren, wurden 600 ml Insektenzellkultur (1,6 bis 2,0 10⁶ Zellen/ml) mit 50 ml eines *high titer* Stocks von rekombinanten Bakuloviren infiziert. 72 h p.i. erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation. Nach erfolgreicher

Expression machte TAP einen Anteil von 0,2 bis 2 Gewichtsprozent des mikrosomalen Proteins aus.

2.2.2 Markierungsverfahren

2.2.2.1 Chloramin-T-Methode (geändert nach McConahey)

Um Tyrosinreste von TAP-Liganden mit ^{125}I Iod zu markieren (*Y), wurden 1,5 nmol des Peptids mit 1 μl Na^{125}I (entspricht 100 μCi) und 10 μg Chloramin-T in 90 μl 1x PBS (pH 7,4) 5 min bei RT umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl Stoppuffer und 100 μl 1x PBS (eiskalt) beendet. Die ^{125}I -markierten Peptide wurden mit Hilfe von Anionenaustauscher gereinigt. Dazu wurden 10 mg trockenes Dowex 1X8 Material in PBS 1 % (w/v) dialysiertes BSA 0,1 % NaN_3 , pH 7,4 aufgenommen. Kurz vor dem Gebrauch wurde das Material zweimal mit PBS gewaschen, um BSA-Rückstände zu entfernen. 220 μl der aufgeschlämmten Dowex-Suspension wurden zu dem Iodierungsansatz direkt nach dem Stoppen gegeben und gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde der Reaktionsansatz in eine fertige Zentrifugationssäule übertragen und 30 sec bei 500 x g zentrifugiert. Der Durchfluss mit dem iodierten Peptid wurde bei 4°C gelagert und blieb über 2 Wochen stabil.

2.2.2.2 Chloramin-T-beschichtete Reaktionsgefäße

Es wurde alternativ in Chloramin-T-beschichteten Glasreaktionsgefäßen iodiert. Dazu wurden 1,5 nmol Peptid in 150 μl PBS (pH 7,4) aufgenommen und in ein *iodo-GEN Precoated Iodination Tube* überführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl Na^{125}I (100 μCi) gestartet und nach 20 min Inkubation bei RT durch Überführen der Peptid-Lösung in ein Eppendorfgefäß gestoppt. Überschüssiges Iod wurde durch Zugabe eines Volumenäquivalents 2 mg/ml Tyrosin, 2 mM NaI in PBS (pH 7,4) abgefangen. Das iodierte Peptid wurde bei 4°C gelagert und blieb über 2 Wochen stabil.

2.2.3 Allgemeine biochemische Methoden

2.2.3.1 TCA-Fällung von Proteinen

Um Proteine aus wässrigen Lösungen zu fällen und somit für die Analyse aufzukonzentrieren, wurde die Lösung zunächst jeweils 5 min bei 15.000 rpm, 4°C

zentrifugiert, um evtl. vorhandene Zellen und Zellbruchstücke zu entfernen. Zum Überstand wurden dann 10 % einer 50 % TCA-Lösung zugefügt (TCA-Endkonzentration = 5 %), kurz gemischt und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde 30 min bei 15.000 rpm, 4°C zentrifugiert und das dabei erhaltene Protein-Pellet mit 150 - 200 µl Aceton gewaschen, anschließend getrocknet und im Wasser aufgenommen. Falls die Proben für die SDS-Gelelektrophorese bestimmt sind, erfolgt nach der Aufnahme im 2x-Lämmli-puffer die Titration ins Blaue durch Zugabe geringer Mengen 1M Tris/HCl, pH 6.8 / 0.4 % SDS.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.2.3.2.1 BCA-Methode

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen bzw. Polypeptiden und deren Derivaten, die nicht mit einem Farbstoff markiert waren, wurde mit dem *Micro-BCA Protein Assay Reagent Kit* nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Ca. 1 µg des zu untersuchenden Proteins bzw. Polypeptids wurde mit einem geeigneten Puffer auf 250 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 250 µl der BCA-Lösung und einstündiger Inkubation bei 60°C wurde die Absorption bei 562 nm in einem UV/Vis-Spektrometer gemessen. Als Referenz diente eine Mischung aus 250 µl des verwendeten Puffers und 250 µl BCA-Lösung. Für die Ermittlung der Eichgeraden wurden 0/0,4/0,8/1,2/1,6 und 2 µg IgG verwendet. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.2.3.2.2 Absorptionsspektroskopie

Die Konzentration von Fluoreszein-markierten Peptiden wurde mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie bestimmt. Dazu wurde die Absorption bei 492 nm gemessen und die Konzentration mit Gleichung 1 berechnet (ϵ Fluoreszein bei pH 9.0 (492 nm) = 75.000 M⁻¹ cm⁻¹).

$$c = \frac{Abs}{\epsilon \times l} \quad \text{Gleichung (1)}$$

Abs Absorption bei Absorptionsmaximum

ϵ Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

l Länge des Lichtwegs durch die Probe [cm]

Die Gesamtproteinkonzentration von mikrosomalen Präparationen wurde ebenfalls spektroskopisch ermittelt. Dazu wurden 5 μl einer mikrosomalen Stocklösung zu 595 μl PBS 1% (w/v) SDS, pH 7,4 gegeben und deren Absorption bei 280 nm in einer Quarzküvette gemessen. Um der Absorption eine Proteinmenge zuordnen zu können, wurde eine Eichgerade mit bekannten Konzentration IgG bzw. BSA hergestellt.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der TAP-Expression und zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die denaturierende Gelelektrophorese (SDS *polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) nach Lämmli verwendet (Lämmli, 1970; Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden 9-12% SDS-Polyacrylamidgele benutzt. Die Größe der Minigele betrug 10 x 8 x 0,75 cm. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 1/4 Volumen 4x Auftragspuffer 15 min auf 65°C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker bei einer konstanten Spannung von 90 V (Sammelgel) und 120 V (Trenngel).

2.2.3.4 Protein-Silberfärbung in Polyacrylamidgelen

Wenn nur sehr geringe Proteinmengen zur Verfügung standen wurden die Gele silbergefärbt. Mit dieser Methode lassen sich ca. 0,1 ng Protein/ mm^2 sichtbar machen.

- 2 x 15 min Inkubation in Fixierlösung
- 20 min Inkubation mit Konditionierer
- 5 x 7 min Waschen mit deionisiertem Wasser
- 20 min Inkubation in Silberfärbelösung
- 2 x 5 s Waschen mit deionisiertem Wasser
- Inkubation in Entwicklerlösung bis die Banden die gewünschte Intensität aufweisen
- kurze Inkubation in Stopplösung

Alle Inkubationen wurden bei RT auf einem Gelschüttler durchgeführt.

2.2.3.5 Immunoblot

Sowohl die Aufreinigung als auch die Rekonstitutionsexperimente wurden über Western Blot kontrolliert.

2.2.3.5.1 Tank-Blot

Gel und Nitrozellulosemembran wurden zwischen *Whatman*-Filterpapier und Schaumgummipolster in ein Haltegitter eingespannt und in die mit Transferpuffer gefüllte *Tank-Blot*-Apparatur eingesetzt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 18 V.

2.2.3.5.2 Semi-dry Blot

Gel und Nitrozellulosemembran wurden zwischen 3 Lagen des mit Transferpuffer getränkten *Whatman*-Filterpapiers gelegt und in eine *Semidry-Blot*-Apparatur eingespannt. Der Transfer erfolgte über 1 bis 2 h bei 100 mA pro Minigel.

2.2.3.5.3 ECL-Färbung

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran und einer möglichen Erstkontrolle des erfolgreichen Transfers durch Ponceau S-Proteinfärbung wurde die Membran jeweils 1h in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen.

- 1 h Inkubation in Blockpuffer
- 2 h Inkubation der Membran mit erstem Antikörper
- 5 x 5 min mit TBS-T-Puffer waschen

Nicht gebundener Antikörper wurde erneut durch 15-minütiges Waschen mit TBST-Puffer entfernt.

- 1 h Inkubation mit 1:10.000 sekundärem Antikörper (anti-Maus IgG gekoppelt mit Peroxidase)
- 5 x 5 min mit TBS-T-Puffer waschen

Der Nachweis der Proteine auf der Nitrozellulose-Membran erfolgte nach der ECL-Methode (*enhanced chemoluminescence*) mit Reagenzien der Firma Amersham. Sie hat gegenüber herkömmlichen Methoden den Vorteil einer sehr hohen Sensitivität,

welche laut Angaben des Herstellers bei einer Antigenmenge von nur 1 pg liegt (die Sensitivität hängt aber auch von der Qualität der Antikörper ab). Für die Detektion der Chemilumineszenz wurde der ECL-Hyperfilm für 5 sec bis 20 min auf die lumineszierende Membran aufgelegt und dann in einer Agfa Curix 60 entwickelt.

2.2.4 Rekonstitution des TAP-Komplexes

Alle Versuchsansätze, die aktives TAP enthielten, wurden ausschließlich bei 4°C bzw. auf Eis und unter Verwendung von eiskalten Puffern und Geräten (Douncer, Hamilton-Spritzen usw.) durchgeführt.

2.2.4.1 Liposomen-Präparation

Um die künstlichen Lipidvesikel, die so genannten Liposomen, für die TAP-Rekonstitution (s. 2.2.4.7) zu präparieren, wurde eine 20 mg/ml Lipidmischung-Stocklösung in Methanol-Chloroform (1:2) hergestellt. Für die meisten Versuche wurde eine Mischung aus Cholesterol (23 % w/w), Phosphatidylsäure (10 % w/w, heterogene Kettenlängen) und Phosphatidylcholin (67 % w/w, heterogene Kettenlängen) benutzt. Ein Aliquot wurde auf dem Boden einer Glasschale ausgebreitet und mit Stickstoff oder Argon begast, um Sauerstoff, der zu Oxidation der Lipiden führen kann, zu verdrängen. Dabei sollte der Lipidfilm die größtmögliche Oberfläche annehmen. Die Schale wurde über Nacht in einem Exsikator getrocknet (oder alternativ im Rotationsverdampfer).

Falls die Lipide in der Ausgangslösung ein Detergenz enthielten, wurden sie nach der Trocknung im Liposomenpuffer gelöst und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Der Lipidfilm wurde im Liposomenpuffer gequollen und resuspendiert, so dass die Endkonzentration 8 mg/ml betrug. Die Liposomenlösung wurde in 200 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei 4°C langsam aufgetaut. Dieser Schritt wurde 4-mal wiederholt, damit durch Fusion größere Liposomen entstehen. Um eine homogene Population von unilamellaren (einschichtigen) Lipidvesikeln zu bekommen, wurden die Aliquots durch zwei Polycarbonatmembranen mit einem Porendurchmesser von 200 nm mit Hilfe eines Extruders mehrmals durchgedrückt. Die Liposomen wurden bei -20°C mehrere Wochen, bei -80°C mehrere Monate gelagert.

2.2.4.2 Liposomendichteassay

Bei diesem Verfahren wurde bei der Liposomenherstellung (s. 2.2.4.1) der Lipidfilm in einer gesättigten Carboxyfluoreszein-Lösung in PBS resuspendiert. Die Liposomen wurden anschließend mit PBS durch Zentrifugation gewaschen und die Absorption der Probe bei 515 nm über einen Zeitraum von 5 min in einem Fluoreszenzspektrometer gemessen.

2.2.4.3 Phospholipidbestimmung (nach Bartlett)

Mit diesem Verfahren wurde die Menge der phosphathaltigen Lipide in Liposomen bzw. Proteoliposomen bestimmt. Da der Anteil von solchen Lipiden in den meisten Versuchen 77 % (w/w) betrug (s. 2.2.4.1), wurde durch die Multiplikation mit Faktor 1,3 die Gesamtmenge der Lipiden errechnet. Dafür wurden 50 µl Liposomen auf einem Heizblock bei 200°C getrocknet und nach der Zugabe von 400 µl 5 M H₂SO₄ verascht. Nachdem die Probe abgekühlt war, wurde der entstandene Kohlenstoff durch Zugabe von 100 µl 10% H₂O₂ zu CO₂ umgewandelt. Das freie anorganische Phosphat wurde mit Hilfe von 4,6 ml Ammoniummolybdat-Lösung komplexiert und durch Farbreaktion mit *Fiske-Subarow reducer* visualisiert. Die Absorption der Probe wurde bei 800 nm gemessen, die Konzentration anhand einer Eichgeraden (Verdünnungsreihe aus Phosphatpuffer) bestimmt.

2.2.4.4 Mikrosomen-Präparation

5 ml Zellpellet wurden in 15 ml eiskalten Kavitationspuffer (1 mM DTT, 1:100 Protease-Inhibitormix) aufgenommen und in einem *Douncer*-Homogenisator durch 30-maliges Betätigen des Stempels aufgeschlossen. Der Vorgang wurde unter Eiskühlung durchgeführt. Anschließend wurde 2,7 M Sucrose-Puffer bis zu einer Endkonzentration von 250 mM zugegeben. Durch Zentrifugation (4 min, 200 x g, 4°C; anschließend 8 min, 700 x g, 4°C) wurden die Zellkerne und nichtlysierte Zellen abgetrennt. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugationsröhrchen (SW 28.1 Rotor) mit dem 3-fachen Volumen 2,7 M Sucrose (1 mM DTT, 1:100 Protease-Inhibitormix) vermischt und mit 4 ml 1,8 M Sucrose-Puffer, 4 ml 0,4 M Sucrose-Puffer überschichtet. Nach der Ultrazentrifugation (über Nacht, 24.000 rpm, 4°C) in einem SW 28.1 Rotor wurde die trübe Fraktion zwischen den 0,4 M und 1,8 M Sucrose-Schichten abgenommen, 1:1 mit PBS (1 mM DTT, pH 7,4) verdünnt und in

einem Ti 70.1 Rotor pelletiert (40 min, 35.000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde im HEPES-Puffer (1 mM DTT, pH 7,4) resuspendiert, die Mikrosomen mit einem *Douncer*-Homogenisator vereinzelt, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Mikrosomen konnten bei -80°C mehrere Monate gelagert werden. Die Gesamtproteinmenge wurde mit Hilfe der Absorption bei 280 nm oder der BCA-Methode bestimmt. Der TAP-Gehalt wurde mit einem Peptidsättigungsbindungsexperiment (s. 2.2.5.1) ermittelt.

2.2.4.5 Solubilisierung

Um Membranproteine aus der Mikrosomenmembran herauszulösen, wurden sie mit Hilfe von Detergenz in eine lösliche Form gebracht (solubilisiert). Bei den meisten Versuchen wurden die Mikrosomen mit Decylmaltosid solubilisiert, einem nichtionischen Detergenz, das sich als optimal für Aktivitätserhaltung und Solubilisierungseffizienz von TAP erwies (Uebel *et al.*, 1997b). Die eingesetzte Detergenz-Konzentration wurde mit Hilfe von Gleichung 2 berechnet (Jackson & Litman, 1982).

$$\rho = \frac{[C_{DETERGENZ}] - CMC}{[C_{LIPID}]} \quad \text{Gleichung (2)}$$

ρ Solubilisierungseffizienz

CMC kritische Mizellenkonzentration des jeweiligen Detergenz (1,6 mM bei Decylmaltosid)

C_{LIPID} Lipidkonzentration, wobei 700 Da als Durchschnittsmolekulargewicht von Lipiden angenommen wird

$C_{DETERGENZ}$ Detergenzkonzentration

Die beste Solubilisierungseffizienz von TAP wurde für Decylmaltosid bei $\rho = 2$ und einer Lipidkonzentration von 6 mg/ml erreicht (Protein zu Lipid Verhältnis wurde als 1:1 angenommen). Die Mikrosomen wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit dem HEPES-Puffer einmal gewaschen (4°C, 10 min, 20.000 x g). Das Pellet wurde im Solubilisierungspuffer resuspendiert und 20-30 min bei 4°C inkubiert. Falls eine Aufreinigung durch Gelfiltration (s. 2.2.4.6.2) beabsichtigt war, durfte das Gesamtvolumen der Probe 50 μ l nicht überschreiten. Nach der Inkubation wurde die

unlösliche Fraktion (nichtsolubilierte Proteine) pelletiert, der Überstand (Solubilisat) wurde weiterverwendet.

2.2.4.6 Isolierung des TAP-Komplexes

2.2.4.6.1 Reinigung mit ATP-Agarose

Mit diesem Verfahren wurde die ATP-bindende Eigenschaft von TAP genutzt, um es durch Affinitätschromatographie aufzureinigen. Dafür wurde ATP-Agarose verwendet, wobei ATP über C8-Atom des Adenosins über einen C_n-Spacer an das Säulenmaterial gekoppelt war. TAP-haltige Mikrosomen wurden solubilisiert (s. 2.2.4.5) und die unlösliche Fraktion durch Zentrifugation entfernt (8 min, 4°C, 20.000 x g). ATP-Agarose (20 % des Mikrosomen-Volumens, mindestens 50 µl) wurde 5 min in 1 ml H₂O gequollen, dreimal mit H₂O gewaschen (je 2 min Zentrifugation bei RT und 200 x g) und in eiskaltem Chromatographie-Puffer aufgenommen. Das Mikrosomen-Solubilisat wurde zur äquilibrierten ATP-Agarose gegeben und 1 h auf einem Überkopfrad inkubiert. Ungebundene Moleküle wurden durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml Chromatographie-Puffer entfernt (je 2 min Zentrifugation bei 4°C und 200 x g) und das gebundene TAP wurde in 4 Schritten mit eiskaltem Elutions-Puffer (Gesamtvolumen 200 µl) eluiert. Das TAP-haltige Eluat wurde anschließend entweder für die Rekonstitution verwendet oder elektrophoretisch analysiert.

2.2.4.6.2 Reinigung durch Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde verwendet, um möglichst schonend den instabilen MHC-Beladungskomplex von den anderen mikrosomalen Proteinen (vor allem mikrosomalen ATPasen) abzutrennen. Dabei wurden die Proteine nach ihrer Größe getrennt und fraktioniert. Die Versuche wurden an einer Micro-FPLC-Anlage (SMART System[®]) unter Verwendung einer Superose[®] 6 PC 3.2/30 Gelfiltrations-säule durchgeführt (Bettvolumen 2,4 ml, Trennungsoptimum zwischen 5 kDa und 5 MDa, Partikelgröße 13 µm). Maximales Volumen der zu auftragenden Probe betrug 50 µl, was bei der Mikrosomensolubilisierung (s. 2.2.4.5) beachtet werden musste. Die Säule wurde in das SMART-System eingespannt (genauere technische Details s. *SMART System Manual*) und einmal mit 2 Säulenvolumen Wasser gewaschen, um 20% Ethanol, in dem die Säule gelagert wurde, rauszuwaschen. Anschließend wurde

die Säule mit 2 Säulenvolumen Chromatographie-Puffer äquilibriert. Die Probe wurde mit Hilfe einer *Hamilton*-Spritze injiziert und mit einem Fluss von höchstens 60 µl/min (Chromatographie-Puffer) durch die Säule aufgetrennt. Fraktionen á 60 µl wurden gesammelt und anschließend entweder für die Rekonstitution verwendet oder elektrophoretisch analysiert.

2.2.4.7 Rekonstitution in Liposomen

Um Funktionen eines Membranproteins, die durch Solubilisierung verloren gegangen sind, wiederherzustellen, kann man es in künstliche Lipidvesikel, die so genannten Liposomen (s. 2.2.4.1) einbauen (Rekonstitution). Bei dem Proteineinbau werden die Liposomen durch kleine Mengen an Detergenz im Proteinsolubilisat leicht destabilisiert, was die Integration der Membranproteine in die Lipiddoppelschicht ermöglicht. Durch Detergenzentfernung werden die Vesikel wieder verschlossen und stabilisiert. Die Liposomen mit den eingebauten Membranproteinen werden Proteoliposomen genannt.

2.2.4.7.1 Rekonstitution durch Gelfiltration

Die Rekonstitution durch Gelfiltration ist die schnellste Rekonstitutionsmethode, wobei aber die Effizienz der Detergenzentfernung niedriger als bei anderen Methoden ist. Da manche Membranproteine bei langer Behandlung mit Detergenz ihre Aktivität unwiderruflich verlieren, ist diese Methode bei besonders instabilen Proteinen (wie zum Beispiel TAP) zu empfehlen. Bei diesem Verfahren wurde eine selbstgepackte Sephadex G-50 Säule mit einem Bettvolumen von 20 ml verwendet. Das Säulenmaterial wurde 4 h in H₂O gequollen, Feinstaub wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt. Dieser Vorgang wurde in Abständen von 1 h zweimal wiederholt. Die Säule wurde gepackt und mit Hilfe einer Peristaltikpumpe in eiskaltem Rekonstitutions-Puffer (mindestens 2 Säulenvolumen) äquilibriert. Kurz vor Gebrauch wurde nahezu die ganze Flüssigkeit oberhalb der Bettgrenze entfernt. Die Lipide wurden langsam bei 4°C aufgetaut und pelletiert (15 min, 4°C, 20.000 x g). Das Pellet wurde im Proteinsolubilisat (s. 2.2.4.7) resuspendiert und 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf das Säulenmaterial vorsichtig aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Rekonstitutions-Puffer mittels *gravity flow*. Die 1 ml großen Fraktionen wurden nach der Filtration

gesammelt. 3 Fraktionen, die am stärksten trüb waren, wurden vereint und 15 min bei 4°C und 20.000 x g pelletiert. Das Pellet enthielt die Proteoliposomen, die anschließend entweder für die Funktionlitätsassays verwendet oder elektrophoretisch analysiert wurden.

2.2.4.7.2 Rekonstitution durch hydrophobe Adsorption (BioBeads®)

Bei dieser Methode wurde das Detergenz durch hydrophobe Adsorption an die Polystyren-Kügelchen, die so genannten BioBeads, aus dem Solubilisat entfernt. 4 Aliquots mit je 100 mg trockenen BioBeads werden in Methanol gequollen und bei 200 x g pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet zweimal mit Wasser gewaschen. Anschließend werden die BioBeads im HEPES-Puffer äquilibriert und auf Eis gestellt. Kurz vor Gebrauch wird die Flüssigkeit abgezogen. Die Liposomen wurden langsam bei 4°C aufgetaut und pelletiert (15 min, 4°C, 20.000 x g). Das Pellet wurde im Proteinsolubilisat (s. 2.2.4.7) resuspendiert, 45 min auf Eis inkubiert und mit einem Aliquot äquilibrierter BioBeads im *batch*-Verfahren gemischt. Das Gemisch wird 30 min auf einem Überkopfrad bei 4°C inkubiert. Die BioBeads werden bei 4°C für 1 min bei 200 x g pelletiert und verworfen. Der Überstand wird auf das nächste Aliquot BioBeads übertragen. Der ganze Vorgang wird dreimal wiederholt und der letzte Überstand wird bei 4°C für 15 min bei 20.000 x g pelletiert. Das Pellet enthielt die Proteoliposomen, die anschließend entweder für die Funktionlitätsassays verwendet oder elektrophoretisch analysiert wurden.

2.2.4.8 Abtrennung des Sec61-Komplexes durch Affinitätschromatographie

Dieses Verfahren wurde verwendet um humanen Sec61-Komplex, den putativen Peptid-Exporter aus dem Mikrosomen-Solubilisat zu entfernen und die stöchiometrische Parameter des TAP-Peptidtransportes zu untersuchen.

2.2.4.8.1 Antikörperkopplung an die CNBr-aktivierte Sepharose

Für diesen Zweck wurde anti-Sec61 α Antikörper an die CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. 0,5 g lyophilisierte CNBr-aktivierte Sepharose wurde 30 min in 10 ml 1 mM HCl-Lösung bei 4°C inkubiert. Das gequollene Gelmaterial (1,4 ml) wurde zunächst mit 25 ml eiskalter 1 mM HCl-Lösung gewaschen und anschließend mit 25 ml Borat-Puffer äquilibriert. Für die Kopplung des Antikörpers wurden 400 μ l

Antikörper-Lösung (entspricht 100 µg Antikörper) mit 1,5 ml Borat-Puffer verdünnt. Der pH-Wert wurde kontrolliert und mit 0,1 M NaOH eingestellt. Die Suspension aus ca. 3 ml gequollenem Gelmaterial und der Antikörper-Lösung über Nacht auf einem Überkopfrad bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Gelmaterial durch Zentrifugation (1000 x g; 5 min; 4°C) pelletiert. Restliche aktivierte Gruppen des Gelmaterials wurden durch Inkubation in 10 ml 1 M im Borat-Puffer/1 M Ethanolamin für 2 h bei Raumtemperatur inaktiviert (Überkopfrad). Die Suspension wurde 9-mal abwechselnd mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8,0 und 50 mM Tris-Glycin, 1 M NaCl, pH 4,0 gewaschen, in eine Säule gegossen und im TE-Puffer/0,02% NaN₃ bei 4°C gelagert.

2.2.4.8.2 Affinitätschromatographie

Die αSec61-Sepharose-Säule wurde kurz vor dem Gebrauch mit mindestens 2 Säulenvolumen Chromatographie-Puffer äquilibriert. Die TAP-haltigen Fraktionen wurden nach der Aufreinigung durch die Gelfiltration (s. 2.2.4.8.2) vereinigt und auf die αSec61-Sepharose-Säule aufgetragen. Dabei band solubilisierter Sec61-Komplex an die immobilisierten αSec61-Antikörper und wurde somit dem Proteingemisch entzogen. Der Durchfluss wurde aufgefangen und anschließend entweder für die Rekonstitution (s. 2.2.4.8) verwendet oder elektrophoretisch analysiert.

2.2.5 Funktionalitätsassays

2.2.5.1 Sättigungsbindungsassay

Mit Hilfe von Sättigungsbindungsexperimenten wurden die Affinitäten von ¹²⁵Iod- oder Fluoreszenz-markierten Peptiden bestimmt. Zusätzlich lässt sich mit dieser Methode die TAP-Konzentration einer mikrosomalen Präparation ermitteln. Dazu wurden in 150 µl HEPES-Puffer steigende Konzentrationen des markierten Liganden mit TAP-haltigen Vesikeln auf Eis inkubiert. Bei Peptiden betrug die Inkubationszeit 15 min, während Ansätze, die ICP47 enthielten, 30 min für die Einstellung des Bindungsgleichgewichts benötigten. Ungebundene Liganden wurden durch zweimaliges Waschen der Vesikel abgetrennt. Dazu wurden die Vesikel mit eiskaltem HEPES-Puffer auf 500 µl aufgefüllt, pelletiert (8 min, 12.000 x g, 4°C), erneut in 500 µl eiskaltem HEPES-Puffer resuspendiert und ein zweites Mal zentrifugiert (8 min, 12.000 x g, 4°C). Bei der Verwendung von ¹²⁵Iod-markierten

Liganden wurde direkt die mit Mikrosomen assoziierte Radioaktivität mit Hilfe eines γ -Zählers quantifiziert. Bei der Verwendung von Fluoreszenz-markierten Peptiden wurde das Mikrosomenpellet in 600 μ l HEPES-Puffer (1 % (w/v) SDS) lysiert und die Fluoreszenzemission gemessen ($\lambda_{em/ex} = 470/515$ nm). Die Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe von Proben streulichtbereinigt, die kein Fluoreszenz-markiertes Peptid enthielten. Der Anteil unspezifischer Bindung wurde in Gegenwart eines 400-fachen Überschusses an unmarkierten Liganden bestimmt. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d und der maximalen Anzahl an Bindungsplätzen B_{max} wurde die Menge gebundenen Peptids B gegen die Anfangskonzentration $[L]$ des markierten Liganden aufgetragen und mit Gleichung 3 approximiert. Während der K_d -Wert als Maß für die Affinität des Liganden verwendet wird, gibt B_{max} die Zahl der eingesetzten TAP-Moleküle an.

$$B = \frac{B_{max} [L]}{K_d + [L]} \quad \text{Gleichung (3)}$$

B Menge an gebundenem TAP-Ligand

B_{max} maximale Menge an TAP-gebundenen Ligand

$[L]$ Konzentration des Liganden

K_d Dissoziationskonstante

2.2.5.2 Filterbindungsassay

Bei den großen Mengen der zu untersuchenden Proben wurde eine andere Variante des Bindungsassays verwendet. Hier wurde die Entfernung von ungebundenen Reporterpeptiden in den Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiterfiltrationsplatte durchgeführt. Die Vertiefungen sind unten mit einer Filtermembran abgeschlossen, die das Absaugen der Flüssigkeit erlaubt, aber für Mikrosomen und Proteoliposomen undurchlässig ist. Bei diesem Verfahren wurde die Platte in die Halterung eingespannt und an eine Vakuumpumpe angeschlossen. Die Filtermembranen in den Vertiefungen wurden mit je 100 μ l Polylysin-Lösung für 5 min benetzt, die restliche Flüssigkeit wurde abgesaugt. Die unspezifischen Protein- bzw. Peptidbindungsstellen an der Filtermembran wurden durch 15 min Inkubation mit je 150 μ l 1 mg/ml BSA-Lösung in PBS (pH 7,4) abgesättigt. In 50 μ l HEPES-Puffer wurde 125 Iod-markiertes

Reporterpeptid mit TAP-haltigen Vesikeln 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte übertragen und die gesamte Flüssigkeit wurde abgesaugt. Nachdem die Proben dreimal mit je 200 µl eiskaltem HEPES-Puffer gewaschen wurden, wurden die Filtermembranen trocken gesaugt und aus der Platte rausgedruckt. Die mit den Filtermembranen assoziierte Radioaktivität wurde mit Hilfe eines γ -Zählers quantifiziert.

2.2.5.3 Kompetitionsassay

Zur indirekten Bestimmung der Affinität von TAP-Liganden wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Bei dieser Methode konkurrieren die Liganden mit einem markierten Reporterpeptid um die Bindungsplätze. Dies hat den Vorteil, dass die aufwendige Markierung der untersuchten Liganden entfällt. Dazu wurde in 150 µl HEPES-Puffer eine steigende Menge des Liganden mit 100 nM Reporterpeptid und TAP-haltigen Vesikeln 45 min auf Eis inkubiert. Als Reporterligand wurde das Peptid RR*YQKSTEL verwendet. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart eines 400-fach molaren Überschusses an unmarkiertem Peptid bestimmt. Analog zum Sättigungsbindingsexperiment wurde ungebundenes Reporterpeptid abgetrennt (siehe 2.2.5.1) und die mit Mikrosomen assoziierte Radioaktivität gemessen. Anschließend wurde die Bindungsinhibition mit Hilfe von Gleichung 4 berechnet.

$$\text{Inhibition [\%]} = 100 \times \left(1 - \frac{B_i - H}{B_o - H} \right) \quad \text{Gleichung (4)}$$

B_i Menge an gebundenem Reporterpeptid in Gegenwart der Konkretorkonzentration i

H unspezifische Bindung des Reporterpeptids

B_o Menge an gebundenem Reporterpeptid in Abwesenheit eines Konkretors

Die Inhibition der Reporterpeptidbindung wurde gegen die Konkretorkonzentration aufgetragen. Durch Approximation mit Gleichung 5 wurde die Konzentration bestimmt, bei der 50% der Reporterpeptidbindung inhibiert wurden (IC_{50}).

$$Inhibition [\%] = 100 \times \left(\frac{\frac{L}{IC_{50}}}{\frac{L}{IC_{50}} + 1} \right) \quad \text{Gleichung (5)}$$

IC_{50} Kompetitorkonzentration bei 50% Inhibition der Reporterpeptidbindung

Die IC_{50} -Werte von unbekanntem Liganden ließen sich durch den Vergleich mit IC_{50} -Werten von bekannten Liganden in K_d -Werte umrechnen.

2.2.5.4 Peptidtransportassay I

Mit Hilfe von den Transportassays wurde der TAP-spezifische, ATP-abhängige Peptidtransport untersucht. In 150 μ l HEPES-Puffer wurde 150 nM 125 Iod-markiertes Reporterpeptid mit TAP-haltigen Vesikeln und 3 mM ATP 2 min bei 32°C inkubiert. Anschließend wurde der Peptidtransport durch Zugabe von 350 μ l eiskaltem HEPES-Puffer gestoppt und TAP-gebundene Reporterpeptide durch Zugabe eines 400-fach molaren Überschusses von unmarkiertem Peptid bei 4°C verdrängt. Die Vesikel wurden pelletiert (8 min, 12.000 x g, 4°C), erneut in 500 μ l eiskaltem HEPES-Puffer resuspendiert, ein zweites Mal zentrifugiert (8 min, 12.000 x g, 4°C) und die transportierten Peptide mit Hilfe eines γ -Zählers quantifiziert. Um die ATP-Abhängigkeit und die Spezifität des Transports für Peptide zu überprüfen, wurde in Kontrollansätzen ATP durch ADP ersetzt bzw. ein 400-facher molarer Überschuss von unmarkiertem Peptid zugegeben.

2.2.5.5 Peptidtransportassay II

Bei den Untersuchungen an Mikrosomen wurde zusätzlich eine dritte Variante des Transportexperiments verwendet (verändert nach Neefjes *et al.*, 1993). Hierbei wurde die Glykosylierungsmaschinerie des ER ausgenutzt. Als Reporterpeptide dienten 125 Iod-markierte Peptide, die zusätzlich die Erkennungssequenz für N-Glykosylierung NXT/S (X steht für beliebige Aminosäure außer Prolin) enthielten. Weil Peptide ausschließlich innerhalb der Mikrosomen glykosyliert werden, wurde die Glykosylierung als Marker für den Transport verwendet. Glykosylierte und somit transportierte Peptide konnten an Concanavalin A-Sepharose gebunden und

quantifiziert werden. Dazu wurde 300 nM Reporterpeptid bei 32°C in 150 µl HEPES-Puffer mit TAP-haltigen Vesikeln inkubiert. Nach 2 min wurde ein 400-facher molarer Überschuss an glykosylierbarem, unmarkiertem Kompetitorpeptid zugegeben, um den Transport des Reporterpeptids zu stoppen und die Gylkosylierungsmaschinerie abzusättigen. Anschließend wurden die Mikrosomen in 1 ml NP40-Lysepuffer lysiert, mit 75 µl äquilibrierter Concanavalin A-Sepharose gemischt und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfrad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Sepharose mit je 1 ml NP40-Lysepuffer (1 min, 500 x g, 4°C) wurde das spezifisch gebundene Reporterpeptid mit 1 ml 200 mM α -D-Methylmannosid in NP40-Lysepuffer 1 h bei 4°C auf einem Überkopfrad eluiert. Das eluierte Peptid wurde mit einem γ -Zähler quantifiziert. Um die ATP-Abhängigkeit und die Spezifität des Transports für Peptide zu überprüfen, wurde in Kontrollansätzen ATP durch ADP ersetzt bzw. ein 400-facher molarer Überschuss von unmarkiertem Peptid zugegeben.

2.2.5.6 ATP-Hydrolyseassay

Mit Hilfe von ATP-Hydrolyseassays (ATPase-Assays) wurde die TAP-spezifische Hydrolyse von ATP untersucht, die den Peptidtransport energetisiert. Hierzu wurde ATP benutzt, dessen γ -Phosphatgruppe einen ^{32}P -Isotop trug. Durch die Hydrolyse wurde diese Gruppe in der Form eines anorganischen Phosphats abgespalten. Durch Zugabe von Ammoniummolybdat wurde das anorganische Phosphat komplexiert und durch die Anwendung von 2-Phasen-Gemisches (organisch-wässrig) von nicht-hydrolysierten ATP-Molekülen getrennt, die in der wässrigen Phase gehalten wurden. Bei diesem Versuch wurden 20 µl TAP-haltige Vesikel in 30 µl ATPase-Puffer mit 2 mM nichtradioaktivem ATP und 4 µCi radioaktivem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ pro Probe inkubiert. Um die Stimulation der Hydrolyse durch Peptide zu testen, wurde in die Ansätze verschiedene Konzentrationen an Peptiden oder Inhibitoren wie ICP47-Derivate und Natriumorthovanadat zugegeben. Die Proben wurden ohne Vesikel bei 32°C vorinkubiert und die Reaktion durch Vesikel-Zugabe gestartet. Falls nichts anderes angegeben ist, wurden die Ansätze 4 min bei 32° inkubiert und die Reaktion durch die Übertragung in die 1,5 ml wässriger Phase gestoppt. Nach der Zugabe von 15 µl 20 mM H_3PO_4 , die als „Schlepper“ für das freigesetzte anorganische Phosphat diente, wurden 3 ml organischer Phase zugegeben und die Probe auf einem

Schüttelgerät 30 sec lang stark gemischt. Nach der 5 min Inkubation auf Eis wurde die Phasentrennung sichtbar. Die organische Phase, die Molybdat-komplexiertes anorganisches Phosphat enthielt, färbte sich gelblich. 1 ml organischer Phase wurde vorsichtig entnommen, in ein Szintillationsgefäß mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit übertragen und mit Hilfe eines β -Zählers quantifiziert. Das Ergebnis wurde mit dem Faktor 3 multipliziert um die Gesamtmenge des freigesetzten anorganischen Phosphats pro Probe zu berechnen. Um die Fehler durch die Spontanhydrolyse zu vermeiden, wurde in Kontrollansätzen TAP-haltige Vesikel durch ATPase-Puffer ersetzt. Um die Zahlen des β -Zählers mit der Menge an angesetztem ATP zu korrelieren wurden 10 μ l des mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ versetzten ATPase-Puffers direkt in ein Szintillationsgefäß gegeben und im β -Zähler quantifiziert.

3 Ergebnisse

3.1 Biochemische Charakterisierung des TAP-Komplexes

3.1.1 Rekonstitution des TAP-Komplexes in Liposomen

Alle bisherigen Versuche, ATPase-Aktivität von TAP zu analysieren, sind aufgrund sehr hoher Hintergrundaktivität anderer mikrosomaler ATPasen fehlgeschlagen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine Methode zur partiellen Aufreinigung und Rekonstitution von TAP in Proteoliposomen entwickelt. Um größere Mengen an TAP für die biochemische Charakterisierung zu erhalten, wurde eine natürliche Quelle – humane Raji-Zelllinie gewählt. Diese Zelllinie stammt einem Burkitt Lymphom ab und zeigt ein sehr hohes TAP Expressionsniveau sogar ohne Stimulation mit γ -Interferon. Mikrosomen aus Raji-Zellen wurden mit Decylmaltosid solubilisiert. Dieses Detergenz ist optimal für die Solubilisierung von TAP im Hinblick auf den Aktivitätserhalt (Uebel *et al.*, 1997b). Um die Hintergrundaktivität anderer ATPasen zu minimieren, wurde das Detergenz-solubilierte Protein auf die Superose[®]6-Säule geladen und einer Gelfiltration unterzogen. Die Fraktionen wurden mittels eines Immunoblots kontrolliert. Der MHC-Klasse-I-Beladungskomplex bestand nach der Gelfiltration aus TAP1 ($M_{w,app}$ 71 kDa), TAP2 ($M_{w,app}$ 75 kDa) und Tapasin ($M_{w,app}$ 48 kDa) und wurde in einem Bereich eluiert, der ungefähr den Fraktionen 19-21 entsprach. Im Gegensatz zu Tapasin scheint das MHC-Klasse-I-Molekül nach der Gelfiltration nicht mehr mit dem TAP-Komplex verbunden zu sein, da weder die schwere Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls noch β_2 -Mikroglobulin durch Immunoblot in den TAP-haltigen Fraktionen nachgewiesen werden konnten. TAP-haltige Fraktionen wurden vereinigt und in die vorbereiteten Liposomen mittels einer weiteren Gelfiltration rekonstituiert. Diese Methode wurde verwendet, weil sie, im Vergleich zu den anderen weit verbreiteten Methoden (z. B. Dialyse oder hydrophobe Adsorption) zwei entscheidende Vorteile in sich vereint. Zum Ersten ist diese Methode außerordentlich schnell und verhindert damit, dass das Protein zu lange im solubilierten Zustand gehalten wird, was zu erheblichen Aktivitätsverlusten führen kann. Zum Zweiten kann diese Methode in den Versuchen verwendet werden, bei denen die Proteine in einem Detergenz mit sehr niedriger

kritischer Mizellenkonzentration, wie Decylmaltosid oder Digitonin, solubilisiert werden.

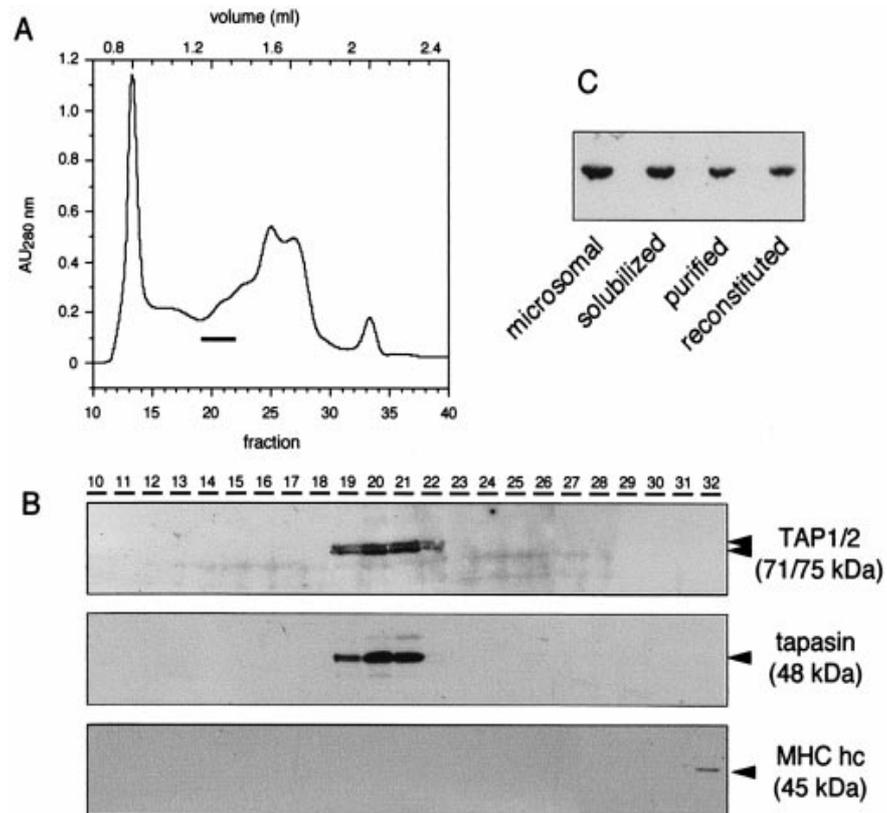


Abb. 7 Rekonstitution des TAP-Komplexes in Liposomen. **A.** Raji-Mikrosomen (6 mg/ml) wurden mit Decylmaltosid ($\rho=2$) solubilisiert und einer Gelfiltration (durch Superose[®] 6-Säule) unterzogen. **B.** 60 μ l große Fraktionen wurden gesammelt, anschließend wurde das Protein mit TCA gefällt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf dem Immunoblot analysiert, dabei wurden folgende Antikörper verwendet: monoklonaler Antikörper 148.3 gegen TAP1, monoklonaler Antikörper 435.3 gegen TAP2, monoklonaler Antikörper A1.4 gegen schwere Kette von MHC-Klasse I und monoklonaler Antikörper 7F6 gegen Tapasin. **C.** Um Rekonstitutionseffizienz zu testen, wurden gleiche Aliquots an Mikrosomen, Solubilisat, vereinigten TAP-haltigen Fraktionen (19-21) und Proteoliposomen auf ihr TAP Gehalt mit Hilfe eines Immunoblots (1:1 Gemisch von mAb 148.3 und 435.3) untersucht.

3.1.2 Charakterisierung der Proteoliposomen

Für die Charakterisierung von Proteoliposomen wurden Proteinbestimmungen, Lipidbestimmungen und Volumenbestimmungen der entstandenen Vesikel durchgeführt. Die meisten Proteoliposomen stellen unilamellare Vesikel dar, die ca. 100 nm im Durchmesser haben (Abb. 8).

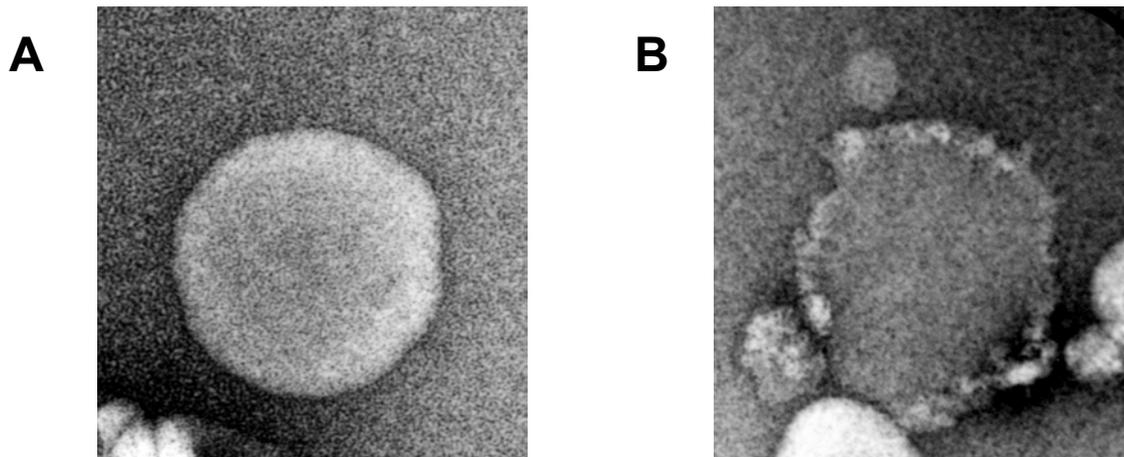


Abb. 8 Liposomen vor und nach der Rekonstitution. Kryo-Elektronenmikroskopie, durchgeführt in der Arbeitsgruppe von Dr. D. Madden (Universität Heidelberg). 50.000fache Vergrößerung. **A.** unilamellares Liposom (23% w/w Cholesterol, 10% w/w Phosphatidylsäure mit heterogenen Kettenlängen, 67% w/w Phosphatidylcholin mit heterogenen Kettenlängen). **B.** Proteoliposom nach der TAP-Rekonstitution (Proteineinbau an der rauhen Oberfläche erkennbar).

Um zu zeigen, welcher Prozentsatz an entstandenen Proteoliposomen (PL) unilamellar ist, wurden gleichzeitig die Messungen des Volumens und Phospholipidgehalts der Vesikel durchgeführt (Tab. 1). Als Anhaltspunkt wurde angenommen, dass ein Lipidmolekül die Fläche von 50 \AA^2 ($5 \times 10^{-19} \text{ m}^2$) annimmt (Albrecht *et al.*, 1978). Ein ca. 100 nm großes Proteoliposom müsste demnach ein Volumen von $0,5 \times 10^{-18} \text{ l}$ und eine Fläche von $3,1 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ haben. Ein solches Vesikel besteht aus zwei Lipidschichten (*bilayer*) und enthält somit $1,04 \times 10^5$ Lipidmolekülen. Es stellte sich heraus, dass ca. 90 % der Proteoliposomen unilamellar sind.

Gesamtvolumen (l)	Anzahl der PL	Anzahl der Lipidmolekülen	Lipidmenge (nmol)	unilamellare PL
$0,78 \times 10^{-6}$	$1,74 \times 10^{12}$	$2,15 \times 10^{17}$	430	93%
$0,52 \times 10^{-6}$	$1,18 \times 10^{12}$	$1,47 \times 10^{17}$	295	89%

Tab. 1. Anteil an unilamellaren Proteoliposomen. Das Volumen der Vesikel wurde durch den Einschluss der ^3H -markierten Mannose in die Proteoliposomen während der Rekonstitution bestimmt. Die Bestimmung des Phospholipidgehalts wurde anhand der Bartlett-Methode durchgeführt, es wurde angenommen, dass das Lipid-Verhältnis während der Rekonstitution unverändert bleibt und somit die Phospholipidanteile 77% des Gesamtlipids betragen.

3.1.3 Aktivität des rekonstituierten TAP-Komplexes

Die optimierte Rekonstitutionsmethode hat sich als sehr effizient erwiesen. In Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Peptiden, die unterschiedliche Affinitäten zu TAP besitzen, wurden die gleichen Affinitätswerte sowohl für mikrosomales TAP, als auch für rekonstituiertes TAP ermittelt (Tab. 2). Wie die Immunodetektion (Abb. 7C) und unabhängig davon die Peptidbindungsassays (Tab. 3) zeigen, wurden ungefähr 50% vom mikrosomalen TAP in die Proteoliposomen rekonstituiert. Das bedeutet, dass alle TAP-Moleküle in richtiger Orientierung (mit der Peptidbindungstasche nach außen gerichtet) in die Lipidvesikel inkorporiert worden sind. Zusätzlich wurde die Orientierung von TAP-Molekülen durch Proteinase-Protektionassay bestätigt.

Peptid	Peptidbindung K_D [nM]	
	Mikrosomen	Proteoliposomen
RRYQKSTEL	154 ± 9	164 ± 22
RRYNASTEL	503 ± 54	516 ± 52
EPGNTWDED	> 10 ⁶	> 10 ⁶

Tab. 2. Vergleich der Peptidbindungseigenschaften zwischen mikrosomalem und rekonstituiertem TAP. Die Bindungsaffinität von ausgewählten ¹²⁵Iod-markierten Peptiden wurde anhand von Sättigungsbindungsassays ermittelt.

Peptid	Bindungskapazität B_{max} [cpm/ng]		TAP Wiederfindungsrate
	Mikrosomen	Proteoliposomen	
RRYQKSTEL	0,469	3,245	49,7%
RRYNASTEL	0,465	3,184	50,2%

Tab. 3. Effizienz der TAP-Rekonstitution in die Proteoliposomen. Die Bindungskapazität von Mikrosomen und Proteoliposomen wurde anhand von Sättigungsbindungsassays unter Verwendung von ¹²⁵Iod-markierten Peptiden RRYQKSTEL bzw. RRYNASTEL ermittelt und bezieht sich auf ng Gesamtprotein.

Somit bleibt sowohl die Peptidbindungsaffinität zu TAP, als auch seine Peptidselektivität nach der Rekonstitution erhalten.

3.1.3.1 TAP-abhängiger Peptidtransport

Im Gegensatz zu Peptidbindung, die eine recht „stabile“ Eigenschaft des TAP-Komplexes darstellt, gelang es bisher nicht, den TAP-abhängigen Peptidtransport im rekonstituierten System nachzuweisen (Uebel *et al.*, 1997b; Stephens & Androlewicz, 1997). Zum ersten Mal konnte nach der optimierten Rekonstitution TAP-Aktivität nicht nur in Hinsicht auf Peptidbindung, sondern auch auf ATP-abhängigen Peptidtransport gezeigt werden (Abb. 9). Man kann ausschließen, dass es sich hierbei nur um die Bindung der Peptide an die Proteoliposomenoberfläche handelt, da kein Peptidtransport in Abwesenheit von ATP vorhanden ist. Die Hintergrund-Radioaktivität in Abwesenheit von ATP resultiert durch unspezifische Bindung von Peptiden sowohl an TAP als auch an die Proteoliposomenmembran. Transport ist peptidspezifisch und kann durch hohen Überschuss an unmarkiertem Peptid inhibiert werden. Außerdem kann der TAP-spezifische virale Inhibitor ICP47 den Transport blockieren.

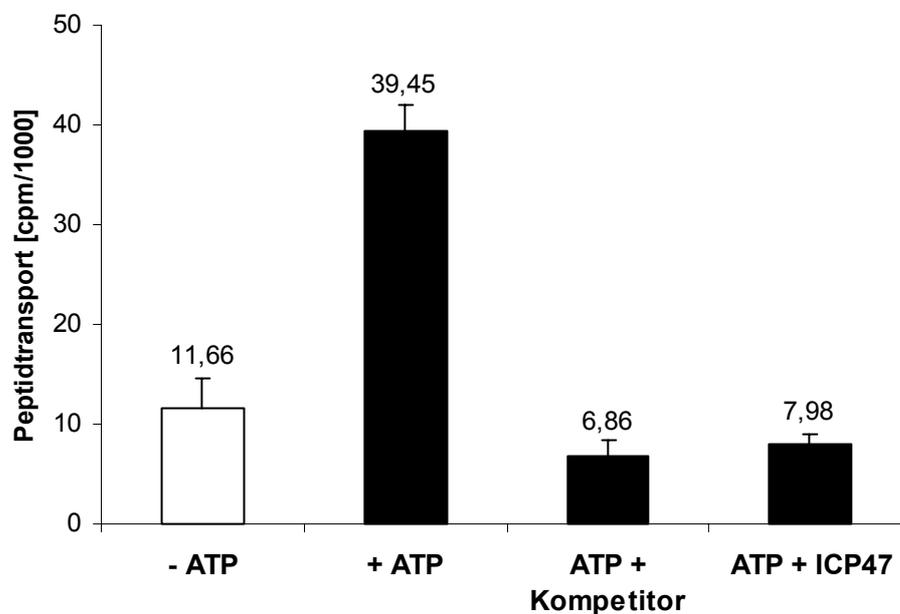


Abb. 9 ATP-abhängiger Peptidtransport in den Proteoliposomen. Der Peptidtransport in die Proteoliposomen wurde nach einer zweiminütigen Inkubation mit 1 μM ^{125}I -markiertem Peptid RRYNASTEL (K_D 516 nM), in Ab- (offener Balken) bzw. Anwesenheit (geschlossener Balken) von ATP (3 mM) bei 32°C gemessen. TAP-gebundenes, aber nicht transportiertes Peptid wurde mit 9 μM

unmarkierten Peptid RRYQKSTEL (K_D 164 nM) von den Bindungsstellen verdrängt. Um die TAP-Spezifität des Transports zu demonstrieren, wurde Transportassay nach der Preinkubation mit TAP-spezifischem Inhibitor ICP47 (10 μ M) durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

3.1.3.2 ATPase-Aktivität des TAP-Komplexes

ATPase-Aktivität des rekonstituierten TAP-Komplexes wurde anhand der Freisetzung des anorganischen Phosphats nach der Spaltung des $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ analysiert. Die Versuche wurden innerhalb von 4 Minuten durchgeführt, wo die Freisetzungsraten linear steigt, somit wurde sichergestellt, dass die Initialraten gemessen wurden. In Abwesenheit von Peptiden wurde Ouabain- und Natriumazid-insensitive ATPase-Aktivität der TAP-haltigen Proteoliposomen gemessen (Abb. 10). Diese basale Aktivität konnte durch Zugabe von Orthovanadat, einem Inhibitor der ABC-Transporter und P-Typ ATPasen, um 35-40% reduziert werden. Um den stimulierenden Einfluss der Peptide auf ATPase-Aktivität des TAP-Komplexes zu untersuchen, wurden zwei Peptide mit unterschiedlichen Bindungsaffinitäten zu TAP ausgewählt. Die Freisetzung des anorganischen Phosphats wurde in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Peptiden RRYQKSTEL (Affinitätskonstante $K_D = 164$ nM) und EPGNTWDED (Affinitätskonstante $K_D > 1$ mM) gemessen, die Substrate mit hoher bzw. sehr niedriger Affinität repräsentierten (Tab. 4). Das hochaffine Peptid stimuliert die vanadatsensitive ATP-Hydrolyse um Faktor 2-3, während das niederaffine Peptid keinen Einfluss auf die Freisetzung des anorganischen Phosphats ausübt (Abb. 10).

In Anwesenheit von Vanadat wurde keine Stimulation der ATPase-Aktivität sogar nach der Zugabe von hochaffinem Peptid RRYQKSTEL beobachtet, was auf die Inhibition des TAP-Komplexes durch den Vanadat-induzierten ADP-Vanadat-Komplex schließen lässt. Durch zusätzliche Experimente mit ICP47, einem TAP-spezifischen Protein des Herpes-Simplex-Virus, das die Peptidbindung an TAP verhindert und den TAP-Komplex destabilisiert, wurde die TAP-Spezifität der gezeigten ATPase-Stimulation nachgewiesen. Nach der Inkubation der Proteoliposomen mit ICP47 und anschließender Zugabe des hochaffinen Peptids wurde keine Stimulation der ATP-Hydrolyse beobachtet, weil die Peptidbindung an TAP durch ICP47 blockiert wurde. Interessanterweise blieb die basale Aktivität der TAP-haltigen Proteoliposomen durch ICP47 nicht beeinflusst, was zu der Annahme

führt, dass der TAP-Komplex keine eigene basale (d. h. in Abwesenheit von Substrat) ATPase-Aktivität besitzt. Dies zeigt, dass die basale Aktivität der Proteoliposomen durch die in der Präparation noch vorhandenen ER-ständigen ATPasen verursacht wird. Somit wurde eine durch Substrat stimulierbare, Vanadat-sensitve und TAP-spezifische ATPase-Aktivität in den Proteoliposomen nachgewiesen.

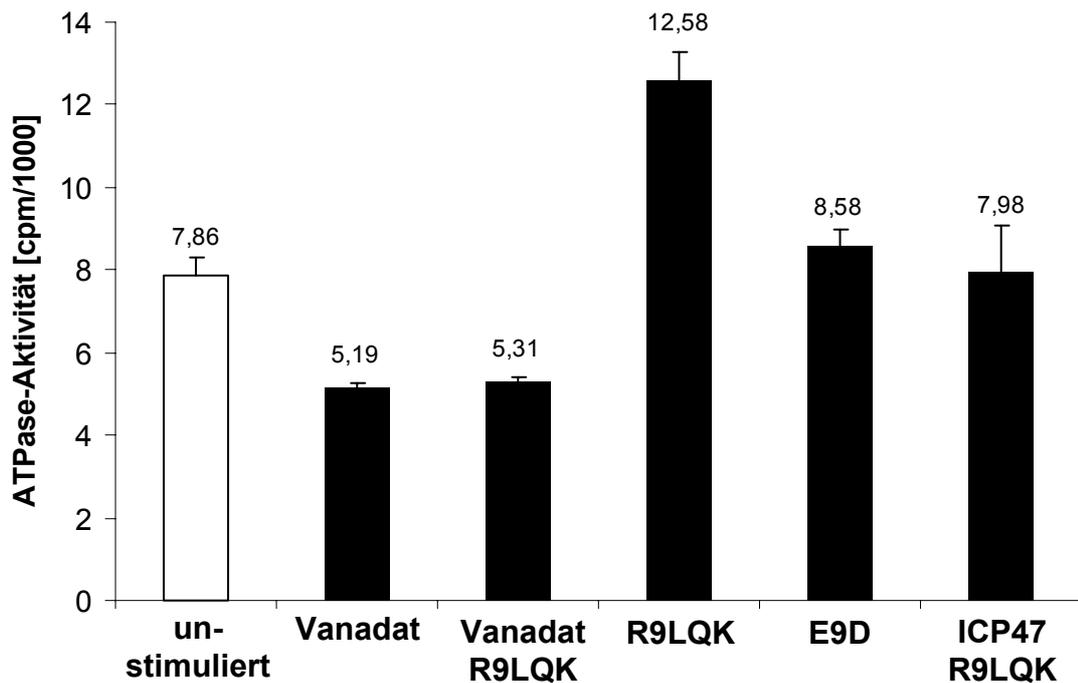


Abb. 10 Peptid-stimulierte ATPase-Aktivität des rekonstituierten TAP-Komplexes. Um die ATPase-Aktivität von TAP zu bestimmen wurde die Freisetzung des anorganischen Phosphats $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$ nach der Spaltung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ gemessen. Die Reaktionszeit betrug 4 min bei 32°C in Anwesenheit von 1.8 mM Ouabain/9 mM NaN_3 , 5 mM ATP und in An- bzw. Abwesenheit von Orthovanadat (1 mM) und/oder Peptiden R9LQK (Nonapeptid RRYQKSTEL, 0.8 μM), E9D (Nonapeptid EPGNTWDED, 8 μM). Um TAP-Spezifität zu demonstrieren, wurden die Proteoliposomen vor der Peptidzugabe 40 Minuten mit TAP-Inhibitor ICP47 (5 mM) inkubiert. Negativkontrolle (unstimuliert) wird durch den offenen Balken dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

3.1.3.2.1 Peptid-stimulierte ATP-Hydrolyse des TAP-Komplexes

Der Einsatz kombinatorischer Peptidbibliotheken sollte die Korrelation zwischen der TAP-Selektivität und der TAP-spezifischen ATP-Hydrolyse aufklären. Diese Bibliotheken wurden bereits erfolgreich benutzt, um das Bindungsmotiv von TAP zu

entziffern (Uebel *et al.*, 1997a; Uebel & Tampé, 1999). Die Abb. 11 zeigt nur eine kleine Auswahl von Subbibliotheken (X_8O), die am deutlichsten die Unterschiede in der Bindungsaffinität zwischen verschiedenen Peptiden demonstrieren. Alle Peptide wurden in einer Konzentration von $2.4 \mu\text{M}$ eingesetzt, welche der Durchschnittsaffinität (K_D) der kombinatorischen Zufallsbibliothek X_9 entsprach (Uebel *et al.*, 1997a). Die XRX_7 Subbibliothek mit dem für die TAP-Bindung bevorzugten Argininrest in der Position 2 ($K_D = 0.56 \mu\text{M}$) war in der Lage, die Vanadat-sensitive ATPase-Aktivität um das 2.5fache zu stimulieren. Gleiche Stimulation wurde auch mit den Subbibliotheken erreicht, die einen für die Bindung bevorzugten hydrophoben oder basischen Rest am C-terminalen Ende des Peptids tragen, wie zum Beispiel die Subbibliothek X_8Y , die ein Tyrosin in der Position 9 hat ($K_D = 0.29 \mu\text{M}$). Im Gegensatz dazu, die Subbibliotheken, die einen für die TAP-Bindung ungünstigen Rest tragen, wie zum Beispiel sterisch sperriges Prolin in der Position 2 (XPX_7 ; $K_D = 46 \mu\text{M}$) oder saueres C-terminale Aspartat (X_8D ; $K_D = 18 \mu\text{M}$) vermochten es nicht, eine messbare ATPase Stimulation zu bewirken. Somit spiegelt sich die TAP-Selektivität in der Stimulation der TAP-spezifischen ATP-Hydrolyse wider.

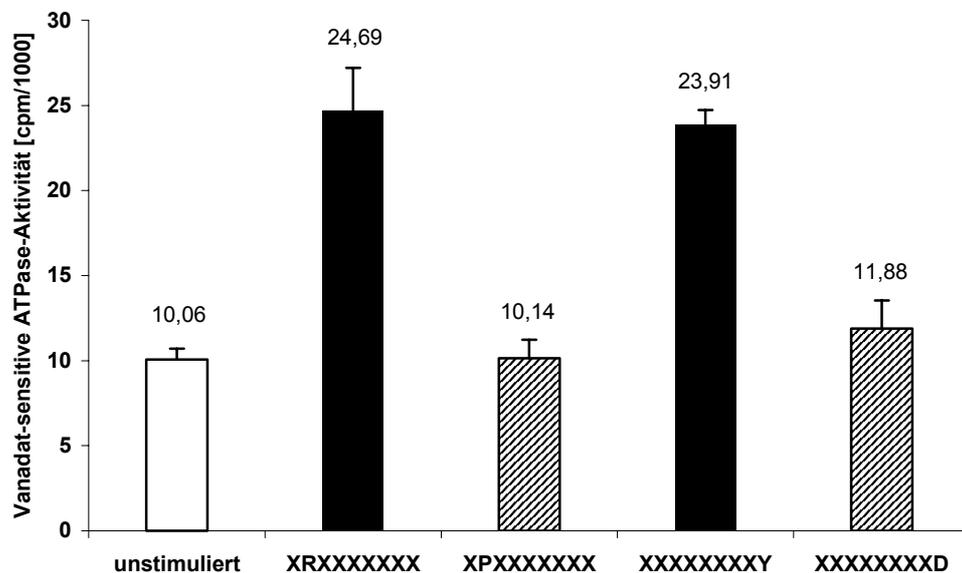


Abb. 11 Spezifität Vanadat-sensitiver ATPase-Aktivität, die mithilfe von kombinatorischen Peptidbibliotheken analysiert wurde. Die TAP-haltigen Proteoliposomen wurden mit kombinatorischen Peptidbibliotheken X_8O (2.4 mM) und 5 mM ATP inkubiert und die Vanadat-sensitive ATP-Hydrolyse wurde durch die Messung des freigesetzten anorganischen Phosphats $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$

nach der Spaltung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ gemessen. Negativkontrolle (unstimuliert) wird durch den offenen Balken, Peptide mit affinitätsteigenden Aminosäurenresten durch geschlossene Balken, die mit affinitätsenkenden Aminosäurenresten durch gestrichelte Balken dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

3.1.3.2.2 Kinetische Parameter der TAP-spezifischen ATP-Hydrolyse

Um die quantitativen Aspekte von TAP-spezifischer ATP-Hydrolyse zu untersuchen, wurde die ATPase-Aktivität bei verschiedenen Peptidkonzentrationen gemessen (Abb. 12). Drei Peptide wurden ausgewählt, die Substrate mit hoher (RRYQKSTEL; $K_D = 164 \text{ nM}$), mittlerer (RRYNASTEL; $K_D = 516 \text{ nM}$) und niedriger Affinität (EPGNTWDED; $K_D > 1 \text{ mM}$) repräsentieren sollten. Die ATPase-Aktivität von TAP zeigt eine hyperbolische Abhängigkeit von der eingesetzten Peptidkonzentration, wenn hoch- und mittelaaffine Peptide verwendet wurden. Die Peptidkonzentration, bei der die halbmaximale Stimulierung der TAP-spezifischen ATP-Hydrolyse erreicht wird ($K_{m,pep}$), beträgt für das hochaffine Peptid RRYQKSTEL $161 \pm 15 \text{ nM}$ und für das mittelaaffine Peptid RRYNASTEL $574 \pm 132 \text{ nM}$. Für das niederaffine Peptid EPGNTWDED konnte nur die untere Grenze der ATPase-Stimulation bestimmt werden. Die $K_{m,pep}$ Werte beziehen sich nicht auf die klassische Michaelis-Menten-Konstante K_M für die ATP Hydrolyse, sondern auf die halbmaximale Peptid-stimulierte ATPase-Aktivität, die erreicht wird, wenn 50% der Peptidbindungsplätze von TAP besetzt sind.

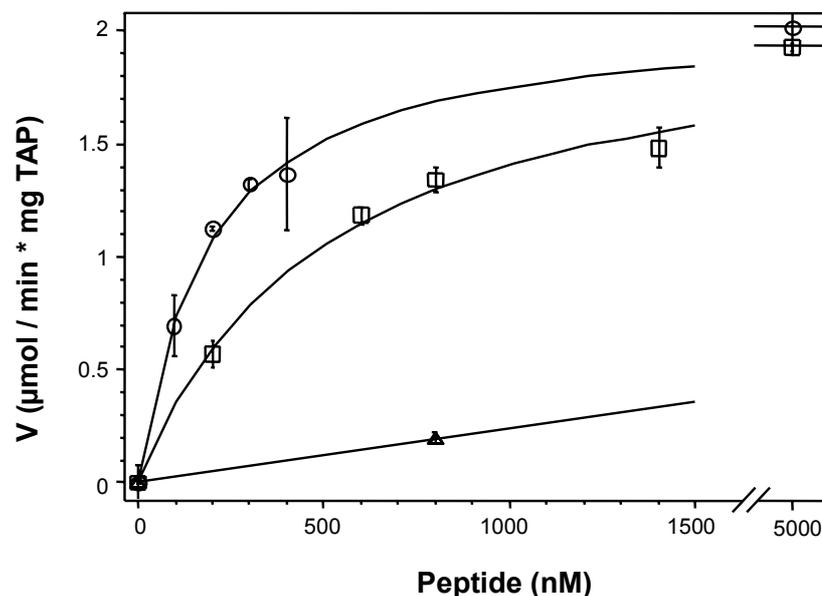


Abb. 12 Allosterische Kopplung zwischen Peptidbindung und ATPase-Aktivität von TAP. Die Freisetzung des anorganischen Phosphats $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$ nach der Spaltung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wurde nach 4 min Inkubation bei 32°C in Anwesenheit von verschiedenen Peptiden und 5 mM ATP gemessen. Die Peptide RRYQKSTEL (Kreise), RRYNASTEL (Rechtecke) und EPGNTWDED (Dreiecke) repräsentieren hoch-, mittel- und niederaffine Substrate. Die halbmaximale Stimulation der ATPase-Aktivität ($K_{m,\text{pep}}$) wurde für RRYQKSTEL bei 161 ± 15 nM und für RRYNASTEL bei 574 ± 132 nM erreicht. Für das niederaffine Peptid EPGNTWDED konnte nur die untere Grenze der ATPase-Stimulation bestimmt werden. Die maximale Hydrolysegeschwindigkeit, die durch die Peptide RRYQKSTEL und RRYNASTEL erreicht werden kann (V_{max}), ist gleich und beträgt ca. $2 \mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg TAP. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Die maximale Stimulationsgeschwindigkeit, die durch Besetzung aller Peptidbindungsplätze von TAP erreicht wird (V_{max}), beträgt sowohl für RRYQKSTEL, als auch für RRYNASTEL ca. $2 \mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg TAP (Abb. 12, Tab. 4). Die direkte Korrelation zwischen der Peptidbindungsaffinität und der ATPase-Aktivität zeigt deutlich, dass Peptidbindung die Schlüsselrolle bei der Stimulation der ATP-Hydrolyse spielt.

	Peptidbindung	ATPase-Aktivität	
Peptide	K_D [nM]	$K_{m,\text{pep}}$ [nM]	$V_{\text{max,pep}}$ [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg TAP}$]
RRYQKSTEL	154 ± 9	161 ± 15	2.02 ± 0.13
RRYNASTEL	503 ± 54	574 ± 134	1.93 ± 0.02
EPGNTWDED	$> 10^6$	$> 10^6$	n.d.

Tab. 4. Stimulation der TAP-spezifischen ATP-Hydrolyse durch Peptide mit verschiedenen Bindungsaffinitäten.

Um die kinetischen Parameter TAP-spezifischer ATPase-Aktivität zu bestimmen wurde die ATP-Hydrolyse in An- bzw. Abwesenheit von sättigenden Mengen des hochaffinen Peptides RRYQKSTEL ($1 \mu\text{M}$) bei verschiedenen Konzentrationen ($0\text{--}10$ mM) von ATP gemessen. Der Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Reaktionsansätzen wurde gegen die ATP-Konzentration aufgetragen und konnte zu einer Michaelis-Menten-Kinetik hyperbolisch gefittet werden, wobei der K_m -Wert 0.3 ± 0.06 mM betrug (Abb. 13). Durch Einbezug der TAP-

Konzentration in den getesteten Proteoliposomen, die durch Sättigungsbindungsassay ermittelt wurde, konnte die maximale ATP-Hydrolysegeschwindigkeit von 2 $\mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg TAP berechnet werden. Zusammengenommen führen diese Daten zu einer Umsetzungsrate von 5 ATP-Molekülen pro 1 TAP-Molekül pro Sekunde, was einer katalytischen Aktivität von $20,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ entspricht.

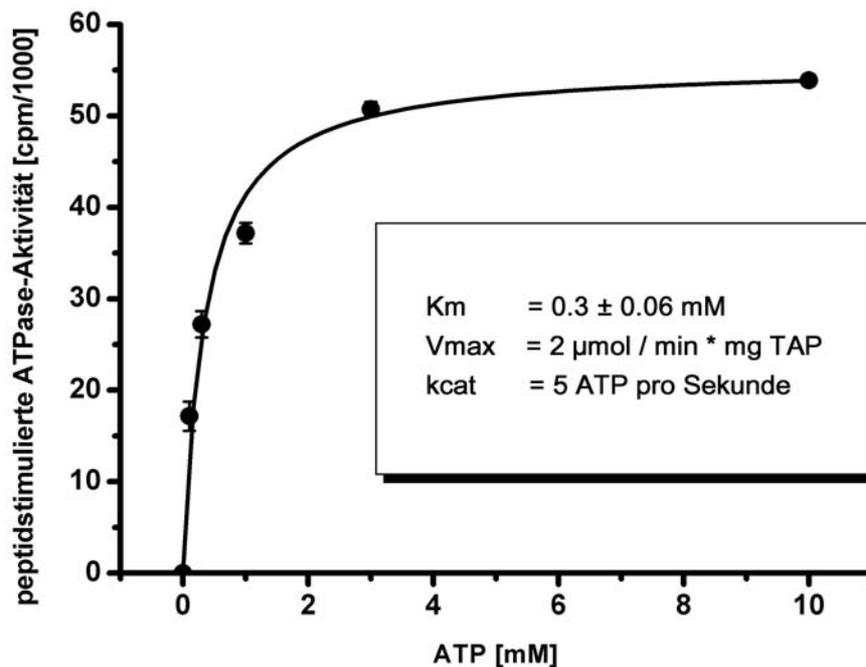


Abb. 13 Kinetische Parameter ATPase-Aktivität von TAP. Die Freisetzung des anorganischen Phosphats $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$ nach der Spaltung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wurde nach 4 min Inkubation bei 32°C in An- bzw. Abwesenheit von hochaffinem Peptid RRYQKSTEL (in Sättigungskonzentration von $1 \mu\text{M}$) bei verschiedenen ATP-Konzentrationen gemessen. Der Peptid-stimulierte Anteil der ATP-Hydrolyse wurde gegen die ATP-Konzentration aufgetragen und hyperbolisch gefittet. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

3.1.3.2.3 Stimulation durch verzweigte Peptide

Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob die Peptidbindung allein für die Stimulation der ATP-Hydrolyse verantwortlich ist, oder ob es darauf folgende weitere Prozesse diese Stimulation auch beeinflussen können. Für diesen Zweck wurden sterisch sperrige Peptide eingesetzt. Diese Peptide basieren auf dem Nonapeptid ARDNATKDY, das am ϵ -Amin des Lysinrestes eine Polylysinkette trägt (Abb. 14). Die Länge der Polylysinkette variiert zwischen 0 und 20

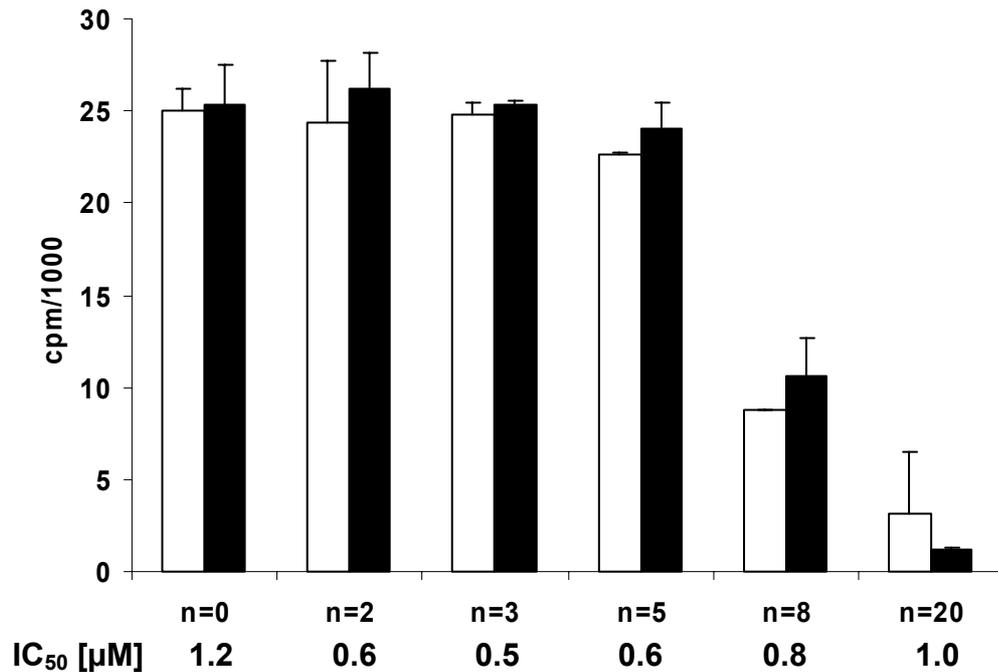


Abb. 15 ATPase-Stimulation und Transport von verzweigten Peptiden. Um die Korrelation zwischen ATPase-Stimulation (offene Balken) und Peptidtransport (geschlossene Balken) zu studieren, wurde die Freisetzung des anorganischen Phosphats $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$ nach der Spaltung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und Peptidtransport nach 4 min Inkubation bei 32°C in An- bzw. Abwesenheit von 2.5 mM Peptid ARDNATK($\epsilon\text{-K}_n$)DY, das die Polylysineseitenketten unterschiedlicher Länge trägt, gemessen. Die IC₅₀-Werte wurden in einem Kompetitionsbindungsassay bestimmt, wobei das Peptid RRYQKSTEL als Reporterligand diente. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

3.1.4 Stöchiometrie des Transportvorganges

Die Untersuchungen der kinetischen Parameter und die Berechnung der Umsatzrate TAP-spezifischer ATP-Hydrolyse ließen noch eine wichtige Frage offen. Die exakte Stöchiometrie des Transportvorganges sollte geklärt werden, das heißt, es sollte berechnet werden, wie viele ATP-Moleküle gespalten werden müssen, um 1 Peptid über die ER-Membran zu transportieren. Dafür wurde die Peptid-stimulierte ATP-Hydrolyse und Peptidtransport an gleichen Proben von TAP-haltigen Proteoliposomen gemessen. Die Anzahl der transportierten Peptide lässt sich direkt berechnen, da 100% des eingesetzten Peptides radioaktiv markiert war und 1 μl (3.5 pmol) misste 366.410 cpm. Um die Anzahl der gespaltenen ATP-Moleküle zu kalkulieren, wurde die Radioaktivität von 1 nmol $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ gemessen, die 769.501 cpm betrug. Daraus wurde die Menge des hydrolysierten ATP (4.16 pmol/min) und die Menge des transportierten Peptides (0,664 pmol/min) berechnet, was zu einer

Stöchiometrie von 63 ATP:1 Peptid führt (Abb. 16); ein unerwartetes Ergebnis, das keinen bekannten Daten aus der ABC-Transporter-Familie entsprach und sich mechanistisch schwer begründen ließ.

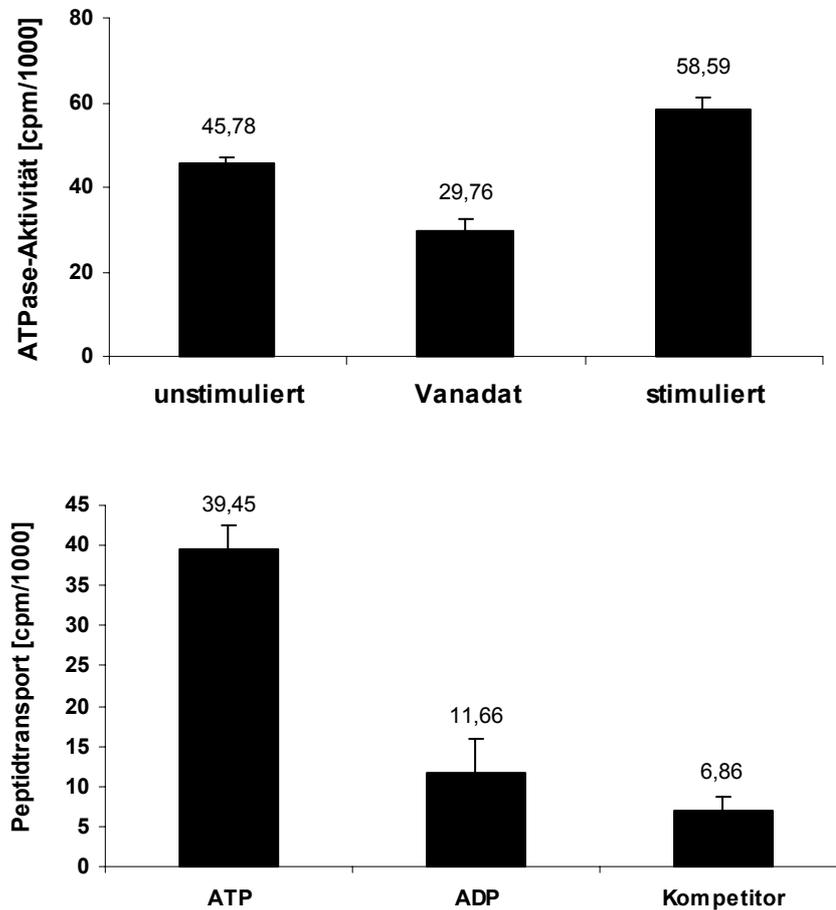


Abb. 16 ATP-Hydrolyse und Peptidtransport in den Proteoliposomen. Um die Stöchiometrie der Peptidtranslokation zu berechnen, wurde die Freisetzung des anorganischen Phosphats $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$ nach der Spaltung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in An- bzw. Abwesenheit von $1\ \mu\text{M}$ Peptid RRYQKSTEL (oben) und Transport von RRYQKSTEL nach 4 min Inkubation bei 32°C (unten) ermittelt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte die verfälschte Anzahl der transportierten Peptidmoleküle sein, die aufgrund eines Rücktransportes durch einen Peptidexporter, niedriger als die tatsächliche erschien. Dieser Peptidexporter hätte mit dem TAP-Komplex zusammen mitisoliert und in die Proteoliposomen mitrekonstituiert werden können. Diese Hypothese wurde durch die Versuche unterstützt, bei denen die Peptidkonzentration in Proteoliposomen gemessen wurde. Das Volumen der Proteosomen wurde durch den Einschluss von tritiummarkierter

Mannose während der Rekonstitution kontrolliert. Wenn die Akkumulation von transportierten Peptiden im Inneren der Proteoliposomen nicht erreichbar gewesen wäre, hätte das mit hoher Wahrscheinlichkeit bedeutet, dass ein Peptidexporter dem TAP entgegenwirkt. Und tatsächlich, konnten bei solchen Versuchen (Abb. 17 und Tab. 5) innerhalb von Proteosomen Peptidkonzentration gemessen werden, die mit der Außenpeptidkonzentration vergleichbar waren.

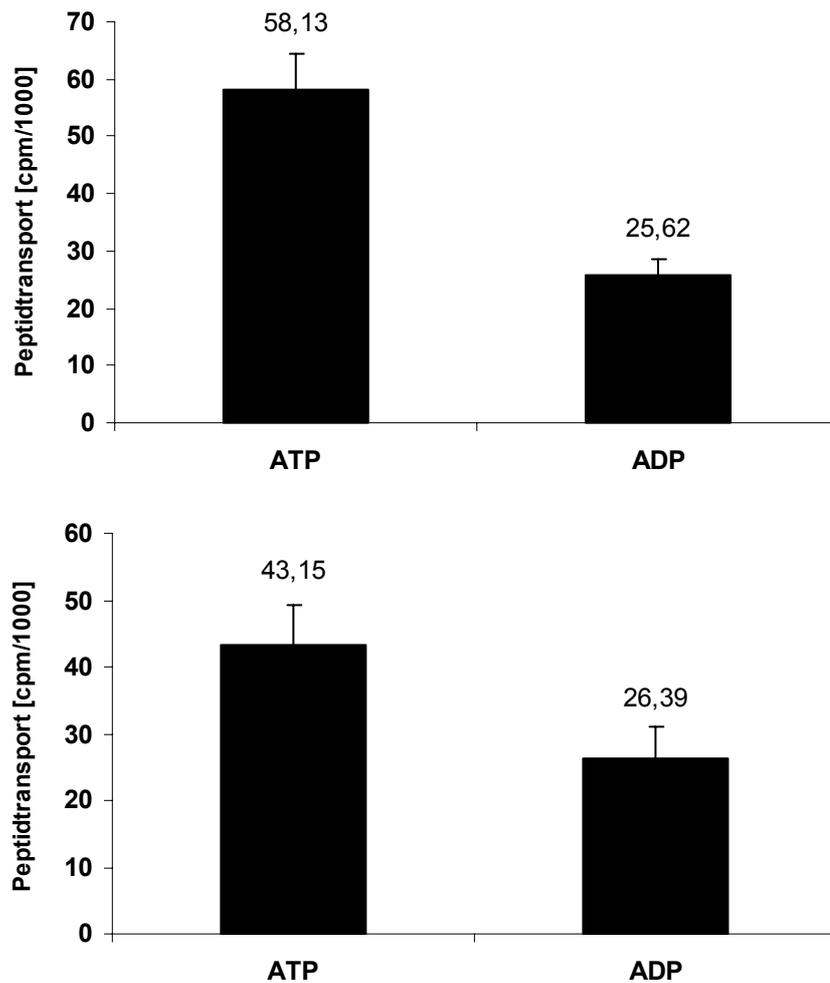


Abb. 17 Peptidtransport in den Proteoliposomen. Transport von radioaktiv-markiertem RRYQKSTEL wurde nach 4 min Inkubation bei 32°C im γ -Zähler gemessen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Probenvolumen ($V_{\text{total}} / 4$) [l]	cpm / 3,45 pmol Peptid (1 μ l 3,45 μ M)	Transportiertes Peptid [cpm] (ATP-ADP)	Transportiertes Peptid [pmol] (ATP-ADP)	C_{Peptid} Außen [nM]	C_{Peptid} Innen [nM]
$0,26 \times 10^{-6}$	348.603	32.507	0,32	1000	1237
$0,53 \times 10^{-6}$	348.603	46.765	0,46	1000	876

Tab. 5 Peptidkonzentration in den Proteoliposomen. Transport von radioaktiv-markiertem RRYQKSTEL wurde nach 4 min Inkubation bei 32°C im γ -Zähler gemessen. Probenvolumen wurde durch den Einschluss von ^3H -markierter Mannose in die Proteoliposomen während der Rekonstitution bestimmt.

Kürzlich beschriebener (Koopmann *et al.*, 2000) Export von Antigenpeptiden aus dem ER, der durch den Sec61-Komplex vermittelt wird, gab den Anlass zu überprüfen, ob dieser Komplex möglicherweise zusammen mit TAP isoliert und in die Proteoliposomen rekonstituiert werden konnte. Für diesen Zweck wurden die einzelnen Fraktionen nach der partiellen TAP-Aufreinigung auf die Präsenz von Sec61 α , des Hauptbestandteiles von Sec61-Komplex getestet (Abb. 18). Es stellte sich heraus, dass gut detektierbare Mengen von Sec61 α in den gleichen Fraktionen vorzufinden waren, wie der TAP-Komplex. Die TAP-haltigen Fraktionen wurden für die Rekonstitution verwendet und das führte dazu, dass der Sec61-Komplex auch in die Proteoliposomen korekonstituiert wurde. Sec61 α scheint über die ganzen Gelfiltrationsfraktionen fast gleichmäßig verteilt zu sein.

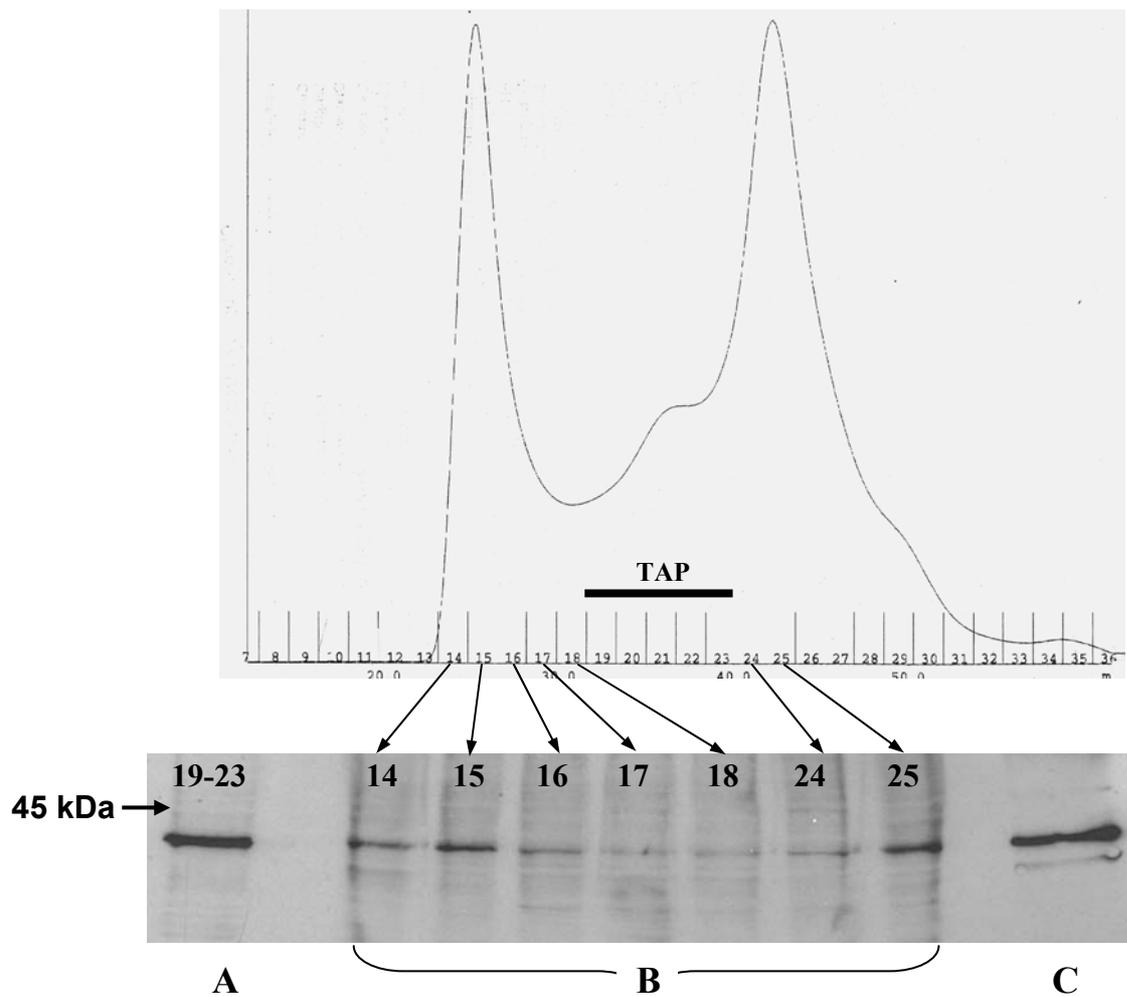


Abb. 18 Immunodetektion von Sec61 α . Verschiedene Fraktionen nach der partiellen TAP-Aufreinigung durch die Gelfiltration wurden mit einem anti-Sec61 α – Antikörper auf einem Western Blot getestet. **A.** Vereinigte TAP-haltige Fraktionen (im Chromatogramm durch einen schwarzen Balken dargestellt), die für weitere Rekonstitution verwendet wurden (Fraktionen 19-23) **B.** Fraktionen 14-18 und 24-25 **C.** Positivkontrolle – Mikrosomen aus Raji-Zellen.

Um den Sec61-Komplex auszuschalten und die tatsächlichen Transportraten messen zu können, wurde versucht, den Peptidexporter zu blockieren, indem die gegen Sec61 α gerichteten polyklonalen Antikörper direkt zu dem Transportassay gegeben wurden (Abb. 19). Dies hatte aber keine Auswirkung auf die Effizienz des Peptidtransportes. Als mögliche Ursachen kommen in Betracht zum Beispiel zu kurze Inkubationszeit, bedingt durch die begrenzte Zeit des Transportassays, Abschirmung von Antikörper-Epitop auf dem Zielprotein durch andere Komponente des Sec-Translokation-Komplexes oder sogar die Möglichkeit, dass der gebundene Antikörper keinen Einfluss auf die Exportaktivität des Sec61-Komplexes hat.

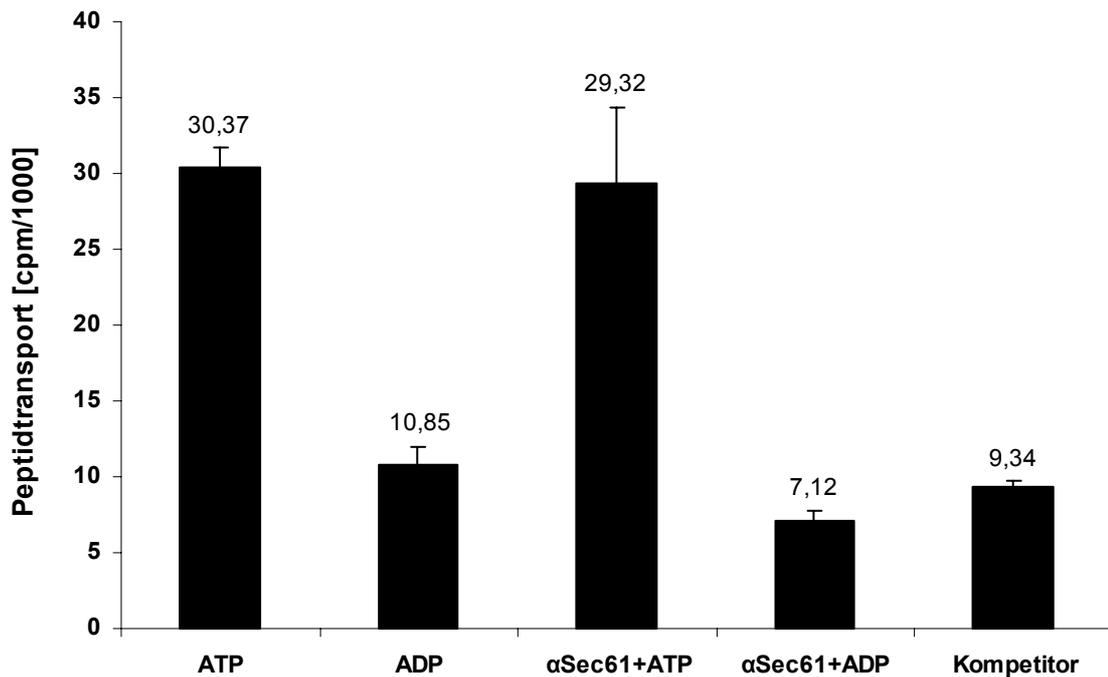


Abb. 19 Einfluss von anti-Sec61 α -Antikörper auf Peptidtransport in den Proteoliposomen. Transport von radioaktiv-markiertem RRYQKSTEL wurde nach 4 min Inkubation bei 32°C im γ -Zähler gemessen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Im nächsten Ansatz wurden wieder die anti-Sec61 α -Antikörper verwendet, diesmal aber um den Sec61-Komplex aus den TAP-haltigen Fraktionen des Solubilisats zu entfernen. Diese Fraktionen wurden einer weiteren Gelfiltration durch eine Säule unterzogen, an der die anti-Sec61 α -Antikörper immobilisiert wurden. Wie die Abb. 20 zeigt, behielt so behandeltes TAP nach der Rekonstitution die volle Transportaktivität, und die Transporteffizienz wurde enorm verbessert – das Verhältnis zwischen dem in Anwesenheit von ATP transportierten Peptid und dem in Anwesenheit von ADP gebundenen Peptid betrug ungefähr 20:1 (im Vergleich zu dem in Abb. 16 in Anwesenheit von Sec61-Komplex gezeigten Verhältnis 3,5:1).

Um zu testen, ob Sec61 tatsächlich aus dem Solubilisat entfernt wurde und nicht mehr in Proteoliposomen gelangen konnte, wurde Immunodetektion von Sec61 α bei jedem Rekonstitutionsschritt durchgeführt (Abb. 21). Dabei wird deutlich, dass der Sec61-Komplex fast vollständig entfernt werden konnte. Man beachte, dass in Abb. 21 im Spur D die fünffache Menge an Protein im Vergleich zu

den Spuren A-C auf das SDS-Gel aufgetragen wurde, nur so konnte der Sec61-Komplex in den Proteoliposomen überhaupt detektiert werden.

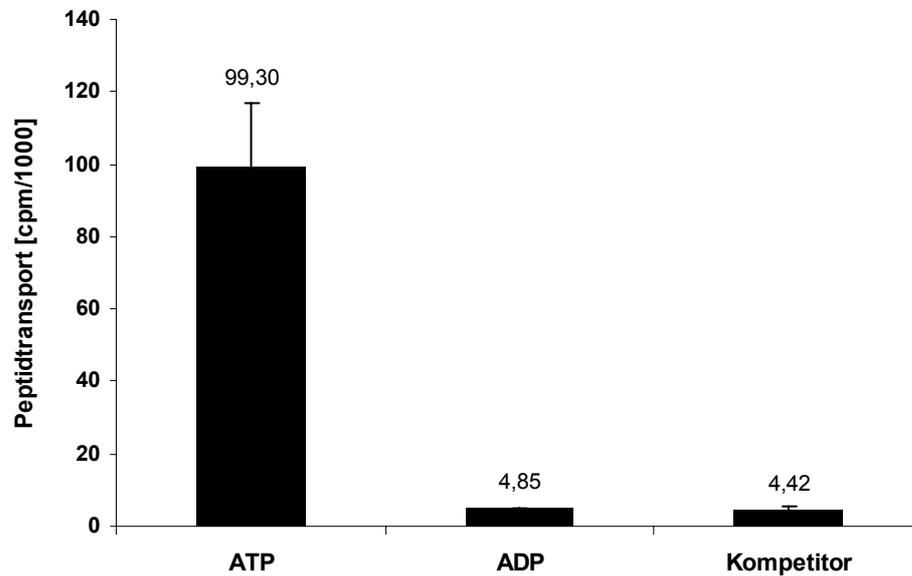


Abb. 20 Peptidtransport in den Proteoliposomen nach der Sec61-Entfernung. Transport von radioaktiv-markiertem RRYQKSTEL wurde nach 4 min Inkubation bei 32°C im γ -Zähler gemessen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

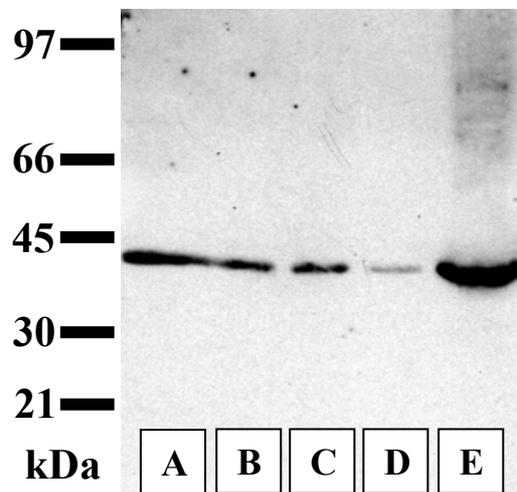


Abb. 21 Immunodetektion von Sec61 α bei verschiedenen Schritten der Rekonstitution. Die Detektion wurde mithilfe eines polyklonalen anti-Sec61 α -Antikörpers nach einer SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. **A.** 20% des gesamten Überstandes nach der Solubilisierung der Mikrosomen aus den Raji-Zellen und anschließender Zentrifugation bei 20.000 x g. **B.** 20% des gesamten Pellets nach der Solubilisierung der Mikrosomen aus den Raji-Zellen und anschließender Zentrifugation bei 20.000 x g. **C.** 20% der gesamten vereinigten TAP-haltigen Fraktion nach der

Gelfiltration durch die Sepharose-Säule. **D.** Gesamte Proteoliposomen nach der Rekonstitution **E.** Positivkontrolle – Mikrosomen aus den Raji-Zellen (102 µg Gesamtprotein).

Der Einfluss von Sec61-Komplex auf die Stöchiometrie-Werte des Peptidtransports wurde besonders deutlich in dem nachfolgenden Versuch demonstriert. Wie die Abb. 22 zeigt, wird viel weniger ATP hydrolysiert, dafür aber gelangen mehr Peptide ins Innere der Proteoliposomen. Durch die Normierung auf die radioaktive ATP bzw. Peptidstandards (1 nmol [γ - 32 P]ATP misste 591.667 cpm, 1 pmol Peptid – 77.196 cpm) kann man die Menge an transportiertem Peptid (2.05 pmol) und hydrolysiertem ATP (7.8 pmol) ausrechnen. Das führt zu einem Verhältnis von 3.8-3.9 ATP-Molekülen pro transportiertes Peptid.

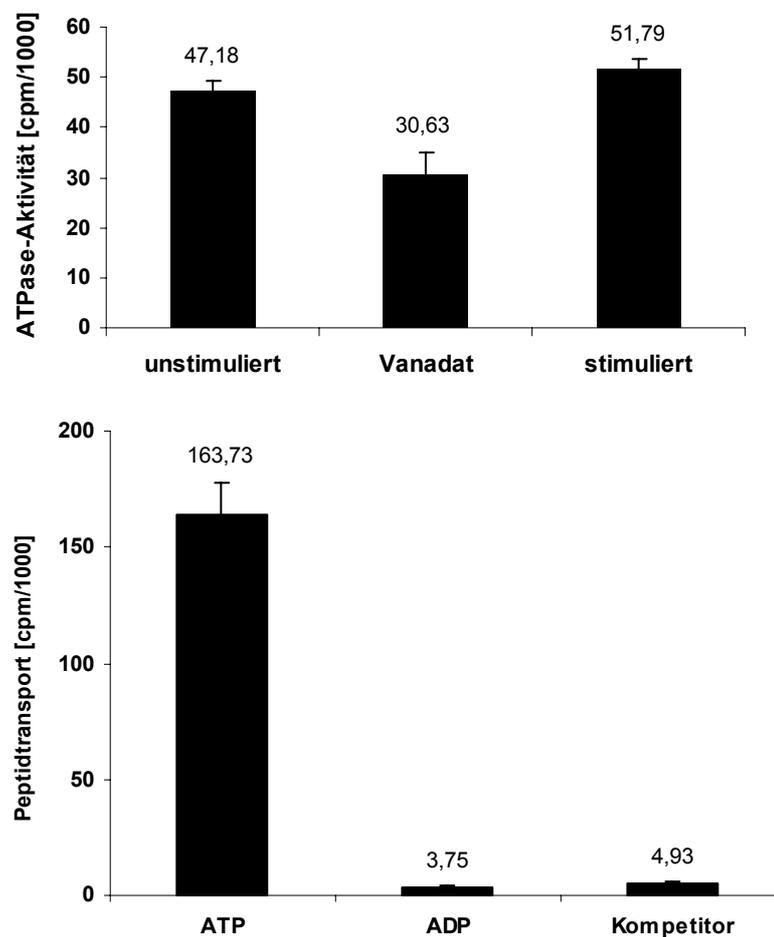


Abb. 22 ATP-Hydrolyse und Peptidtransport in den Sec-61-bereinigten Proteoliposomen. Um die Stöchiometrie der Peptidtranslokation zu berechnen, wurde die Freisetzung des anorganischen Phosphats γ - 32 P_i nach der Spaltung von [γ - 32 P]ATP in An- bzw. Abwesenheit von 1 µM Peptid RRYQKSTEL (oben) und Transport von RRYQKSTEL nach 4 min Inkubation bei 32°C (unten) ermittelt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

3.2 Untersuchungen des viralen TAP-Inhibitors US6

US6 ist ein virales Typ-I-Membranglykoprotein, das den Peptidtransport von TAP blockiert. Der genaue Mechanismus dieses Inhibitors sollte durch die Korekonstitution von TAP und der aktiven Domäne (ER-luminale Domäne) von US6 - US6(Δ 147-183) in Liposomen und anschließende Aktivitätstests untersucht werden. Diese Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Christoph Kyritsis durchgeführt, der das rekombinante US6(Δ 147-183) in *E. coli* exprimiert, aus den *inclusion bodies* aufgereinigt und rückgefaltet hat (Kyritsis *et al.*, 2001). Die schonende Solubilisierung von TAP durch Decylmaltosid hat es ermöglicht, die ER-luminale Seite von TAP für die US6(Δ 147-183)-Bindung zugänglich zu machen, ohne den Aktivitätsverlust durch das Herauslösen aus der Membran befürchten zu müssen. Danach folgte die Korekonstitution von löslichem US6(Δ 147-183) und solubiliertem TAP aus den Raji-Zellen in die Lipidvesikel (s. 2.2.4.7.2 und (Kyritsis *et al.*, 2001)).

3.2.1 Lokalisierung von US6(Δ 147-183) in den Proteoliposomen

Die Lokalisierung von US6(Δ 147-183) nach der Rekonstitution war notwendig, da der Inhibitor *in vivo* für die Blockierung des TAP-spezifischen Peptidtransports an die luminale Seite von TAP, die sich im Inneren der Proteoliposomen befindet (s. 1.4), binden muss (Ahn *et al.*, 1997). Die Lokalisierung von US6(Δ 147-183) wurde anhand des Proteinase-Schutzassays durchgeführt, der gezeigt hat, dass US6(Δ 147-183) gegen den Abbau durch Proteinase K nach deren Zugabe zu den Proteoliposomen geschützt war. Durch die Behandlung von Proteoliposomen mit Detergenz (1% NP40) wurden die Proteoliposomen solubilisiert und so wurde US6(Δ 147-183) für Proteinase K zugänglich (Abb. 23). Daraus kann man schließen, dass das korekonstituierte US6(Δ 147-183) sich im Inneren der Proteoliposomen befand.

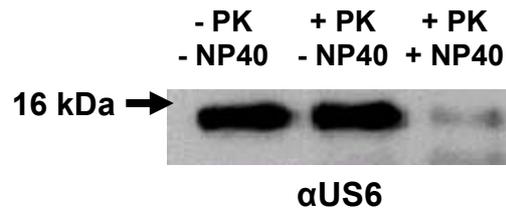


Abb. 23 Lokalisierung von US6(Δ 147-183) in den Proteoliposomen. US6(Δ 147-183) wurde nach der Rekonstitution mit dem polyklonalen anti-US6-Antikörper detektiert und durch Immunfärbung visualisiert. In Abwesenheit von NP40 befindet sich US6(Δ 147-183) im Inneren der Proteoliposomen und kann nicht durch die Proteinase K abgebaut werden. Durch Zugabe von NP40 werden die Proteoliposomen zerstört und US6(Δ 147-183) wird fast vollständig durch Proteinase K verdaut.

3.2.2 US6(Δ 147-183) inhibiert den TAP-spezifischen Peptidtransport

Der Einfluss von US6(Δ 147-183) auf den TAP-spezifischen Peptidtransport *in vitro* wurde in einem Transportassay untersucht (Abb. 24). US6(Δ 147-183) vermag es, die Transportaktivität von TAP nahezu vollständig zu blockieren. In Anwesenheit von rekombinantem US6(Δ 147-183) vermindert sich der ATP-abhängige Peptidtransport um ca. 70%. Als Negativkontrolle wurden parallel die Versuche mit rekonstituierten TAP und BSA durchgeführt, um den Einfluss von unspezifischen Protein-Protein-Interaktionen auszuschließen. Wie erwartet, wurde durch BSA, im Gegensatz zu US6, keine Inhibition des Transporters hervorgerufen.

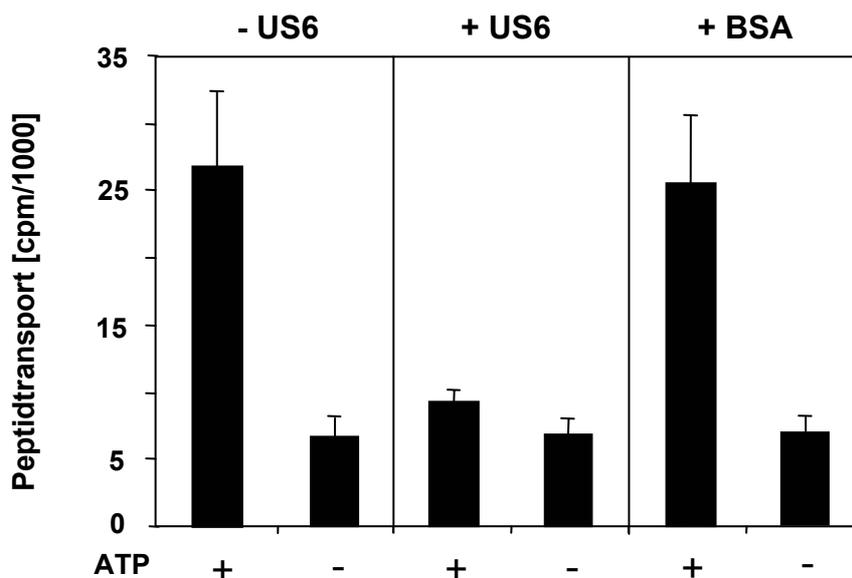


Abb. 24 US6(Δ 147-183) blockiert den TAP-spezifischen Peptidtransport. In Anwesenheit von US6(Δ 147-183) sinkt der ATP-abhängige Peptidtransport um ca. 70%. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen. Die unspezifischen Protein-

Protein-Wechselwirkungen sind ausgeschlossen, da die Inhibition nur in Anwesenheit von US6, aber nicht anderen Proteinen auftritt.

Um auszuschließen, dass die Transportinhibition durch die spezifische oder unspezifische Störung der Peptidbindung an TAP hervorgerufen worden war, wurde die Bindung von hochaffinem Peptid RRYQNSTEL an TAP bei zwei verschiedenen Konzentration (100 nM and 2000 nM) gemessen (Abb. 25). Dabei hatte die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von US6(Δ 147-183) keinen Einfluss auf die Menge des gebundenen Peptides. Die unspezifische Peptidbindung von radioaktiv-markiertem RRYQNSTEL kann durch die Zugabe eines 400fachen molaren Überschuss an unmarkiertem Kompetitorpeptid gemessen werden.

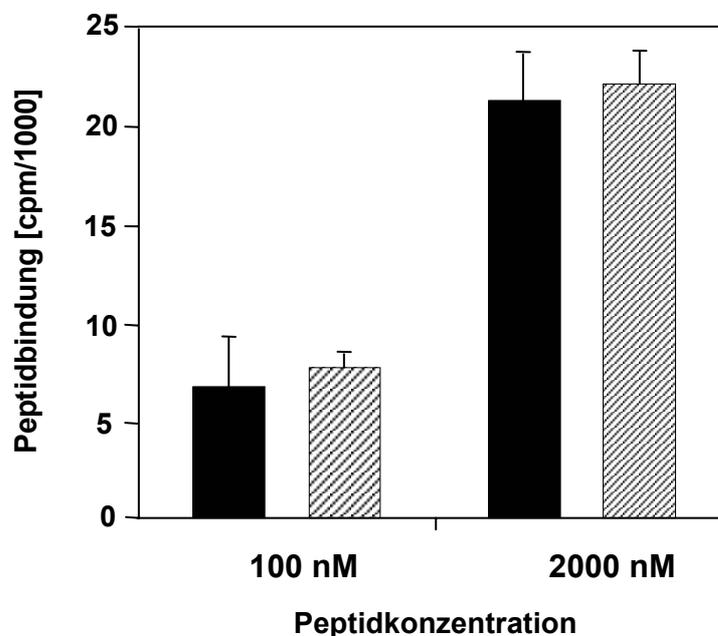


Abb. 25 Peptidbindung an TAP wird von US6(Δ 147-183) nicht beeinflusst. Die Peptidbindung an TAP ändert sich nicht in Anwesenheit von US6(Δ 147-183). Die Peptidbindung von Peptid RRYQNSTEL an TAP wurde in Anwesenheit (geschlossene Balken) und Abwesenheit von US6(Δ 147-183) (gestrichelte Balken) bei zwei verschiedenen Konzentrationen (100 nM and 2000 nM) gemessen. Die Menge an gebundenem Peptid steigt mit der Peptidkonzentration. Die unspezifische Bindung wurde durch die Zugabe eines 400fachen molaren Überschuss an unmarkiertem Kompetitorpeptid gemessen (im Diagramm bereits abgezogen). US6(Δ 147-183) hat keinen Einfluss weder auf die Peptidbindung noch auf den nichtkompetitierenden Hintergrund. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

3.2.3 US6(Δ 147-183) inhibiert ATPase-Aktivität von TAP

Um den Inhibitionsmechanismus besser zu verstehen, wurde untersucht, ob die ATP-Hydrolyse durch TAP von US6 beeinflusst wird (Abb. 26). Die Messungen von ATPase-Aktivität von TAP in den Proteoliposomen ergaben, dass die Peptid-stimulierte ATP-Hydrolyse in Anwesenheit von US6(Δ 147-183) um 91% zurückging.

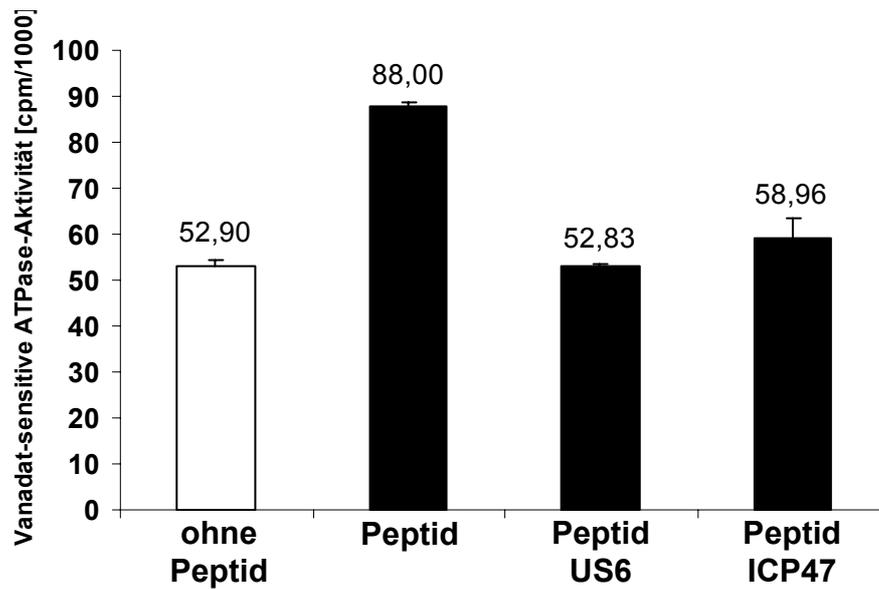


Abb. 26 Die ATPase-Aktivität von TAP wird in Anwesenheit von US6(Δ 147-183) gehemmt. Die Orthovanadat-sensitive Peptid-stimulierte ATPase-Aktivität von TAP wird fast vollständig durch die Bindung von mitrekonstituiertem US6 an TAP blockiert. Um TAP-Spezifität zu demonstrieren, wurden die Proteoliposomen vor der Peptidzugabe 40 Minuten mit TAP-Inhibitor ICP47 (5 mM) inkubiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

4 Diskussion

Der TAP-Komplex spielt eine zentrale Rolle bei der MHC-Klasse-I-vermittelten Antigenpräsentation. Zusätzlich dient der Antigenpeptid-Transporter als Modell für eng verwandte ABC-Transporter, die in medizinisch relevante Prozesse wie Multidrogenresistenz (MDR1) (Endicott & Ling, 1989; Gottesmann & Pastan, 1993), Mukoviszidose (CFTR) (Collins, 1992), Tangier-Krankheit (ABC1) (Rust *et al.*, 1999), Morbus Stargardt (ABCR) (Sun & Nathans, 2000) oder Adrenoleukodystrophie (ALDP) (Kamijo *et al.*, 1990) involviert sind. Der Transportmechanismus des TAP-Komplexes kann in zwei grundlegende Schritte unterteilt werden: die ATP-unabhängige Peptidbindung und den ATP-abhängigen Peptidtransport. In den letzten Jahren wurden der Bindungsmechanismus und die Substratspezifität von TAP eingehend untersucht (Uebel & Tampé, 1999). Wenig ist dagegen über die zentrale Rolle der ATP-Hydrolyse bei der TAP-Funktion bekannt. Einerseits, ist ATP für die Peptidübertragung auf die luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums notwendig (Androlewicz *et al.*, 1993; Neefjes *et al.*, 1993; Shepherd *et al.*, 1993); andererseits gibt es Hinweise auf die Beteiligung von ATP an der Synchronisierung der Freigabe von peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Molekülen, die für den Transport auf die Zelloberfläche bestimmt sind (Knittler *et al.*, 1999). Zusätzlich scheint ATP einen stabilisierenden Einfluss auf die Integrität des TAP-Komplexes auszuüben (van Endert, 1999). Außerdem ist seit langem bekannt, dass beide NBD für die Funktionalität von TAP unentbehrlich sind. Bei der separaten Expression von TAP1 und TAP2 kann die einzige verbliebene NBD zwar ATP binden, ist aber nicht in der Lage es zu spalten (Müller *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994). Der Defekt einer der beiden NBD im TAP-Komplex führt zur Inaktivierung des Transporters (Chen *et al.*, 1996).

Um die Funktionsweise von TAP besser verstehen zu können, sollte der Mechanismus der TAP-spezifischen ATP-Hydrolyse aufgeklärt werden. Die Untersuchungen an Organellen waren sowohl für die Messungen der Peptidbindung an TAP, als auch des Peptidtransportes geeignet. Bei den Versuchen, die ATPase-Aktivität von TAP an Mikrosomen oder semipermeabilisierten Zellen zu messen, konnte jedoch keine TAP-spezifische ATP-Hydrolyse festgestellt werden, da die Hintergrundaktivität anderer ER-ständiger ATPasen zu hoch war. Alle bisherigen Bemühungen, funktionales TAP aus der mikrosomalen Fraktion (sowohl nach

heterologer, als auch nach homologer Expression) zu isolieren und zu rekonstituieren, sind aufgrund der extremen Instabilität des Proteins gescheitert (Meyer, 1996; van Endert, 1999). In Abwesenheit von Di- oder Trinukleotiden und hochaffinen Peptiden verliert der TAP-Komplex, vermutlich durch irreversible Konformationsänderung und Aggregation, rapide die Funktionalität (van Endert, 1999). Außerdem wurden die meisten bisherigen Rekonstitutionsversuche in Abwesenheit von Tapasin durchgeführt, das einen stabilisierenden Effekt auf den TAP-Komplex ausübt (Bangia *et al.*, 1999; Lehner *et al.*, 1998; Raghuraman *et al.*, 2002).

4.1 Rekonstitution des TAP-Komplexes

Als Ausgangspunkt für die Gewinnung größerer Mengen von TAP wurden humane Burkitt Lymphoma Zellen (*Raji*-Zelllinie) gewählt, die bereits ohne γ -Interferon-Stimulation hohe TAP Expressionsraten (bis zu 0.5% des Gesamtproteins der mikrosomalen Fraktion) aufweisen. Zuvor wurde versucht für diese Zwecke das Baculovirussystem zu verwenden. Dabei wurden Sf9-Insektenzellen mit einem rekombinanten Virus infiziert, der TAP1 und TAP2 gleichzeitig exprimierte. Dieses System erwies sich allerdings als nicht besonders gut geeignet, da sowohl die ATPase-Aktivität, als auch Peptidtransport sich nicht nach der Rekonstitution nachweisen ließen. Der Grund dafür könnte das Fehlen zusätzlicher Faktoren (wie z. B. Tapasin) oder Proteinaggregation aufgrund der für ein Membranprotein sehr hohen Expressionsraten (bis zu 2% des Gesamtproteins in der mikrosomalen Fraktion) sein.

Aus diesem Grund wurde eine neue Methode entwickelt, um TAP zu solubilisieren und nach der Anreicherung in künstliche Lipidvesikel zu rekonstituieren. Diese Methode zeichnet sich durch ihre Schnelligkeit aus (Dauer weniger als einen Tag), was den Verlust an der TAP-Aktivität minimiert. TAP tendiert dazu, an den Oberflächen zu aggregieren, deswegen sollte die Interaktion mit dem Säulenmaterial vermieden werden. Deswegen wird TAP bei der Präparation durch eine schonende Prozedur (Gelfiltration) angereichert, was ebenfalls zum Stabilitätserhalt von TAP beiträgt.

Das angereicherte TAP wird in Liposomen mithilfe einer weiteren Gelfiltration rekonstituiert. Die gewählte Prozedur hat sich als sehr effektiv erwiesen: Etwa 50% des mikrosomalen TAP konnten rekonstituiert werden (Tab. 2) und zwar fast

ausschließlich in der Orientierung, bei der die Peptid-bindende Seite von TAP auf der Außenseite der Proteoliposomen lokalisiert ist. Durch die milde Solubilisierung wurde sogar die Bindung von anderen Komponenten des makromolekularen Beladungskomplexes an TAP nicht zerstört. So blieb Tapasin, im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Molekülen, während der gesamten Isolation mit TAP assoziiert und wurde korekonstituiert. Vermutlich spielte diese Komplexbildung eine zusätzliche stabilisierende Rolle, da die TAP-Moleküle während der Rekonstitution durch Tapasin voneinander abgeschirmt waren und somit die TAP-Aggregation vermindert wurde.

4.2 ATPase-Aktivität des TAP-Komplexes

Unter Anwendung dieser Methode gelang es zum ersten Mal die TAP-Aktivität im rekonstituierten *in vitro* System nachzuweisen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die peptidabhängige TAP-spezifische ATP-Hydrolyse zum ersten Mal beobachtet. Diese ATPase-Aktivität ist Orthovanadat-sensitiv und kann durch Zugabe von Peptiden stimuliert werden. Verschiedene Peptide wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die ATP-Hydrolyse durch TAP zu stimulieren. Eine direkte Korrelation zwischen der Peptidaffinität zu TAP (Bindungskonstante K_D) und der halbmaximalen Stimulation der ATPase-Aktivität von TAP ($K_{m,pep}$) wurde festgestellt (Tab. 4). Um diese Schlüsse auf andere Peptide übertragen zu können, wurden kombinatorische Peptidbibliotheken eingesetzt, die den Zusammenhang zwischen der Peptidbindungsspezifität von TAP und der TAP-spezifischen ATP-Hydrolyse aufklären sollten. Diese Experimente haben gezeigt, dass die ATP-Hydrolyse durch TAP auch hier mit der Affinität der Peptidbindung weitgehend gekoppelt ist (Abb. 11).

Die Substrat-stimulierte ATPase-Aktivität ist bei einigen Mitgliedern der ABC-Transporter-Familie, wie z. B. bei dem P-Glykoprotein (MDR1) eingehend untersucht worden (Sarkadi *et al.*, 1992; Senior *et al.*, 1998). Trotzdem bleiben viele Fragen, die den Mechanismus der ATP-Hydrolyse betreffen, offen. Eine direkte Kopplung zwischen Substratbindung und ATP-Hydrolyse konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso wurden verschiedene Werte für halbmaximale ATPase-Aktivität (V_{max}) für verschiedene Substrate ermittelt. Manche Substrate, die an P-Glykoprotein binden, stimulieren die ATP-Hydrolyse nicht. Außerdem hemmen manche Substrate

vom P-Glykoprotein die Transportaktivität dieses Proteins, wenn sie in hoher Konzentration eingesetzt werden.

Man muss dabei berücksichtigen, dass P-Glykoprotein, wie viele andere Arzneimitteltransporter, im Gegensatz zu TAP, hydrophobe Substanzen transportiert. Deswegen können diese Unterschiede zu TAP durch die Membrangängigkeit von P-Glykoprotein-Substraten, und somit durch dessen größere Zugängigkeit für den Transporter erklärt werden. Wie schon erwähnt, zeigt TAP eine strikte Korrelation zwischen Peptidbindung (K_D) und der Stimulierung der ATPase-Aktivität ($K_{m,pep}$). Außerdem wurde unter Anwendung verschiedener Substrate immer die gleiche maximale Hydrolysegeschwindigkeit gemessen (V_{max}). Somit hängt diese nicht von der Substrataffinität zu TAP ab. Unter der Annahme, dass die ATP-Hydrolyse mit dem Transportvorgang korreliert, kann man vermuten, dass die maximale Transportgeschwindigkeit auch nicht von der Substrataffinität abhängt. Diese allosterische Kopplung zwischen Bindung, ATP-Hydrolyse und dem Transportvorgang impliziert eine enge Kommunikation zwischen Bindungstasche und NBD, die die ATP-Spaltung steuern.

Vor allem die dreidimensionalen Strukturen der NBD verschiedener ABC-Transporter eröffnen faszinierende Perspektiven in der Forschung an der ATPase-Aktivität in dieser Proteinfamilie (Diederichs *et al.*, 2000; Gaudet & Wiley, 2001; Hopfner *et al.*, 2000; Hung *et al.*, 1998; Schmitt & Tampé, 2002; Yuan *et al.*, 2001). Die erhaltenen Daten erlauben, die Interaktion von ATP-Molekülen mit dem Protein direkt zu untersuchen und die Rolle bestimmter Proteinstrukturen bei der ATP-Hydrolyse zu analysieren. Eine Reihe von kürzlich erschienenen Publikationen zeigt, dass monomere NBD von ABC-Transportern in Anwesenheit von ATP miteinander interagieren (Chen *et al.*, 2003a; Fetsch & Davidson, 2002; Horn *et al.*, 2003; Janas *et al.*, 2003; Loo *et al.*, 2002; Moody *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002). Zwei Moleküle ATP werden durch die Walker A/B-Motive und den C-loop beider NBD gebunden (Locher *et al.*, 2002). Die Nukleotidbindung und ATP-Hydrolyse soll durch den C-terminalen Bereich der jeweils anderen NBD beeinflusst sein (Bouabe & Knittler, 2003). Außerdem wird vermutet, dass der Q-loop eine Wasserstoffbrücke zum γ -Phosphat des ATP ausbildet (Chen *et al.*, 2003a; Hung *et al.*, 1998; Karpowich *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002). Durch die Bindung an den P-loop leiten die ATP-Moleküle die Dimerisierung der NBD ein, indem sie die Oberfläche der NBD-Monomere verändern. Dabei machen die ATP-Moleküle, die zwischen zwei NBD-

Monomeren, wie in einem „*sandwich*“ liegen, einen signifikanten Anteil der Dimer-Grenzfläche aus. Es folgt ein *induced-fit*-Effekt, wobei sich die Konformation vom Q-, D-, H- und P-*loop* ändert (Karpowich *et al.*, 2001). Die Rotation des kürzeren Arms (auch α -Subdomäne genannt) in Richtung von *arm I* induziert eine kompaktere Struktur, die eine solche Dimerisierung zulässt (Hopfner *et al.*, 2000; Locher *et al.*, 2002). Diese Rotation ist essentiell für die allosterische Substratstimulation der ATP-Hydrolyse. Mutationen in der α -Subdomäne führen zu schweren Störungen der Transportaktivität. So führt eine solche Mutation bei CFTR zur zystischen Fibrose (Riordan *et al.* 1989). Die Punktmutation R659Q in der α -Subdomäne der TAP1-NBD führt zu der Reduzierung des Peptidtransportes um 50% (Chen *et al.*, 1996; Saveanu *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass diese Mutation die Flexibilität des kürzeren Arms der TAP1-NBD beeinflusst und somit die Kopplung zwischen ATP-Hydrolyse und Peptidtransport stört (Gaudet & Wiley, 2001).

Wenn man die bekannten Daten über die Peptidbindung an TAP (Uebel *et al.*, 1995; Neumann & Tampé, 1999; Neumann *et al.*, 2002) und die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Substrat-stimulierte ATP-Hydrolyse zusammenfasst, kann man ein Vierschrittmodell der TAP-Funktion vorschlagen (Abb. 27): Als Erstes binden Peptid und ATP unabhängig voneinander an TAP; dies ist ein schneller Vorgang, vermutlich kontrolliert durch die Diffusionsgeschwindigkeit von Peptiden. Dann erfolgt die Übertragung des Signals an die Nukleotid-bindenden Domänen, die durch die vor kurzem entdeckte langsame Konformationsänderung von TAP vermittelt wird (Neumann & Tampé, 1999; Neumann *et al.*, 2002). Anscheinend, verursacht diese Konformationsänderung zusammen mit der ATP-Bindung die Dimerisierung der beiden NBD, so dass zwischen diesen Domänen eine Wechselwirkung entsteht, die für die erfolgreiche allosterische Aktivierung der ATP-Spaltung notwendig ist. Die dazugehörige verminderte laterale Mobilität der TAP-Moleküle wird nur in Anwesenheit von sowohl Peptiden, als auch ATP beobachtet (Reits *et al.*, 2000). Beim dritten Teilschritt werden die Nukleotid-bindenden Domänen aktiv und es erfolgt die ATP-Spaltung. Dabei wird das gebundene Peptid auf die luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums übertragen. Die strukturelle Reorganisation der Peptidbindungstasche wird hierbei durch Peptide, die aufgrund ihrer räumlich sperrigen Seitenketten nicht transportiert werden können, blockiert. Somit finden keine ATP-Hydrolyse und kein Transportschritt statt. Im letzten, vierten Teilschritt,

kehrt TAP in seine ursprüngliche Konformation zurück, dabei wird das Peptid auf der luminalen Seite des ER entlassen. Der enge Kontakt zwischen den beiden NBD wird dabei höchstwahrscheinlich aufgehoben, da er nur in Anwesenheit von gebundenen Peptiden und ATP Bestand hat. Die Frage, ob die TAP-NBD im parallelen oder sequentiellen Modus arbeiten, konnte noch nicht beantwortet werden. Für den TAP-verwandten mitochondrialen Halbtransporter Mdl1 aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte anhand von Berylliumfluorid- und Vanadatrappping-Experimenten ein sequentielles Modell vorgeschlagen werden (Janas *et al.*, 2003).

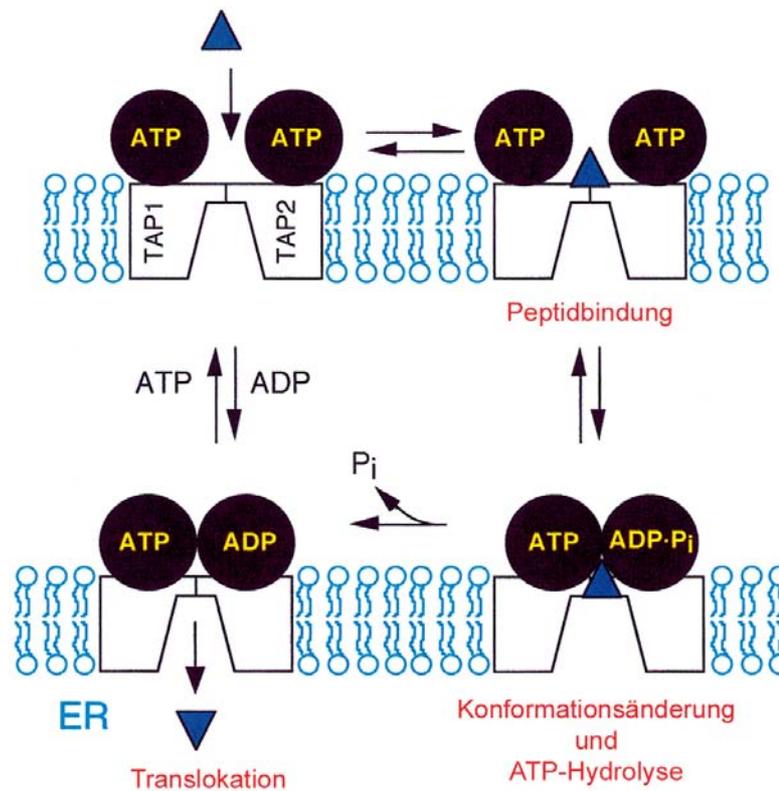


Abb. 27 Vierschrittmodell für den TAP-vermittelten Peptidtransport (nach Lankat-Buttgereit & Tampé, 2002).

Wie die Versuche mit Peptiden, die eine verzweigte Seitenkette tragen, zeigen, ist der Transportprozess bei TAP komplizierter als in dieser vereinfachten Theorie. Peptide, die eine Polylysin-Seitenkette tragen, die aus mehr als fünf Resten besteht, stimulieren die ATPase-Aktivität von TAP in geringerem Ausmaß, als das Originalpeptid ohne Polylysin-Seitenkette, was sich in der viel niedrigeren Transporteffizienz widerspiegelt (Grommé *et al.*, 1997; Gorbulev *et al.*, 2001). Da aber alle diese Peptide ungeachtet der Länge der Seitenkette die gleiche Affinität zu

TAP haben, spricht das für eine Art Qualitätskontrolle der gebundenen Peptide. Diese Qualitätskontrolle findet höchstwahrscheinlich direkt nach der Bindung statt und wird gebraucht, um unnötige Energieverluste in der Zelle zu vermeiden. Wie dieser Kontrollschritt abläuft, ist unklar, vermutlich jedoch spielt dabei die sterische Hinderung der Konformationsänderung eine entscheidende Rolle.

Das aufgereinigte TAP, das in den Experimenten verwendet wurde, war nicht ganz frei von anderen ATPasen. Trotzdem konnte die spezifische ATP-hydrolytische Aktivität von TAP charakterisiert werden, da nur diese Aktivität peptidabhängig ist. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m für die ATP-Hydrolyse, die 0.3 mM beträgt, wurde durch die Quantifizierung der Mengen am freigesetzten anorganischen Phosphat bestimmt. Dieser Wert stimmt mit den Daten überein, die indirekt gewonnen wurden, indem man die Peptidglykosylierungsraten in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration nach dem TAP-abhängigen Transport gemessen hatte (Lacaille & Androlewicz, 1998). Die Übereinstimmung dieser zwei verschiedenen Messmethoden zeigt eindrucksvoll die enge Kopplung zwischen Peptidbindung, ATP-Hydrolyse und Peptidtransport, was die Theorie, dass jedes transportfähige Peptid unter ATP-Verbrauch von TAP durch die ER-Membran transportiert wird, unterstützt.

Die Michaelis-Menten-Konstante für das P-Glykoprotein variiert, im Gegensatz zu TAP, zwischen 0.3 und 1.4 mM, je nachdem aus welchem Organismus das Protein gewonnen wurde, welches Expressionssystem und welches Aufreinigungsprotokoll angewendet wurden. Außerdem scheint die Natur des Substrates einen leichten Einfluss auf die Stimulation der ATPase-Aktivität von P-Glykoprotein zu haben. Hier schwanken die K_m - Werte zwischen 0.4 und 1.4 mM (Shapiro & Ling, 1994; Sharom *et al.*, 1995).

Die aus der Michaelis-Menten Kinetik berechnete maximale Geschwindigkeit der TAP-spezifischen ATP-Hydrolyse V_{max} beträgt circa 2 $\mu\text{mol}/\text{min}$ pro 1 mg TAP. Die dadurch ermittelten Werte für die Umsatzrate von ATP durch TAP (k_{cat} , "turnover number") sind die gleichen, wie für das näherverwandte P-Glykoprotein und übersteigen die von CFTR, einem anderen, entfernter verwandten Mitglied der humanen ABC-Transporterfamilie, um das fünffache. Bei TAP und P-Glykoprotein beträgt dieser Wert 5 ATP-Moleküle pro Sekunde, bei CFTR - ungefähr 1 ATP pro Sekunde (s. Tab. 6) (Sharom *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu P-Glykoprotein scheint TAP keine intrinsische ATPase-Aktivität zu besitzen, da in

Anwesenheit von ICP47, einem Herpesvirusprotein, das die Peptidbindung verhindert, keine ATP-Hydrolyse über dem Hintergrund beobachtet werden kann. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit über die Inaktivierung (*“trapping”*) von TAP durch Berylliumfluorid und 8-Azido-ATP, ein photoaktivierbares ATP-Derivat, zeigte, dass in Abwesenheit von Substratpeptiden kein nennenswertes *“trapping”* stattfindet, was auch daraufhin deutet, dass keine Energie verschwendet wird, falls kein transportfähiges Peptid in der Bindungstasche vorliegt (Chen *et al.*, 2003).

	TAP	Pgp	CFTR
K_m	0.3 mM	0.4 – 1.4 mM	< 0.1 mM
k_{cat}	5 ATP / sec	5 – 10 ATP / sec	1 ATP / sec

Tab. 6 Vergleich der kinetischen Parameter der ATPase-Aktivität verschiedener Vertreter der ABC-Transporter-Familie.

Die mithilfe der ATP-Hydrolyse berechnete Wechselzahl von TAP führt zu der Annahme, dass die Transportrate von TAP viel höher, als früher vermutet, liegen kann. Die maximalen publizierten Werte von circa 3 fmol/min pro µg Gesamtprotein in den TAP-haltigen Mikrosomen ergeben etwa die Wechselzahl von 0.4 Peptiden pro Minute, da der maximaler TAP-Anteil in der mikrosomalen Fraktion unter 0.1% liegt (Yang & Braciale, 1995). Die in dieser Arbeit ermittelten Werte für TAP sind um den Faktor 400 höher. Ausgehend von ungefähr 10^5 TAP-Molekülen pro Zelle kann die geschätzte Menge an transportierten Peptiden bei 1.5×10^7 Peptiden/Minute/Zelle liegen. Diese Schlussfolgerung unterstreicht die Bedeutung von TAP in der MHC-Klasse-I-Beladung und zeigt, dass der Peptidtransport in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums durch TAP nicht der limitierende Schritt der Antigenpräsentation ist.

4.3 Stöchiometrie des Peptidtransportes

Die funktionelle Rekonstitution und der erstmalige Nachweis der ATPase-Aktivität von TAP eröffnete die Möglichkeit, die Stöchiometrie des Peptidtransportes zu bestimmen. Die Versuche, die Anzahl von transportierten Peptiden direkt mit der Anzahl von hydrolysiertem ATP zu korrelieren führten zu verwirrenden Ergebnissen: pro 1 übertragenes Peptid wurden bis zu 20-60

ATP-Moleküle gespalten. Diese Zahlen entsprachen keinen bekannten Daten aus der ABC-Transporter-Familie und ließen sich mechanistisch schwer begründen. Auch energetisch macht solch ein hoher ATP-Verbrauch wenig Sinn.

Eine solche Stöchiometrie weist auf ein stark entkoppeltes System hin. Dies steht aber im Widerspruch zu der gezeigten engen Kopplung zwischen Peptidbindung, ATP-Hydrolyse und Peptidtransport. Auch die Undichtigkeit der Proteoliposomen konnte durch Kontrollversuche ausgeschlossen werden, in denen Tritium-markierte Mannose während der Rekonstitution in die Vesikel eingeschlossen wurde. Eine weitere mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte daran liegen, dass die gemessene Anzahl der transportierten Peptide niedriger, als tatsächlich, war. Ein Teil der schon in die Proteoliposomen übertragenen Peptiden könnte durch einen Rücktransport mittels eines unbekanntes Exporters, der mit TAP zusammen isoliert und in die Proteoliposomen korekonstituiert wurde, wieder ausgeschleust werden. Ein solcher ER-ständiger Peptidexporter, nämlich Sec61, ein ca. 70 kDa großer heterotrimerer Komplex, bestehend aus Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ , wurde vor kurzem beschrieben (Koopmann *et al.*, 2000). Sec61 ist als eine der Hauptkomponenten der ko- und posttranslationalen Proteintranslokation bekannt. Bei der kotranslationalen Translokation ist Sec61 für die SRP1 (*signal recognition particle*)-vermittelte Proteintranslokation über die ER-Membran zuständig (Görlich & Rapoport, 1993). Viele Sec61-Komplexe sind daher mit den Ribosomen auf der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran assoziiert. Auch bei der posttranslationalen Translokation spielt der Sec-Komplex eine entscheidende Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass der gereinigte Sec-Komplex im Hefesystem als einzige Membrankomponente zusammen mit ATP und dem luminalen Hsp70-homologen Protein BiP (Kar2p in Hefe) als stimulierenden Faktor für den posttranslationalen Transport *in vitro* ausreichend ist (Panzner *et al.*, 1995). Die Proteintranslokation verläuft unter ATP-Verbrauch. Andere Funktionen von Sec61 sind aber spärlich studiert. Es ist bekannt, dass manche bakteriellen Exotoxine den Transporter nutzen, um aus dem ER-Lumen ins Zytosol zu gelangen (Simpson *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2000). Das Sec61-Homolog aus der Hefe ist an der Retrotranslokation missgefalteter Proteine aus dem ER beteiligt (Kopito, 1997; Plemper & Wolf, 1999). Der von Koopmann beschriebene Peptidexport aus dem endoplasmatischen Retikulum bedarf gebundenes ATP, nicht aber die ATP-Hydrolyse (Koopmann *et al.*, 2000).

Um zu überprüfen, ob der Sec61-Komplex zusammen mit dem TAP-Komplex in die Proteoliposomen rekonstituiert wurde, wurde eine Immunodetektion mit einem Sec61 α -spezifischen Antikörper durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass ein großer Teil des Sec61-Komplexes sich nach der Gelfiltration in den gleichen Fraktionen wie TAP befindet (Abb. 18), somit konnte der Sec61-Komplex in die Proteoliposomen gelangen.

Eine Möglichkeit, den Rücktransport zu reduzieren, würde in kürzeren Messzeiten liegen. Da aber diese Zeiten sowohl für Transport- und ATPase-Messungen, als auch in Hinsicht auf die TAP-Stabilität optimiert waren, musste darauf verzichtet werden. Die anfänglichen Versuche, den Peptidexport zu unterbinden, um die tatsächliche Stöchiometrie des TAP-abhängigen Peptidimports messen zu können, blieben erfolglos. Da die Anwesenheit von ATP für die Peptidexportfunktion von Sec61-Komplex essentiell ist, wurde ATP aus dem Rekonstitutionspuffer entfernt (beziehungsweise gegen ADP ausgetauscht). Dies führte zum Verlust der Aktivität von rekonstituiertem TAP. Der Einsatz von DIDS (*4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid*), das den ER-ständigen ATP-ADP-Austauscher blockieren sollte (Clairmont *et al.*, 1992; Mayinger & Meyer, 1993), um zu verhindern, dass ATP ins Innere der Proteoliposomen gelangen kann, brachte nur eine minimale Verminderung der ATP-Hydrolyse bei unveränderten Peptidtransportraten. Der Grund dafür waren vermutlich die im Rekonstitutionspuffer vorhandenen ATP-Moleküle, die somit in die Proteoliposomen gelangen und den Sec61-Komplex aktivieren konnten (Proks *et al.*, 2001). Durch eine direkte Zugabe von Sec61-Antikörpern zum Transportassay wurde eine Blockierung des Sec61-Komplexes erhofft. Die Anwesenheit von Sec61-Antikörpern bewirkte aber keine Erhöhung der Peptidaufnahme, wahrscheinlich deswegen, weil die Antikörperbindung durch eine zu kurze Inkubationszeit nicht zustande kam. Möglicherweise waren aber die gebundenen Antikörper nicht in der Lage, die Exportfunktion des Sec61-Komplexes zu inhibieren.

Schließlich gelang es, durch die der eigentlichen Rekonstitution vorgeschaltete Affinitätschromatographie mit dem CNBr-immobilisierten Sec61-Antikörper, den Sec61-Komplex weitgehend aus dem Solubilisat zu entfernen. Dabei sank der ATP-Verbrauch bei gleichzeitig gestiegenen Peptidaufnahmeraten. Somit konnten höchstwahrscheinlich die Peptide nach dem Transport im Inneren der Proteoliposomen verbleiben und akkumulieren. Der erreichte Wert von ca. 4 ATP-

Molekülen pro transportiertes Peptid kann aber nicht als endgültig angesehen werden, da in den Proteoliposomen minimale Reste von Sec61-Komplex verbleiben. Möglicherweise verfälschen sie immer noch die Stöchiometrie des Peptidimportes. Die kinetischen Parameter des Peptidexporters durch Sec61 sind noch unbekannt. Auch die stark gesunkene ATP-Hydrolyserate (durch die in Abwesenheit von Sec61 antretende Sättigung der Proteoliposomen mit Peptiden und die Verlangsamung bzw. das Erliegen des Transportes) führt zur Vergrößerung der Fehlerwahrscheinlichkeit, da die Unterschiede zwischen stimulierter und unstimulierter ATPase-Aktivität immer kleiner werden.

4.4 Inhibition von TAP durch US6

Eine weitere Anwendung fand die Rekonstitutionsmethode bei Versuchen, den molekularen Wirkungsmechanismus des humanen Zytomegalievirusproteins US6 zu entschlüsseln. Viele Viren haben im Laufe der Evolution diverse Strategien entwickelt, um die Antigenpräsentation zu blockieren. Sind sie erfolgreich, so entgehen sie der Immunantwort und können „überleben“. Virale Inhibitoren, die in die Antigenprozessierung eingreifen sind ein wichtiges Mittel zum Verständnis der Funktionsweise von TAP.

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) gehört zur β -Subgruppe der Herpesviren und verbleibt nach der Spezies-spezifischen Infektion ein Leben lang im Organismus. In Individuen mit geschwächtem Immunsystem, Rezipienten von Organtransplantaten und AIDS-Patienten kann HCMV zu Todesfällen führen (Sweet, 1999). Ein breites Spektrum an Schutzmechanismen hilft dem Virus, das Immunsystem zu überlisten und die Immunantwort zu vermeiden. Nahezu jeder Schritt der Antigenpräsentation ist zum Ziel der viralen Inhibitoren geworden, und auch TAP wird durch virale Faktoren blockiert (Hengel & Koszinowski, 1997; Ploegh, 1998). Das ER-ständige Typ-I-Membranglykoprotein US6 blockiert den TAP-abhängigen Peptidtransport durch die ER-Membran (Ahn *et al.*, 1997; Hengel *et al.*, 1997; Lehner *et al.*, 1997). Die Tatsache, dass US6 mit der ER-luminalen Domäne von TAP interagiert (Ahn *et al.*, 1997), macht die Erforschung des Wirkungsmechanismus von US6 *in organello* umso schwieriger, da das virale Protein ins Innere des Mikrosoms eingeschleust werden muss. Für diesen Zweck wurde das in *E. coli* heterolog exprimierte rekombinate US6(Δ 147-183) aus den

inclusion bodies aufgereinigt und rückgefaltet (Kyritsis *et al.*, 2001). Die schonende Solubilisierung von TAP durch Decylmaltosid hat es ermöglicht, die ER-luminale Seite von TAP für die US6(Δ 147-183)-Bindung zugänglich zu machen, ohne den Aktivitätsverlust von TAP durch das Herauslösen aus der Membran befürchten zu müssen. Danach folgte die Korekonstitution von löslichem US6(Δ 147-183) und solubiliertem TAP in Lipidvesikel. Der Proteinaseschutzassay (Abb. 23) zeigte deutlich, dass US6(Δ 147-183) sich im Inneren der Proteoliposomen befindet. Das Lumen der Proteoliposomen entspricht der ER-luminalen Seite der Mikrosomen. Dort befinden sich auch die ER-ständigen Domänen von TAP, die für die spezifische US6-Bindung verantwortlich sind. Dagegen richten sich die TAP-NBD und die Peptidbindungstasche nach außen.

Aufgereinigtes und rückgefaltetes US6(Δ 147-183) blockiert fast vollständig den TAP-spezifischen Peptidtransport. Dabei wird aber die Peptidbindung an TAP, im Gegensatz zu ICP47, einem anderen TAP-Inhibitor aus der Herpesviren-Familie nicht inhibiert. Die Menge an unspezifisch an TAP gebundenen Peptiden wird durch Zugabe von US6(Δ 147-183) nicht beeinflusst und hängt nach wie vor nur von der Peptidkonzentration ab. Die Transportblockierung von TAP bei der Korekonstitution mit US6(Δ 147-183) ist spezifisch. Wird BSA anstelle von US6(Δ 147-183) in die Proteoliposomen korekonstituiert, tritt keine Blockierung der TAP-Funktion ein. Somit kann die unspezifische TAP-Inhibition durch Protein-Protein-Wechselwirkungen ausgeschlossen werden. Auch die ATPase-Aktivität von TAP wurde in Anwesenheit von US6(Δ 147-183) nahezu vollständig blockiert. Anhand dieser Daten kann man aber nicht bestimmen, ob die US6-Bindung *per se* die ATP-Spaltung durch TAP inhibiert, oder durch die Unterbindung des Transportes nach einem Hydrolyseschritt verhindert, dass TAP in die ursprüngliche Konformation zurückkehrt und weitere ATP-Moleküle hydrolysiert. Sowohl die Aktivität anderer ATPasen in den Proteoliposomen, als auch die Möglichkeit, dass einige TAP-Moleküle kein US6(Δ 147-183) gebunden haben und deswegen noch aktiv sind, erlauben keine genaue Aussage.

In früheren Publikationen wurde berichtet, dass die NBD von TAP1 ATP besser bindet als die NBD von TAP2 (Müller *et al.*, 1994; Russ *et al.*, 1995), während beide NBD eine äquivalente ADP-Bindung aufweisen (Alberts *et al.*, 2001). Eine mögliche Erklärung wäre, dass im Grundzustand innerhalb der NBD von TAP2 ATP oder ADP fest gebunden ist (*occluded state*). Bei der NBD von TAP1 werden

hingegen fortlaufend Nukleotide ausgetauscht (*open state*). Durch die Bindung von US6 an TAP wird die Konformation der NBD von TAP1 dahingehend verändert, dass diese kein ATP mehr binden kann (Hewitt *et al.*, 2001). Die NBD geht somit in den so genannten *occluded state* über.

Von Christoph Kyritsis durchgeführte weitere Experimente zeigten, dass die US6-Bindung an TAP dazu führt, dass TAP in einem Konformationszustand festgehalten wird, der die Bindung von ATP, aber nicht ADP verhindert. Die Peptidbindungstasche bleibt auch in diesem Konformationszustand für Peptide zugänglich. (Kyritsis *et al.*, 2001).

5 Zusammenfassung

Der Transport von antigenen Peptiden in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums ist ein zentraler Vorgang bei der Antigenprozessierung und ihrer MHC-Klasse-I-vermittelten Präsentation auf der Zelloberfläche. Intrazelluläre Translokation über die ER-Membran erfolgt mit Hilfe von TAP, eines ATP-abhängigen ABC-Transporters. Einer ATP-unabhängigen Substratbindung folgt der eigentliche Transportschritt, dessen Energetisierung einer ATP-Spaltung bedarf.

In der vorliegenden Dissertation wurde die ATPase-Aktivität des TAP-Komplexes aufgeklärt und detailliert charakterisiert. Es wurde eine schnelle und schonende Isolierungs- und Rekonstitutionsmethode entwickelt, die es erlaubt, den partiell aufgereinigten TAP-Komplex in Liposomen einzubauen und Funktionsstudien *in vitro* durchzuführen. Zum ersten Mal war es damit möglich, die Peptid-stimulierte TAP-spezifische ATP-Hydrolyse direkt zu beobachten und deren kinetische Parameter zu bestimmen. Eine direkte Korrelation zwischen Bindungsaffinität des Peptides zu TAP (Bindungskonstante K_D) und der halbmaximalen Stimulation der ATPase-Aktivität von TAP ($K_{m,pep}$) wurde festgestellt. Die Versuche mit den verzweigten Peptiden zeigten, dass Peptide, die nicht transportiert werden können, keine Stimulation der ATPase-Aktivität hervorrufen. Somit wurde die allosterische Interaktion zwischen Peptidbindung, ATP-Hydrolyse und Peptidtransport nachgewiesen. Nach der Entfernung des peptidexportierenden Sec61-Komplexes aus den Proteoliposomen konnte die vorläufige Stöchiometrie des Transportschrittes bestimmt werden.

Eine weitere Anwendung fand die Rekonstitutionsmethode bei der Aufklärung des molekularen Wirkungsmechanismus des TAP-Inhibitors US6, indem der TAP-Komplex zusammen mit der aktiven ER-luminalen Domäne von US6 in die Proteoliposomen rekonstituiert wurde. Die Bindung von US6(Δ 147-183) an die ER-luminalen Bereiche von TAP blockiert die ATP-Bindung an die zytoplasmatischen NBD des Transporters. Die Peptid-induzierte ATP-Hydrolyse wird durch die Inhibition der ATP-Bindung unterbunden, wohingegen die Peptid- und ADP-Bindung von TAP nicht beeinflusst sind.

6 Abkürzungen

Å	Angstrom
Abb	Abbildung
ABC	ATP-Bindungskassette
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzylsulfonylfluorid
ALD	Adrenoleukodystrophie
ALDP	Adrenoleukodystrophieprotein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APC	antigenpräsentierende Zelle
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CMC	kritische mizellare Konzentration
cpm	Impulse pro Minute
cps	Impulse pro Sekunde
Da	Dalton
DHDAB	Dihexadezyldimethylammoniumbromid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu

em	Emission
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ex	Anregung
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
geb	gebunden
ges	gesamt
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion S-Transferase
HCMV	humanpathogenes Zytomegalievirus
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
h	Stunde
hIL-10	humanes Interleukin-10
HisP	Histidinpermease P
HLA	humanes Leukozytenantigen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>
HSV1	<i>Herpes Simplex Virus Typ1</i>
HSV2	<i>Herpes Simplex Virus Typ2</i>
IC50	Inhibitionskonzentration (50 %)
ICP47	<i>infected cell protein 47</i>
ICP47-1	ICP47-Variante des HSV1
ICP47-2	ICP47-Variante des HSV2
IgG	Immunglobulin G
IM	innere Plasmamembran
MDR	Multidrogen-Resistenz
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mTAP	muriner TAP-Komplex
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid

NBD	Nukleotidbindungsdomäne
OM	äußere Plasmamembran
Opp	Oligopeptidpermease
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglycol
PHHI	<i>persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy</i>
p.i.	<i>post infection</i>
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SCLC	<i>small cell lung cancer</i>
SDS	Natriumdodezylsulfat
Tab.	Tabelle
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	N, N, N', N' tetramethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TM	Transmembranhelix
u. a.	unter anderem
ungeb	ungebunden
UV	ultraviolett
v	Volumen
V	Volt
vIL-10	virales Interleukin-10
Vis	sichtbar
w	Gewicht

Aminosäuren wurden im Einbuchstabencode gemäß den Empfehlungen der IUPAC-IUB (*International Union of Pure and Applied Biochemistry - International Union of Biochemistry*) abgekürzt.

7 Literaturverzeichnis

- Abele, R. & Tampé, R. (1999) Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim. Biophys. Acta*, **1461**, 405-419.
- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R. & Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, **370**, 621-628.
- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., Clement, J.P.t., Boyd, A.E., 3rd, Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J. & Nelson, D.A. (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*, **268**, 423-426.
- Ahn, K., Gruhler, A., Galocha, B., Jones, T.R., Wiertz, E.J.H.J., Ploegh, H.L., Peterson, P.A., Yang, Y. & Früh, K. (1997) The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity*, **6**, 613-621.
- Ahn, K., Meyer, T.H., Uebel, S., Sempé, P., Djaballah, H., Yang, Y., Peterson, P.A., Früh, K. & Tampé, R. (1996) Molecular mechanism and species-specificity of TAP inhibition by Herpes-Simplex virus protein ICP47. *EMBO J.*, **15**, 3247-3255.
- Albrecht, D.K., Kappus, H. & Remmer, H. (1978) Lipid peroxidation and cell damage in isolated hepatocytes due to bromotrichloromethane. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **46**, 499-505.
- Ames, G.F.-L. & Lecar, H. (1992) ATP-dependent bacterial transporters and cystic fibrosis: analogy between channels and transporters. *FASEB J.*, **6**, 2660, 2666.
- Anderson, O.S. (1984) Gramicidin channels. *Annu. Rev. Physiol.*, **46**, 531-548.
- Andersson, M., Pääbo, S., Nilsson, T. & Peterson, P.A. (1985) Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. *Cell*, **43**, 215-222.
- Androlewicz, M.J., Anderson, K.S. & Cresswell, P. (1993) Evidence that transporter associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 9130-9134.

- Androlewicz, M.J. & Cresswell, P. (1994) Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide binding site. *Immunity*, **1**, 7-14.
- Antoniou, A.N., Powis, S.J. & Elliott, T. (2003a) Assembly and export of MHC class I peptide ligands. *Curr. Opin. Immunol.*, **15**, 75-81.
- Antoniou, A.N., Ford, S., Pilley, E.S., Blake, N. & Powis, S.J. (2002b) Interactions formed by individually expressed TAP1 and TAP2 polypeptide subunits. *Immunology*, **106**, 182-189.
- Arora, S., Lapinski, P.E. & Raghavan, M. (2001) Use of chimeric proteins to investigate the role of transporter associated with antigen processing (TAP) structural domains in peptide binding and translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 7241-7246.
- Attaya, M., Jameson, S., Martinez, C.K., Hermel, E., Aldrich, C., Forman, J., Fischer Lindahl, K., Bavan, M.J. & Monaco, J.J. (1992) Ham-2 corrects the class I antigen-processing defect in RMA-S cells. *Nature*, **355**, 647-649.
- Bangia, N., Lehner, P.J., Hughes, E.A., Surman, M. & Cresswell, P. (1999) The N-terminal region of tapasin is required to stabilize the MHC class I loading complex. *Eur. J. Immunol.*, **29**, 1858-1870.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F. & Seemüller, E. (1998) The proteasome - paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, **92**, 367-380.
- Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C.O., Schirmer, N.K., Sprinzl, M. & Hilgenfeld, R. (1993) Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature*, **365**, 126-132.
- Blevitt, J.M., Früh, K., Glass, C., Jackson, M.R., Peterson, P.A. & Huang, S.M. (1999) A fluorescence-based high throughput screen for the transporter associated with antigen processing. *Journal of Biomolecular Screening*, **4**, 87-91.
- Bouvier, M. & Wiley, D.C. (1994) Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science*, **265**, 398-402.
- Bouabe, H. & Knittler, M.R. (2003) The distinct nucleotide binding states of the transporter associated with antigen processing (TAP) are regulated by the nonhomologous C-terminal tails of TAP1 and TAP2. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 4531-4546.

- Brooks, P., Murray, R.Z., Mason, G.G., Hendil, K.B. & Rivett, A.J. (2000) Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.*, **352**, 611-615.
- Burgert, H.-G. & Kvist, S. (1985) An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens. *Cell*, **41**, 987-997.
- Bushkin, Y., Posnett, D.N., Pernis, B. & Wang, C.Y. (1986) A new HLA-linked T cell membrane molecule, related to the beta chain of the clonotypic receptor, is associated with T3. *J. Exp. Med.*, **164**, 458.
- Cantley, L.C., Carilli, C.T., Smith, R.L. & Perman, D. (1983) Conformational changes of Na,K-ATPase necessary for transport. *Curr. Top. Membr. Transp.*, **19**, 315-322.
- Carafoli, E. (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 395-433.
- Chang, G. & Roth, C.B. (2001) Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science*, **293**, 1793-1800.
- Chen, H.L., Gabrilovich, D., Tampé, R., Girgis, K.R., Nadaf, S. & Carbone, D.P. (1996) A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat. Genet.*, **13**, 210-213.
- Chen, M., Abele, R. & Tampé, R. (2003) Peptides induce ATP hydrolysis at both subunits of the transporter associated with antigen processing. *J. Biol. Chem.*, **278**, 29686-29692.
- Chen, J., Lu, G., Lin, J., Davidson, A.L. & Quioco, F.A. (2003a) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol. Cell*, **12**, 651-661.
- Cheng, S.H., Rich, D.P., Marshall, J., Gregory, R.J., Welsh, M.J. & Smith, A.E. (1991) Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*, **66**, 1027-1036.
- Clairmont, C.A., De Maio, A. & Hirschberg, C.B. (1992) Translocation of ATP into the lumen of rough endoplasmic reticulum-derived vesicles and its binding to luminal proteins including BiP (GRP 78) and GRP 94. *J. Biol. Chem.*, **267**, 3983-3990.

- Collins, F.S. (1992) Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*, **256**, 774-779.
- Cotten, J.F., Ostedgaard, L.S., Carson, M.R. & Welsh, M.J. (1996) Effect of cystic fibrosis-associated mutations in the 4th intracellular loop of cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.*, **271**, 21279-21284.
- Cresswell, P., Arunachalam, B., Bangia, N., Dick, T., Diedrich, G., Hughes, E. & Marie, M. (1999) Thiol oxidation and reduction in MHC-restricted antigen processing and presentation. *Immunol. Res.*, **19**, 191-200.
- Dassa, E. (1990) Cellular localization of the MalG protein from the maltose transport system in Escherichia coli K12. *Mol. Gen. Genetics*, **222**, 33-36.
- Dassa, E. & Hofnung, M. (1985) Sequence of gene malG in E. coli K12: homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems. *EMBO J.*, **4**, 2287-2293.
- Daumke, O. & Knittler, M.R. (2001b) Functional asymmetry of the ATP-binding-cassettes of the ABC transporter TAP is determined by intrinsic properties of the nucleotide binding domains. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 4776-4786.
- Deverson, E.V., Gow, I.R., Coadwell, W.J., Monaco, J.J., Butcher, G.W. & Howard, J.C. (1990) MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature*, **348**, 738-741.
- Diederichs, K., Diez, J., Greller, G., Muller, C., Breed, J., Schnell, C., Vornrhein, C., Boos, W. & Welte, W. (2000) Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *EMBO J.*, **19**, 5951-5961.
- Doige, C.A. & Ames, G.F.L. (1993) Atp-dependent transport-systems in bacteria and humans - relevance to cystic-fibrosis and multidrug-resistance. *Ann. Rev. Microbiol.*, **47**, 291-319.
- Egner, U., Tomasselli, A.G. & Schulz, G.E. (1987) Structure of the complex of yeast adenylate kinase with the inhibitor P₁P₅-di(adenosine-5'-)pentaphosphate at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **195**, 649-658.
- Ehring, B., Meyer, T.H., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. & Tampé, R. (1996) Effects of major-histocompatibility-complex-encoded subunits on the peptidase and proteolytic activities of human 20S proteasomes - cleavage of proteins and antigenic peptides. *Eur. J. Biochem.*, **235**, 404-415.

- Elliott, T. (1997) How does TAP associate with MHC class I molecules? *Immunol. Today*, **18**, 375-379.
- Endicott, J.A. & Ling, V. (1989) The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 137-171.
- Engelhard, V.H. (1994) How cells process antigens *Sci. Am.* **271**, 54-61.
- Epstein, M.A., Achong, B.G., Barr, Y.M., Zajac, B., Henle, G. & Henle, W. (1966) Morphological and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblasts (strain Raji). *J. Natl. Cancer. Inst.*, **37**, 547-559.
- Falk, K., Rötzschke, O. & Rammensee, H.-G. (1990) Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, **348**, 248-251.
- Felmlee, T., Pellett, S. & Welch, R.A. (1985) Nucleotide sequence of an Escherichia coli chromosomal hemolysin. *J. Bacteriol.*, **163**, 94-105.
- Fetsch, E.E. & Davidson, A.L. (2002) Vanadate-catalyzed photocleavage of the signature motif of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 9685-9690.
- Fremont, D.H., Matsumura, M., Stura, E.A., Peterson, P.A. & Wilson, I.A. (1992) Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K^b. *Science*, **257**, 919-927.
- Froshauer, S. & Beckwith, J. (1984) The nucleotide sequence of the gene for malF protein, an inner membrane component of the maltose transport system of Escherichia coli. Repeated DNA sequences are found in the malE-malF intercistronic region. *J. Biol. Chem.*, **259**, 10896-10903.
- Froshauer, S., Green, G.N., Boyd, D., McGovern, K. & Beckwith, J. (1988) Genetic analysis of the membrane insertion and topology of MalF, a cytoplasmic membrane protein of Escherichia coli. *J. Mol. Biol.*, **200**, 501-511.
- Früh, K., Ahn, K., Djaballah, H., Sempé, P., van Endert, P.M., Tampé, R., Peterson, P.A. & Yang, Y. (1995) A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature*, **375**, 415-418.
- Gaudet, R. & Wiley, D.C. (2001) Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J.*, **20**, 4964-4972.
- Gentschev, I. & Goebel, W. (1992) Topological and functional studies on HlyB of Escherichia coli. *Mol. Gen. Genet.*, **232**, 40-48.

- Gileadi, U. & Higgins, C.F. (1997) Membrane topology of the ATP-binding cassette transporter associated with antigen presentation (Tap1) expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 11103-11108.
- Gilson, E., Nikaido, H. & Hofnung, M. (1982) Sequence of the malK gene in *E. coli* K12. *Nucleic Acids Res.*, **10**, 7449-7458.
- Gorbulev, S., Abele, R. & Tampé, R. (2001) Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 3732-3737.
- Görlich, D. & Rapoport, T.A. (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, **75**, 615-630.
- Gottesman, M.M. & Pastan, I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 385-427.
- Greenberger, L.M. (1993) Major photoaffinity drug labeling sites for iodoaryl azidoprazosin in p-glycoprotein are within, or immediately C-terminal to, transmembrane domain 6 and domain 12. *J. Biol. Chem.*, **268**, 11417-11425.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. & Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, **386**, 463-471.
- Grommé, M., van der Valk, R., Sliedregt, K., Vernie, L., Liskamp, R., Hämmerling, G.J., Koopmann, J.-O., Momburg, F. & Neefjes, J.J. (1997) The rational design of TAP inhibitors using peptide substrate modifications and peptidomimetics. *Eur. J. Immunol.*, **27**, 898-904.
- Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 1015-1069.
- Hengel, H., Koopmann, J.O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hämmerling, G.J., Koszinowski, U.H. & Momburg, F. (1997) A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity*, **6**, 623-632.
- Hengel, H. & Koszinowski, U.H. (1997) Interference with antigen-processing by viruses. *Curr. Opin. Immunol.*, **9**, 470-476.
- Hewitt, E.W., Gupta, S.S. & Lehner, P.J. (2001) The human cytomegalovirus gene product US6 inhibits ATP binding by TAP. *EMBO J.*, **20**, 387-396.

- Hewitt, E.W. & Lehner, P.J. (2003a) The ABC-transporter signature motif is required for peptide translocation but not peptide binding by TAP. *Eur. J. Immunol.*, **33**, 422-427.
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: From microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **8**, 67-113.
- Hill, A., Jugovic, P., York, I., Russ, G., Bennink, J., Yewdell, J., Ploegh, H. & Johnson, D. (1995) Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature*, **375**, 411-415.
- Holland, I.B. & 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**, 381-399.
- Holler, E., Rupley, J.A. & Hess, G.P. (1969) Kinetics of lysozyme-substrate interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 423-429.
- Hopfner, K.P., Karcher, A., Shin, D.S., Craig, L., Arthur, L.M., Carney, J.P. & 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.
- Horn, C., Bremer, E. & Schmitt, L. (2003) Nucleotide dependent monomer/dimer equilibrium of OpuAA, the nucleotide-binding protein of the osmotically regulated ABC transporter OpuA from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, **334**, 403-419.
- Hughes, E.A. & Cresswell, P. (1998) The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr. Biol.*, **8**, 709-712.
- Hung, L.W., Wang, I.X.Y., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F.L. & Kim, S.H. (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*, **396**, 703-707.
- Jackson, M.L. & Litman, B.J. (1982) Rhodopsin-phospholipid reconstitution by dialysis removal of octyl glucoside. *Biochemistry*, **21**, 5601-5608.
- Janas, E., Hofacker, M., Chen, M., Gompf, S., van der Does, C. & Tampé, R. (2003) The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p. *J. Biol. Chem.*, **278**, 26862-26869.

- Jones, P.M. & George, A.M. (2002) Mechanism of ABC transporters: a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 12639-12644.
- Kamijo, K., Taketani, S., Yokota, S., Osumi, T. & Hashimoto, T. (1990) The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J. Biol. Chem.*, **265**, 4534-4540.
- Karpowich, N., Martsinkevich, O., Millen, L., Yuan, Y.R., Dai, P.L., MacVey, K., Thomas, P.J. & Hunt, J.F. (2001) Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure (Camb)*, **9**, 571-586.
- Karttunen, J.T., Lehner, P.J., Gupta, S.S., Hewitt, E.W. & 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**, 7431-7436.
- Kelly, A.P., Powis, S.H., Kerr, L.-A., Mockridge, I., Elliott, T., Bastin, J., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Trowsdale, J. & Townsend, A. (1992) Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature*, **355**, 641-644.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N. & Goldberg, A.L. (1998) Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1982-1989.
- Klein, J., Satta, Y., O'HUigin, C. & Takahata, N. (1993) The molecular descent of the major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.*, **11**, 269-295.
- Knittler, M.R., Alberts, P., Deverson, E.V. & Howard, J.C. (1999) Nucleotide binding by TAP mediates association with peptide and release of assembled MHC class I molecules. *Curr. Biol.*, **9**, 999-1008.
- 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**, 10142-10147.
- Koopmann, J.O., Albring, J., Huter, E., Bulbuc, N., Spee, P., Neefjes, J., Hammerling, G.J. & Momburg, F. (2000) Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity*, **13**, 117-127.

- Koopmann, J.O., Post, M., Neefjes, J.J., Hämmerling, G.J. & Momburg, F. (1996) Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur. J. Immunol.*, **26**, 1720-1728.
- Kopito, R.R. (1997) ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell*, **88**, 427-430.
- Krasne, S., Eisenman, G. & Szabo, G. (1971) Freezing and melting of lipid bilayers and the mode of action of nonactin, valinomycin, and gramicidin. *Science*, **174**, 412-415.
- Kupfer, A. & Singer, S.J. (1989) Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples. *Annu. Rev. Immunol.*, **7**, 309-337.
- Kyritsis, C., Gorbulev, S., Hutschenreiter, S., Pawlitschko, K., Abele, R. & Tampé, R. (2001) Molecular mechanism and structural aspects of transporter associated with antigen processing inhibition by the cytomegalovirus protein US6. *J. Biol. Chem.*, **276**, 48031-48039.
- Lacaille, V.G. & Androlewicz, M.J. (1998) Herpes-simplex virus inhibitor ICP47 destabilizes the transporter associated with antigen-processing (TAP) heterodimer. *J. Biol. Chem.*, **273**, 17386-17390.
- Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E. & Sigler, P.B. (1994) Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature*, **369**, 621-628.
- Lammert, E., Arnold, D., Nijenhuis, M., Momburg, F., Hämmerling, G.J., Brunner, J., Stevanovic, S., Rammensee, H.G. & Schild, H. (1997) The endoplasmic-reticulum resident stress protein gp96 binds peptides translocated by tap. *Eur. J. Immunol.*, **27**, 923-927.
- Lankat-Buttgereit, B. & Tampé, R. (2002) The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiol. Rev.*, **82**, 187-204.
- Lapinski, P.E., Miller, G.G., Tampé, R. & Raghavan, M. (2000) Pairing of the nucleotide binding domains of the transporter associated with antigen processing. *J. Biol. Chem.*, **275**, 6831-6840.
- Lauvau, G., Gubler, B., Cohen, H., Daniel, S., Caillat-Zucman, S. & van Endert, P.M. (1999) Tapasin enhances assembly of transporters associated with

- antigen processing-dependent and -independent peptides with HLA-A2 and HLA-B27 expressed in insect cells. *J. Biol. Chem.*, **274**, 31349-31358.
- Lehner, P.J., Karttunen, J.T., Wilkinson, G.W. & Cresswell, P. (1997) The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 6904-6909.
- Lehner, P.J., Surman, M.J. & Cresswell, P. (1998) Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity*, **8**, 221-231.
- Lehner, P.J. & Trowsdale, J. (1998) Antigen presentation: coming out gracefully. *Curr. Biol.*, **8**, R605-608.
- Li, C.H., Ramjeesingh, M., Wang, W., Garami, E., Hewryk, M., Lee, D., Rommens, J.M., Galley, K. & Bear, C.E. (1996) Atpase activity of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator *J. Biol. Chem.*, **271**, 28463-28468.
- Lindquist, J.A., Jensen, O.N., Mann, M. & Hämmerling, G.J. (1998) ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *EMBO J.*, **17**, 2186-2195.
- Ljunggren, H.G., Stam, N.J., Ohlen, C., Neefjes, J.J., Hoglund, P., Heemels, M.T., Bastin, J., Schumacher, T.N., Townsend, A., Karre, K. & et al. (1990) Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature*, **346**, 476-480.
- Locher, K.P., Lee, A.T. & Rees, D.C. (2002) The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, **296**, 1091-1098.
- Loo, T.W. & Clarke, D.M. (1993a) Functional consequences of phenylalanine mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, **268**, 19965-19972.
- Loo, T.W. & Clarke, D.M. (1993b) Functional consequences of proline mutations in the predicted transmembrane domain of p-glycoprotein *J. Biol. Chem.*, **268**, 3143-3149.
- Loo, T.W., Bartlett, M.C. & 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**, 41303-41306.

- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. & Huber, R. (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, **268**, 533-539.
- Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L. & Wiley, D.C. (1992) The 3-dimensional structure of hla-b27 at 2.1 angstrom resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to mhc *Cell* **70**, 1035-1048.
- Manavalan, P., Dearborn, D.G., McPherson, J.M. & Smith, A.E. (1995) Sequence homologies between nucleotide binding regions of CFTR and G-proteins suggest structural and functional similarities. *FEBS Lett.*, **366**, 87-91.
- Marusina, K., Reid, G., Gabathuler, R., Jefferies, W. & Monaco, J.J. (1997) Novel peptide-binding proteins and peptide transport in normal and tap-deficient microsomes. *Biochemistry*, **36**, 856-863.
- Mayinger, P. & Meyer, D.I. (1993) An ATP transporter is required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *EMBO J.*, **12**, 659-666.
- Meyer, T.H. (1996) Functional expression and characterization of the MHC-encoded peptide transporter (TAP). *Technical University Munich*, Ph.D. thesis.
- Meyer, T.H., van Endert, P.M., Uebel, S., Ehring, B. & Tampé, R. (1994) Functional expression and purification of the ABC transporter complex-associated with antigen-processing (TAP) in insect cells. *FEBS Lett.*, **351**, 443-447.
- Momburg, F., Armandola, E.A., Post, M. & Hämmerling, G.J. (1996) Residues in TAP2 peptide transporters controlling substrate specificity. *J. Immunol.*, **156**, 1756-1763.
- Momburg, F., Roelse, J., Howard, J.C., Butcher, G.W., Hämmerling, G.J. & Neefjes, J.J. (1994) Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature*, **367**, 648-651.
- Monaco, J.J., Cho, S. & Attaya, M. (1990) Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing. *Science*, **250**, 1723-1726.
- Moody, J.E., Millen, L., Binns, D., Hunt, J.F. & Thomas, P.J. (2002) Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J. Biol. Chem.*, **277**, 21111-21114.
- Morrice, N.A. & Powis, S.J. (1998) A role for the thiol-dependent reductase ERp57 in the assembly of MHC class I molecules. *Curr. Biol.*, **8**, 713-716.

- Morris, D.I., Greenberger, L.M., Bruggemann, E.P., Cardarelli, C., Gottesman, M.M., Pastan, I. & Seamon, K.B. (1994) Localization of the forskolin labeling sites to both halves of P- glycoprotein: similarity of the sites labeled by forskolin and prazosin. *Mol. Pharmacol.*, **46**, 329-337.
- Mourez, M., Hofnung, M., Dassa, E. (1997) Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *EMBO J.*, **16**, 3066-3077.
- Müller, K.M., Ebensperger, C. & Tampé, R. (1994) Nucleotide binding to the hydrophilic C-terminal domain of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J. Biol. Chem.*, **269**, 14032-14037.
- Neefjes, J.J., Momburg, F. & Hämmerling, G.J. (1993) Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*, **261**, 769-771.
- Neumann, L. (2000) Untersuchungen zu Antigenpeptidtransporter TAP: Mechanismus der Peptidbindung und Wirkprinzipien des viralen TAP-Inhibitors ICP47. *Philipps-Universität Marburg*, Ph.D. thesis.
- Neumann, L. & Tampé, R. (1999) Kinetic analysis of peptide binding of the TAP transporter complex: Evidence for structural rearrangements induced by substrate binding. *J. Mol. Biol.*, **294**, 1203-1213.
- Neumann, L., Abele, R. & Tampé, R. (2002) Thermodynamics of peptide binding to the transporter associated with antigen processing (TAP). *J. Mol. Biol.*, **324**, 965-973.
- Nijenhuis, M. & Hämmerling, G.J. (1996) Multiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J. Immunol.*, **157**, 5467-5477.
- Nijenhuis, M., Schmitt, S., Armandola, E.A., Obst, R., Brunner, J. & 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**, 2186-2195.
- Nohno, T., Saito, T. & Hong, J.S. (1986) Cloning and complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* glutamine permease operon (*glnHPQ*). *Mol. Gen. Genet.*, **205**, 260-269.

- Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P.J., Sadasivan, B., Herberg, J.A., Grandea, A.G., Riddell, S.R., Tampé, R., Spies, T. & Trowsdale, J. (1997) A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science*, **277**, 1306-1309.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. & Rapoport, T.A. (1995) Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, **81**, 561-570.
- Paulsson, K.M. & Wang, P. (2004) Quality control of MHC class I maturation. *FASEB J.*, **18**, 31-38.
- Plempner, R.K. & Wolf, D.H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 266-270.
- Ploegh, H.L. (1998) Viral strategies of immune evasion. *Science*, **280**, 248-253.
- Powis, S.J., Townsend, A.R.M., Deverson, E.V., Bastin, J., Butcher, G.W. & Howard, J.C. (1991) Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature*, **354**, 528-531.
- Princiotta, M.F., Finzi, D., Qian, S.B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgerit, F., Bennink, J.R. & Yewdell, J.W. (2003) Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity*, **18**, 343-354.
- Proks, P., Capener, C.E., Jones, P. & Ashcroft, F.M. (2001) Mutations within the P-loop of Kir6.2 modulate the intraburst kinetics of the ATP-sensitive potassium channel. *J. Gen. Physiol.*, **118**, 341-353.
- Rammensee, H.G. (1995) Chemistry of peptides associated with mhc class-i and class-ii molecules *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 85-96.
- Raghuraman, G., Lapinski, P.E. & Raghavan, M. (2002) Tapasin interacts with the membrane-spanning domains of both TAP subunits and enhances the structural stability of TAP1 x TAP2 Complexes. *J. Biol. Chem.*, **277**, 41786-41794.
- Reidl, J., Romisch, K., Ehrmann, M. & Boos, W. (1989) MalI, a novel protein involved in regulation of the maltose system of Escherichia coli, is highly homologous to the repressor proteins GalR, CytR, and LacI. *J. Bacteriol.*, **171**, 4888-4899.

- Reits, E.A.J., Vos, J.C., Grommé, M. & Neefjes, J. (2000) The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature*, **404**, 774-778.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, **245**, 1066-73.
- Rock, K.L. & Goldberg, A.L. (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.*, **17**, 739-779.
- Roelse, J., Grommé, M., Momburg, F., Hämmerling, G. & Neefjes, J. (1994) Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. *J. Exp. Med.*, **180**, 1591-1597.
- Ross, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J., Baumberg, S. & Wootton, J.C. (1990) Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol. Microbiol.*, **4**, 1207-1214.
- Russ, G., Esquivel, F., Yewdell, J.W., Cresswell, P., Spies, T. & Bennick, 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**, 21312-21318.
- Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T. & Cresswell, P. (1996) Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class-I molecules with TAP. *Immunity*, **5**, 103-114.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY.
- Sarkadi, B., Price, E.M., Boucher, R.C., Germann, U.A. & Scarborough, G.A. (1992) Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 4854-4858.
- Saveanu, L., Daniel, S. & van Endert, P.M. (2001) Distinct functions of the ATP binding cassettes of transporters associated with antigen processing: a mutational analysis of Walker A and B sequences. *J. Biol. Chem.*, **276**, 22107-22113.

- Schmitt, L., Benabdelhak, H., Blight, M.A., Holland, I.B. & Stubbs, M.T. (2003) Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains. *J. Mol. Biol.*, **330**, 333-342.
- Schmitt, L. & Tampé, R. (2002) Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 754-760.
- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A. & Herzog, V. (2000) Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J. Cell. Biol.*, **148**, 1203-1212.
- Schumacher, T.N., De Bruijn, M.L., Vernie, L.N., Kast, W.M., Melief, C.J., Neefjes, J.J. & Ploegh, H.L. (1991) Peptide selection by MHC class I molecules. *Nature*, **350**, 703-706.
- Schumacher, T.N., Kantesaria, D.V., Heemels, M.T., Ashton-Rickardt, P.G., Shepherd, J.C., Früh, K., Yang, Y., Peterson, P.A., Tonegawa, S. & Ploegh, H.L. (1994) Peptide length and sequence specificity of the mouse TAP1/TAP2 translocator. *J. Exp. Med.*, **179**, 533-540.
- Senior, A.E. & al-Shawi, M.K. (1992) Further examination of seventeen mutations in Escherichia coli F1-ATPase beta-subunit. *J. Biol. Chem.*, **267**, 21471-21478.
- Senior, A.E., Alshawi, M.K. & Urbatsch, I.L. (1998) ATPase activity of chinese-hamster P-glycoprotein. *Meth. Enzymol.*, **292**, 514-523.
- Senior, A.E. & Gadsby, D.C. (1997) ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR. *Semin. Cancer Biol.*, **8**, 143-150.
- Senior, A.E., Wilke-Mounts, S. & al-Shawi, M.K. (1993) Lysine 155 in beta-subunit is a catalytic residue of Escherichia coli F1 ATPase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 6989-6994.
- Seufert, W. & Jentsch, S. (1992) In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *EMBO J.*, **11**, 3077-3080.
- Shapiro, A.B. & Ling, V. (1994) ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from chinese-hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, 3745-3754.
- Sharom, F.J., Yu, X.H., Chu, J.W.K. & Doige, C.A. (1995) Characterization of the ATPase activity of P-glycoprotein from multidrug-resistant chinese-hamster ovary cells. *Biochem. J.*, **308**, 381-390.

- Shepherd, J.C., Schumacher, T.N., Ashton-Rickardt, P.G., Imaeda, S., Ploegh, H.L., Janeway, C.A.J. & Tonegawa, S. (1993) TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell*, **74**, 577-584.
- Simpson, J.C., Roberts, L.M., Romisch, K., Davey, J., Wolf, D.H. & Lord, J.M. (1999) Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Lett.*, **459**, 80-84.
- Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J.E., Rosen, J., Thomas, P.J. & Hunt, J.F. (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell*, **10**, 139-149.
- Spee, P. & Neefjes, J. (1997) TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin. *Eur. J. Immunol.*, **27**, 2441-2449.
- Spies, T., Bresnahan, M., Bahram, S., Arnold, D., Blanck, G., Mellins, E., Pious, D. & DeMars, R. (1990) A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature*, **348**, 744-747.
- Spies, T., Cerundolo, V., Colonna, M., Cresswell, P., Townsend, A. & DeMars, R. (1992) Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature*, **355**, 644-646.
- Stephens, D.B. & Androlewicz, M.J. (1997) Reconstitution of peptide-binding activity by TAP in proteoliposomes. *FEBS Lett.*, **416**, 353-358.
- Stoeckenius, W. (1976) The purple membrane of salt-loving bacteria. *Sci. Am.*, **234**, 38-46.
- Suh, W.K., Mitchell, E.K., Yang, Y., Peterson, P.A., Waneck, G.L. & 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. Medicine*, **184**, 337-348.
- Sweet, C. (1999) The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microbiol. Rev.*, **23**, 457-482.
- Tampé, R., Urlinger, S., Pawlitschko, K. & Uebel, S. (1997) The transporters associated with antigen processing (TAP). In Kuchler, K., Rubartelli, A. & Holland, B. (eds.), *Unusual Secretory Pathways: From Bacteria to Man*. Springer, New York, pp. 115-136.

- Tan, P., Kropshofer, H., Mandelboim, O., Bulbuc, N., Hämmerling, G.J. & Momburg, F. (2002) Recruitment of MHC class I molecules by tapasin into the transporter associated with antigen processing-associated complex is essential for optimal peptide loading. *J. Immunol.*, **168**, 1950-1960.
- Thomas, P.M., Cote, G.J., Wohllk, N., Haddad, B., Mathew, P.M., Rabl, W., Aguilar-Bryan, L., Gagel, R.F. & Bryan, J. (1995) Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science*, **268**, 426-429.
- Tomazin, R., Hill, A.B., Jugovic, P., York, I., van Endert, P., Ploegh, H.L., Andrews, D.W. & Johnson, D.C. (1996) Stable binding of the Herpes Simplex virus ICP47 protein to the peptide binding-site of TAP. *EMBO J.*, **15**, 3256-3266.
- Toomela, T., Jolkkonen, M., Rinken, A., Jarv, J. & Karlsson, E. (1994) Two-step binding of green mamba toxin to muscarinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett.*, **352**, 95-97.
- Townsend, A. & Bodmer, H. (1989) Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.*, **7**, 601-624.
- Townsend, A., Elliott, T., Cerundolo, V., Foster, L., Barber, B. & Tse, A. (1990) Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro [published erratum appears in Cell 1990 Sep 21;62(6):following 1233]. *Cell*, **62**, 285-295.
- Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A. & Kelly, A. (1990) Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature*, **348**, 741-744.
- Turnquist, H.R., Vargas, S.E., Schenk, E.L., McIlhaney, M.M., Reber, A.J. & Solheim, J.C. (2002c) The interface between tapasin and MHC class I: identification of amino acid residues in both proteins that influence their interaction. *Immunol. Res.*, **25**, 261-269.
- Udaka, K., Wiesmüller, H.-H., Kienle, S., Jung, G. & Walden, P. (1995) Decrypting the structure of major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes with complex peptide libraries. *J. Exp. Med.*, **181**, 2097-2108.
- Uebel, S., Kraas, W., Kienle, S., Wiesmüller, K.-H., Jung, G. & Tampé, R. (1997a) Recognition principle of the TAP-transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 8976-8981.

- Uebel, S., Meyer, T.H., Kraas, W., Kienle, S., Jung, G., Wiesmüller, K.H. & Tampé, R. (1995) Requirements for peptide binding to the human transporter associated with antigen processing revealed by peptide scans and complex peptide libraries. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18512-18516.
- Uebel, S., Plantinga, T., Weber, P.J., Beck-Sickinger, A.G. & Tampé, R. (1997b) Peptide binding and photo-crosslinking to detergent solubilized and to reconstituted transporter associated with antigen processing (TAP). *FEBS Lett.*, **416**, 359-363.
- Uebel, S. & Tampé, R. (1999) Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr. Opin. Immunol.*, **11**, 203-208.
- Urlinger, S., Kuchler, K., Meyer, T.H., Uebel, S. & Tampé, R. (1997) Intracellular location, complex-formation, and function of the transporter associated with antigen processing in yeast. *Eur. J. Biochem.*, **245**, 266-272.
- 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**, 14632-14638.
- van Endert, P.M., Tampé, R., Meyer, T.H., Tisch, R., Bach, J.F. & McDevitt, H.O. (1994) A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity*, **1**, 491-500.
- Vassilakos, A., Cohendoyle, M.F., Peterson, P.A., Jackson, M.R. & Williams, D.B. (1996) The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class-I histocompatibility molecules. *EMBO J.*, **15**, 1495-1506.
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J. & McCawley, P. (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*, **13**, 213-217.
- Vitetta, E.S., Fernandez-Botran, R., Myers, C.D. & Sanders, V.M. (1989) Cellular interactions in the humoral immune response. *Adv. Immunol.*, **45**, 1-105.
- von Boehmer, H. (1994) Positive selection of lymphocytes. *Cell*, **76**, 219-228.
- Vos, J.C., Spee, P., Momburg, F. & 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**, 6679-6685.
- Vos, J.C., Reits, E.A., Wojcik-Jacobs, E. & Neefjes, J. (2000) Head-head/tail-tail relative orientation of the pore-forming domains of the heterodimeric ABC transporter TAP. *Curr. Biol.*, **10**, 1-7.

- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. & Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **1**, 945-951.
- Wang, K.N., Früh, K., Peterson, P.A. & Yang, Y. (1994) Nucleotide binding of the C-terminal domains of the major histocompatibility complex-encoded transporter expressed in *Drosophila melanogaster* cells. *FEBS Lett.*, **350**, 337-341.
- Wang, R.C., Seror, S.J., Blight, M., Pratt, J.M., Broome-Smith, J.K. & Holland, I.B. (1991) Analysis of the membrane organization of an *Escherichia coli* protein translocator, HlyB, a member of a large family of prokaryote and eukaryote surface transport proteins. *J. Mol. Biol.*, **217**, 441-454.
- Watts, T.H., Brian, A.A., Kappler, J.W., Marrack, P. & McConnell, H.M. (1984) Antigen presentation by supported planar membranes containing affinity-purified I-Ad. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 7564-7568.
- Weinstein, S., Wallace, B.A., Blout, E.R., Morrow, J.S. & Veatch, W. (1979) Conformation of gramicidin A channel in phospholipid vesicles: a ¹³C and ¹⁹F nuclear magnetic resonance study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 4230-4234.
- Wenzel, T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F. & Baumeister, W. (1994) Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett.*, **349**, 205-209.
- Williams, A.P., Peh, C.A., Purcell, A.W., McCluskey, J. & Elliott, T. (2002) Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. *Immunity*, **16**, 509-520.
- Wright, J.K., Seckler, R. & Overath, P. (1986) Molecular aspects of sugar:ion cotransport. *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 225-248.
- Yang, B. & Braciale, T.J. (1995) Characteristics of ATP-dependent peptide transport in isolated microsomes. *J. Immunol.*, **155**, 3889-3896.
- Yewdell, J.W., Reits, E. & Neefjes, J. (2003c) Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 952-961.
- Yuan, Y.R., Blecker, S., Martsinkevich, O., Millen, L., Thomas, P.J. & Hunt, J.F. (2001) The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette.

- Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter. *J. Biol. Chem.*, **276**, 32313-32321.
- Zarling, A.L., Luckey, C.J., Marto, J.A., White, F.M., Brame, C.J., Evans, A.M., Lehner, P.J., Cresswell, P., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. & Engelhard, V.H. (2003) Tapasin is a facilitator, not an editor, of class I MHC Peptide binding. *J. Immunol.*, **171**, 5287-5295.
- Zhang, F., Zhang, W., Liu, L., Fisher, C.L., Hui, D., Childs, S., Dorovini-Zis, K. & Ling, V. (2000) Characterization of ABCB9, an ATP binding cassette protein associated with lysosomes. *J. Biol. Chem.*, **275**, 23287-23294.
- Zhang, W., Young, A.C., Imarai, M., Nathenson, S.G. & Sacchettini, J.C. (1992) Crystal structure of the major histocompatibility complex class I H-2Kb molecule containing a single viral peptide: implications for peptide binding and T-cell receptor recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 8403-8407.

